



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA DO ENVELHECIMENTO E
DOENÇAS CORRELACIONADAS**

“ESTRESSE OXIDATIVO: Avaliação in vitro da capacidade moduladora do Resveratrol em células da linhagem Neuro 2-A”

RAQUEL CUNHA LARA

Belo Horizonte
2018

RAQUEL CUNHA LARA

“ESTRESSE OXIDATIVO: Avaliação in vitro da capacidade moduladora do Resveratrol em células da linhagem Neuro 2-A”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Neurociências.

Área de Concentração: Neurociências
Orientadora: Prof. Dra. MIRIAM CHAVES SCHULTZ

Belo Horizonte
2018

043 Lara, Raquel Cunha.
"Estresse oxidativo: avaliação in vitro da capacidade moduladora do Resveratrol em células da linhagem Neuro 2-A" [manuscrito] / Raquel Cunha Lara. - 2018.

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

Orientadora: Prof. Dra. Miriam Chaves Schultz.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Neurociências - Teses. 2. Envelhecimento. 3. Estresse oxidativo. 4. Resveratrol. 5. Peróxido de hidrogênio. I. Schultz, Miriam Chaves. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612.8

O amor é a força mais sutil do mundo!
(Mahatma Gandhi) E para a qual mais vale à pena todo e qualquer esforço!!!

Ao meu papai Renato! Porque ele adora tudo isso!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço de maneira sincera e intensa à minha orientadora Míriam! Você me deu oportunidade, acreditou em mim. Lutou comigo em minhas lutas. Ensinou, compartilhou, orientou. São 10 anos juntas. Sei que construímos laços fortes para uma vida! E deixo aqui meu agradecimento com muito amor, carinho e admiração! Obrigada Míriam! Você é incomparável!

AGRADECIMENTOS

Obrigada meu Deus por me carregar em seu colo nessa jornada!

Minha Maria Regina! Meu sonho mais bonito! Te dedico minha vida com todo o amor que tenho em mim! Você me ensina tantas coisas sobre viver, não desistir e amar! Me mostrou que o AMOR é a força mais poderosa que nos move, incentiva e direciona. Meu amor, minha necessidade, minha coragem, meu orgulho! Você é a melhor pessoa que conheço e tenho o prazer de lhe dizer: Minha filha! O meu melhor lugar é ao seu lado! Te amo infinitamente e muito além do que as palavras podem expressar. Filha amada a mamãe ta aqui...

Ao André! Quem eu amo desde sempre e para sempre! Companheiro de todas as horas. Você que me incentiva, que se orgulha das minhas conquistas, que me dá suporte, apóia e me alegra! Obrigada meu amor! Não conseguiria sem você. Me sinto segura ao seu lado e sei que nunca será diferente. Eu te amo! Você é meu!

À minha querida e amada tia Clarete! Que cuidou da Maria Regina com um amor, cuidado e responsabilidade inigualáveis! Eu acredito em anjos! Maria Regina e eu tivemos você conosco. Obrigada tia Clarete! Te amamos! Você me permitiu prosseguir em paz. Minha gratidão eterna.

Aos meus pais, Renato e Regina! Sempre fizeram e fazem o impossível para que eu tenha o melhor e o mais importante, me sintam melhor! Vocês são meus primeiros incentivadores. Meus amigos fiéis. Meus amores eternos. Meus ídolos. Eu tenho a maior sorte e boa ventura do mundo por tê-los. À presença constante, doce, amorosa e linda da minha mãe! Você me traz paz! Ao vigor de papai pela vida, pela luta, pelo amor! Obrigada! Por tudo! Por todos os dias! Amo vocês imensamente e eternamente!

Ao Rodrigo! Meu irmão de vida! Meu melhor amigo! Desejo a você mais do que quero para mim! Obrigada por me direcionar, equilibrar e principalmente estar conosco! Te amo!

Aos meus avós que são uma brisa de frescor e alegria em minha vida! Amo vocês. Parabéns pela maestria com que conduzem a vida! Meu amor e gratidão.

Aos tios e familiares! Somos unidos e juntos mais fortes.

Camila e Milena uma surpresa em minha vida! Carregadas de boas energias, palavras amigas, sorrisos reconfortantes. Obrigada minhas amigas! Luciana por sorrir lindamente com os olhos!

Taísa pelo auxílio, pela doçura e boa vontade. Sinto saudades!

Glaucy pela ajuda e disponibilidade em um momento decisivo. E principalmente, amizade. Somos 10!

À Gláucia pelos ensinamentos e amizade.

vi

À professora Eliane pela gentileza e presença amigável.

Aos amigos Mari e Paulo, meninas do laboratório do Alfredo, e o próprio professor Alfredo. Vocês são espetaculares.

Aos funcionários da UFMG, da Neurociências...meu muito obrigada!

Despeço-me da minha Federal com um até breve e um sorriso de saudade!

AGRADECIMENTO AOS COLABORADORES

Laboratório de Imunologia Celular e Molecular (UFMG)

Muito obrigada pelo suporte necessário.

Apoio Financeiro

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

Sumário

Lista de Tabelas	xii
Lista de Figuras	xiii
Lista de Abreviaturas	xv
Resumo	xvii
Abstract	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA.....	4
3. OBJETIVOS	16
3.1. Objetivo geral	16
3.2. Objetivos específicos.....	16
4. METODOLOGIA	18
4.1. Equipamentos	18
4.2. Reagentes	18
4.3. Kits Comerciais.....	18
4.4. Preparo de Soluções.....	19
4.5. Cultivo celular da linhagem Neuro 2-A.....	21
4.6. Ensaio para Definição da concentração de H ₂ O ₂ utilizada no estudo.....	22
4.7. Ensaio para Definição da concentração de RSV utilizada no estudo.....	22
4.8. Tratamentos das células N2-A com RSV.....	22
4.9. Ensaio de Viabilidade Celular.....	23
4.10. Ensaio de Quimioluminescência.....	24
4.10.1 Quimioluminescência em Células N2-A.....	25
4.10.2 Quimioluminescência com inibidores da via de SIRT1 (EX527) e de AMPk (Dorsomorphin) em Células N2-A 38.....	25
4.11 Análise Qualitativa de ERO por Microscopia de Fluorescência.....	26
4.12 Ensaio de MTT em Células N2-A.....	27
4.14 Produção de ONOO ⁻ em Células N-2A.....	28
4.15 Avaliação da atividade da CAT em Células N2-A.....	28
4.16 Avaliação da atividade da SOD em Células N2-A.....	29
4.17 Avaliação da atividade de IL-10 em Células N2-A.....	29
4.18 Avaliação da atividade de IL-6 em Células N2-A.....	30
4.19 Avaliação da atividade de TNF- α em Células N2-A	30
4.20 Análise estatística.....	31
5 RESULTADOS.....	32
5.1 Padronização através de curva concentração-resposta da concentração de H ₂ O ₂ utilizada em células N2-A.....	32
5.1.1 Avaliação por quimioluminescência da produção de ERO induzida por H ₂ O ₂ em células da linhagem N2-A.....	33
5.2. Padronização através de curva concentração-resposta da concentração de RSV utilizada em células N2-A.....	34
5.3 Viabilidade das células N2-A expostas ao RSV5 μ m como: pré e pós-estímulo, e ao H ₂ O ₂ 10.5% v/v.....	35
5.4 Avaliação comparativa por quimioluminescência dependente de luminol do efeito do RSV como: pré e pós-estímulo na produção de ERO em células N2-A induzida por H ₂ O ₂	36
5.5 Avaliação comparativa qualitativa por microscopia de fluorescência do efeito do RSV como: pré e pós-estímulo na produção de ROS em células N2-A induzida por H ₂ O ₂	37
5.6 Avaliação comparativa pelo método de <i>griess</i> do efeito do RSV como: pré e pós-estímulo na produção de NO em células N2-A induzida por H ₂ O ₂	40
5.7 Avaliação comparativa do efeito do RSV como: pré e pós-estímulo na produção de ONOO ⁻ em células N2-A induzida por H ₂ O ₂	41
5.8 Avaliação comparativa do efeito do RSV como: pré e pós-estímulo na capacidade redutora das células N2-A.....	42

5.9 Avaliação comparativa do efeito do RSV como: pré e pós-estímulo sobre a atividade da CAT em células N2-A.....	43
5.10 Avaliação comparativa do efeito do RSV como: pré e pós-estímulo sobre a atividade da SOD em células N2-A.....	44
5.11 Avaliação comparativa por quimioluminescência do efeito do RSV como: pré e pós-estímulo na produção de ERO em células N2-A sobre a via de AMPk.....	45
5.12 Avaliação comparativa por quimioluminescência do efeito do RSV como: pré e pós-estímulo na produção de ERO em células N2-A sobre a via de SIRT1.....	46
5.13 Avaliação comparativa do efeito do RSV como: pré e pós-estímulo sobre a atividade da IL-6 em células N2-A.....	48
5.14 Avaliação comparativa do efeito do RSV como: pré e pós-estímulo sobre a atividade de TNF-A em células N2-A.....	49
5.15 Avaliação comparativa do efeito do RSV como: pré e pós-estímulo sobre a atividade de IL-10 em células N2-A.....	50
5.16 Avaliação comparativa do efeito modulador, anti- Oxidante e anti-inflamatório do RSV como: pré e pós-estímulo frente os ensaios realizados.....	51
6 DISCUSSÃO.....	52
7 CONCLUSÃO.....	68
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

Lista de Tabelas

Tabela 1: Principais agentes de defesa antioxidante enzimática e não-enzimática.....	23
Tabela 2: Disposição dos grupos estimulados com H ₂ O ₂ 60%v/v em Células N2-A.....	33
Tabela 3: Disposição dos grupos estimulados com RSV 78.94μM em Células N2-A.....	33
Tabela 4: Avaliação comparativa do efeito modulatório / anti-oxidante e anti-inflamatório do RSV em células N2-A.....	62

Lista de Figuras

Figura 1: Representação gráfica da evolução das faixas etárias na população brasileira. Em (A) 1980 e (B) uma projeção para 2020.....	12
Figura 2: Células N-2A em cultura. À esquerda fotografia exibindo as células aderidas em monocamada. À direita imagem ampliada para mostrar detalhes da célula.....	13
Figura 3: Locais de produção de ERO.....	16
Figura 4: Reação em cadeia da formação de ERO.....	17
Figura 5: Fatores internos e fatores externos envolvidos na formação de RL que podem contribuir para o desequilíbrio pró-oxidante/antioxidante.....	19
Figura 6: Representação esquemática dos potenciais mecanismos de envelhecimento imunológico e neural.....	22
Figura 7: Estrutura química da molécula de RSV.....	24
Figura 8: Interações entre AMPK e SIRT1.....	25
Figura 9: Reação de Quimioluminescência dependente de Luminol.....	35
Figura 10: Delineamento experimental dos 2 diferentes Tratamentos: Pré-estímulo e Pós-estímulo com RSV 5µM.....	37
Figura 11: Curva CONcentração-Resposta de H ₂ O ₂ em Células N2-A.....	42
Figura 12: Avaliação da produção de ERO induzida pelo H ₂ O ₂	43
Figura 13: Curva Concentração-Resposta de RSV em Células N2-A.....	44
Figura 14: Avaliação da viabilidade das N2-A expostas ao Pré e Pós-estímulo com RSV5µM e H ₂ O ₂ 30% v/v.....	45
Figura 15: Avaliação comparativa do efeito do RSV na produção de ERO em N2-A induzida por H ₂ O ₂	46
Figura 16: Representação qualitativa da produção de ERO em células N2-A Pré-estimuladas com RSV.....	48
Figura 17: Representação qualitativa da produção de ERO em células N2-A Pós-estimuladas com RSV.....	49
Figura 18: Avaliação comparativa do efeito do RSV na produção de NO em N2-A.....	50

Figura 19: Avaliação comparativa do efeito do RSV na produção de ONOO ⁻ em N2-A.....	51
Figura 20: Avaliação comparativa do efeito do RSV na capacidade redutora das N2-A.....	52
Figura 21: Avaliação comparativa do efeito do RSV na atividade da CAT em N2-A.....	53
Figura 22: Avaliação comparativa do efeito do RSV na atividade da SOD em N2-A.....	54
Figura 23: Avaliação comparativa do RSV sob a via de AMPk na produção de ERO em N2-A induzida por H ₂ O ₂	55
Figura 24: Avaliação comparativa do RSV sob a via de SIRT1 na produção de ERO em N2-A induzida por H ₂ O ₂	57
Figura 25: Avaliação comparativa do efeito do RSV na atividade de IL-6 em N2-A.....	58
Figura 26: Avaliação comparativa do efeito do RSV na atividade de TNF- α em N2-A.....	59
Figura 27: Avaliação comparativa do efeito do RSV na atividade de IL-10 em N2-A.....	60
Figura 28: Esquema do efeito do RSV na via de sinalização SIRT1 e NF- κ B envolvidos na neuroinflamação.....	71

Lista de Abreviaturas

μM micro-molar
AEO Ambiente de Estresse Oxidativo
AMPk Adenosina Monofosfato ativada por proteína quinase
AO Oxidase alternativa
ATP Trifosfato de adenosina
CAT Catalase
Cu Cobre
Cyt citocromo
DHODH diidroorotato desidrogenase
DMEM Dulbecco's Modified Eagle's médium
DMSO Dimetilsulfóxido
DNA Ácido Desoxirribonucleico
EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético
EO Estresse Oxidativo
ERN Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO Espécies Reativas de Oxigênio
FTE Flavoproteína de transferência de elétrons
Gpx Glutathione peroxidase
 H_2O_2 Peróxido de Hidrogênio
HCl Ácido clorídrico
HPA Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN Interferon
IKK Complexo de proteínas inibitórias
IL-1 β Interleucina 1 beta
IL-6 Interleucina 6
 KH_2PO_4 Fosfato monopotássico
MAO Monoamina oxidase
mGPDH glicerofosfato desidrogenase mitocondrial
Mn Manganês
MTT(3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolium Bromide)
N2-A Linhagem celular de neuroblastoma da camundongo albino
 Na_2HPO_4 Fosfato dissódico
NaCl Cloreto de sódio
NAD DH Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina desidrogenase
NADH Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
 NaNO_2 Nitrito de sódio
NaOH Hidróxido de sódio
NF- κ B Fator nuclear kappa B
NO Óxido Nítrico
NOS Óxido nítrico sintase
 $\text{O}_2^{\cdot -}$ Ânion superóxido
OH \cdot Radical hidroxila
ONOO \cdot Peroxinitrito
PBS Tampão fosfato salino
PDH piruvato desidrogenase
pH potencial hidrogeniônico

RL Radicais Livres
RLU Unidades relativas de Luz
RSV Resveratrol
SASP Fenótipo secretor associado à senescência
SFB Soro Fetal Bovino
SI Sistema Imune
SIRT's Sirtuínas
SIRT1 Sirtuína 1
SNC Sistema Nervoso Central
SOD Superóxido dismutase
TEO Teoria do Estresse Oxidativo
TGF- β Fator de transcrição de crescimento
TNF- α Fator de Necrose
Zn Zinco
 α -KGDH alfa-cetoglutarato desidrogenase

Resumo

O envelhecimento é um processo natural e fisiológico que compromete progressivamente o estado físico e cognitivo do indivíduo, aumentando o risco de morbidades como: câncer, doenças cardiovasculares e mortalidade. Está associado a uma alta ocorrência de alterações metabólicas e distúrbios. O “Estresse Oxidativo” destaca-se entre os principais elementos envolvidos nessas arrevesadas modificações. Ademais, o envelhecimento cerebral trata-se de um fenômeno também, intrincado e genuíno, e, é determinado exclusivamente pelo estresse oxidativo, acúmulo de macromoléculas danificadas oxidativamente e alterações na estrutura e função dos neurônios, que aumentam ainda mais o fator de risco para a maioria das doenças. Os demais dados que dão suporte ao importante papel do estresse oxidativo no processo de envelhecimento e doenças neurodegenerativas apóiam o efeito benéfico dos antioxidantes como terapia adjuvante. Os antioxidantes são compostos capazes de inibir ou retardar a oxidação de biomoléculas. Podem ser enzimáticos ou não enzimáticos, sendo produzidos endogenamente ou não. Entre os não enzimáticos, temos os polifenóis, distribuídos em frutas, legumes, bebidas e cereais. Como é o caso do Resveratrol. Nosso estudo teve como objetivo, verificar o possível efeito Neuroprotetor e/ou Modulador do resveratrol, em células da linhagem N2-A (neuroblastoma de camundongo albino) previamente ou tardiamente inseridas em um “ambiente de estresse oxidativo”, causado pela exposição ao peróxido de hidrogênio. A dose do resveratrol foi padronizada em 5 μ M; e do peróxido de hidrogênio em 10.5% v/v, ambos através de curva Concentração-Resposta. Para avaliação dos Compartimentos Oxidativos e Redutores em Células N2-A, procedemos com os ensaios de: quimioluminescência dependente de luminol, microscopia de fluorescência com o uso da Carboxi- H₂DCFDA, produção de óxido nítrico e peroxinitrito, capacidade redutora celular por MTT. Verificamos também, a atividade da catalase e superóxido dismutase nessa linhagem celular. Analisamos o envolvimento das vias de sinalização AMPk e SIRT1 sobre a atividade do RSV nas células N2-A. Finalmente procedemos com a avaliação do perfil inflamatório nessas células neurais através da atividade de IL-6, TNF- α e IL-10. Observamos neste estudo que o RSV 5 μ M em células N2-A exerce poder antioxidante, anti-inflamatório e neuro-protetor. E o mesmo ocorre majoritariamente sob a forma de Prevenção.

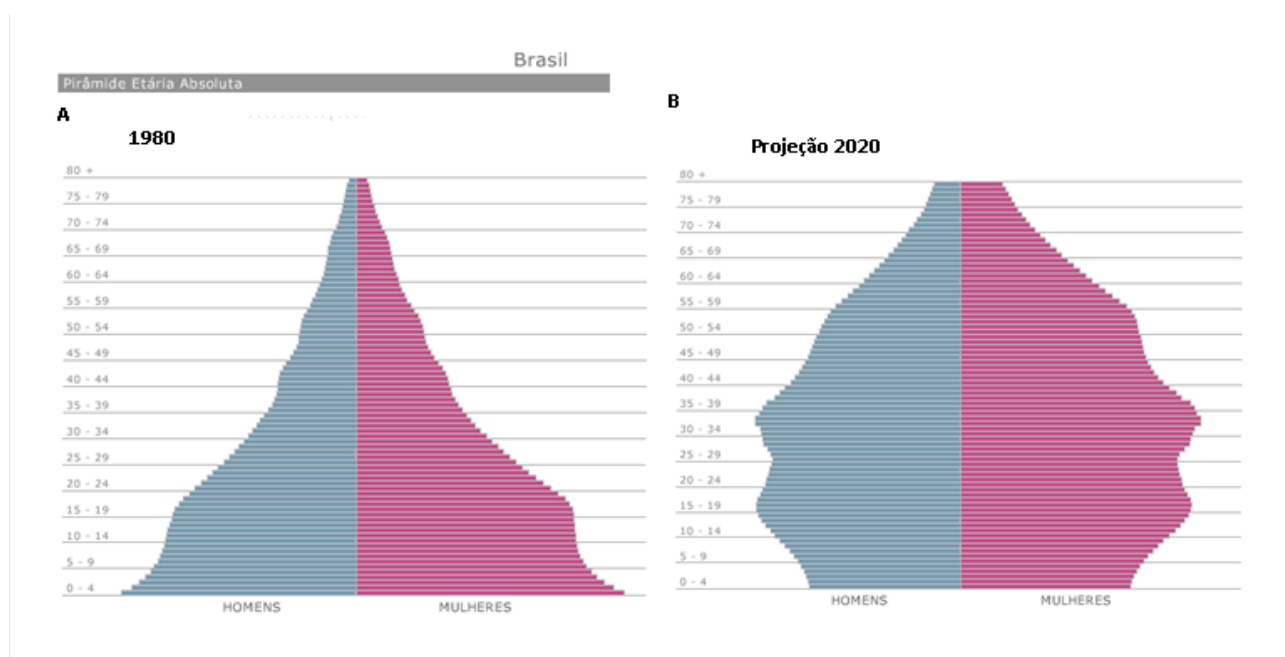
Abstract

Aging is a natural and physiological process that progressively compromises the individual's physical and cognitive status, increasing the risk of morbidities such as: cancer, cardiovascular diseases and mortality. It is associated with a high occurrence of metabolic alterations and disorders. "Oxidative Stress" stands out among the main elements involved in these strident modifications. In addition, cerebral aging is a phenomenon, too, intricate and genuine, and is determined exclusively by oxidative stress, accumulation of oxidatively damaged macromolecules and changes in the structure and function of neurons, which further increase the risk factor for diseases. Too much data supporting the important role of oxidative stress in the aging process and neurodegenerative diseases supports the beneficial effect of antioxidants as adjuvant therapy. Antioxidants are compounds capable of inhibiting or retarding the oxidation of biomolecules. They can be enzymatic or non-enzymatic, being produced endogenously or not. Among the non-enzymatic, we have the polyphenols, distributed in fruits, vegetables, beverages and cereals. As is the case with Resveratrol. Our study aimed to verify the possible Neuroprotective and / or Modulator effect of resveratrol in N2-A cells (albino mouse neuroblastoma) previously or late in an "oxidative stress environment" caused by exposure to peroxide hydrogen. The dose of resveratrol was standardized at 5 μ M; and hydrogen peroxide in 10.5% v / v, both through Concentration-Response curve. For the evaluation of Oxidative and Reducing Compartments in N2-A Cells, we performed the following tests: fluorescence microscopy with the use of Carboxy-H2DCFDA, production of nitric oxide and peroxynitrite, cellular reducing capacity by MTT. We also verified the activity of catalase and superoxide dismutase in this cell line. We analyzed the involvement of AMPk and SIRT1 signaling pathways on RSV activity in N2-A cells. Finally, we proceeded with the evaluation of the inflammatory profile in these neural cells through the activity of IL-6, TNF- α and IL-10. We observed in this study that RSV 5 μ M in N2-A cells exerts antioxidant, anti-inflammatory and neuro-protective power. And the same occurs mostly in the form of Prevention.

Introdução

1 Introdução

O envelhecimento populacional é um dos maiores desafios da saúde pública contemporânea. Fenômeno que ocorreu inicialmente em países desenvolvidos, mas, recentemente é nos países em desenvolvimento que têm acontecido de forma mais acentuada. No Brasil, o número de idosos (≥ 60 anos de idade) passou de 3 milhões em 1960, para 7 milhões em 1975 e 14 milhões em 2002 (um aumento de 500% em quarenta anos) e estima-se que alcançará 32 milhões em 2020 (SOUZA; DE, 2017). A **Figura 1** ilustra a situação etária do Brasil nos anos de 1980 e a projeção para o ano de 2020.



uma projeção para 2020. Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) 2017.

Realinhar os sistemas de saúde às necessidades das pessoas idosas também será crucial. Isso exigirá uma mudança de sistemas que são projetados em torno de curar doenças agudas, para sistemas que possam fornecer cuidados contínuos para as condições crônicas que são mais prevalentes em idade avançada.

Podemos dividir as causas do envelhecimento em primárias e secundárias. As primárias referem-se ao passar do tempo somado às mudanças: fisiológicas, genéticas e moleculares; que ocasionam prejuízos motores, visuais, auditivos, incapacidade de adaptação ao estresse, diminuição da resistência às infecções, dentre outros. As secundárias seriam um agravamento das primárias, como resultado, por exemplo, de práticas de saúde precárias (sedentarismo, tabagismo) somado em alguns casos, ao surgimento de doenças degenerativas (KOLOVOU; KOLOVOU; MAVROGENI, 2014).

A imunossenescência enquadra-se como causa primária do envelhecimento, e, é responsável pelo aumento da vulnerabilidade dos idosos às doenças infecciosas, originando também, os mecanismos biológicos responsáveis pelas doenças inflamatórias relacionadas à idade (LARBI *et al.*, 2008).

Já que vivenciamos um contexto no qual a população tende a envelhecer, e com isso aumentam-se as chances de possíveis patologias incapacitantes; vimos a necessidade e prioridade de se estudar mecanismos e formas, para quem sabe, amenizar os prejuízos que indubitavelmente vêm acompanhando o processo de envelhecimento.

Neste cenário, o estudo do equilíbrio oxidante/redutor vem sendo pesquisado com grande sucesso através de culturas de células *in vitro* (NOGUEIRA-MACHADO *et al.*, 2006; CHAVES *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Clone de células Neuro 2-A (N2-A) (ATCC CCL131) (**Figura 2** abaixo), estabelecidos por Klebe & Ruddle (1969) a partir de um neuroblastoma espontâneo em camundongo albino, originado de células da medula espinhal, é uma linhagem amplamente usada em modelos neuronais *in vitro*, (CALDERON *et al.*, 1999) que exhibe fenótipo neuronal tanto morfológica quanto neuroquimicamente (BASTA-KAIM *et al.*, 2006).

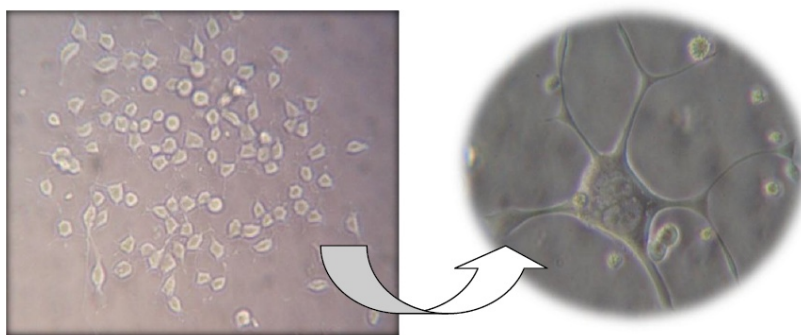


Figura 2: Células N-2A em cultura. À esquerda fotografia exibindo as células aderidas em monocamada. À direita imagem ampliada para mostrar detalhes da célula. Fonte: Imagem obtida por fotografia no Laboratório de Bioquímica e Imunologia do Envelhecimento e Doenças Correlacionadas- UFMG, 2017.

As células N2-A tem sido objeto de estudo também para avaliação de antioxidantes, atividade mitocondrial e estresse oxidativo (EO) (AMAZZAL *et al.*, 2007; ROZAS; FREITAS, 2008). Nesse enquadramento, achados de REN & Cols., mostraram a redução de apoptose em células N2-A após exposição ao resveratrol (RSV) (REN *et al.*, 2015). Resultados semelhantes foram observados em estudos de NAMSI & Cols, onde o mesmo RSV induziu à diferenciação neuronal nessa linhagem celular (NAMSI *et al.*, 2018).

Estudos bioquímicos, organizacionais, populacionais e comparativos extensos sobre o envelhecimento têm se concentrado na avaliação qualitativa e, às vezes, quantitativa de características que contribuem para o desenrolar do processo de senescência. Portanto, é evidente que o envelhecimento é causado pelo acúmulo de danos; resultante da falta de capacidade em se proteger, manter e reparar os tecidos somáticos ao longo do tempo. Pode-se razoavelmente argumentar que o desenvolvimento de uma descrição geral do envelhecimento é prematuro; porque faltam dados descritivos detalhados e uma compreensão ampla para produzir modelos realistas do processo (MURPHY; PARTRIDGE, 2015).

Desta forma, fizemos um estudo em células N2-A, na tentativa de verificar os efeitos moduladores do Resveratrol (RSV) *in vitro* com foco no SNC, no processo de envelhecimento/EO. Assim, esclarecendo por quais mecanismos de atuação o RSV poderia reduzir os danos celulares e teciduais causado pelos radicais livres (RL) e Espécies reativas de oxigênio (ERO) / Espécies reativas de nitrogênio (ERN) no processo de envelhecimento saudável e patológico.

Justificativa

2 Justificativa

O envelhecimento é um processo natural e fisiológico que compromete progressivamente o estado físico e cognitivo do indivíduo, aumentando o risco de morbidades como: câncer, doenças cardiovasculares e mortalidade. Está associado a uma alta ocorrência de alterações metabólicas e distúrbios neurodegenerativos (PEREIRA *et al.*, 2005). O Estresse Oxidativo (EO) destaca-se entre os principais elementos envolvidos nessas arrevesadas modificações. Ademais, o envelhecimento cerebral trata-se de um fenômeno também, intrincado e genuíno, e, é determinado exclusivamente pelo estresse oxidativo, acúmulo de macromoléculas danificadas oxidativamente e alterações na estrutura e função dos neurônios, que aumentam ainda mais o fator de risco para a maioria das doenças neurodegenerativas (VITALE *et al.*, 2013; NICOLAI *et al.*, 2015; SOUSA *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2018).

Assim, torna-se crucial entender os mecanismos geradores de envelhecimento. Este processo envolve diferentes marcadores interdependentes à nível celular, molecular e orgânico (HÖHN *et al.*, 2016). A teoria mitocondrial dos radicais livres, mais tarde denominada Teoria do Estresse Oxidativo (TEO) é atualmente, uma das mais aceitas para explicar o envelhecimento, como já citado anteriormente; e o define, como resultado da falha à nível molecular do organismo, em manter as defesas oxidativas, a integridade mitocondrial, a proteostase, as estruturas de barreira, o reparo de DNA, os telômeros, a função imunológica, a regulação metabólica e enfim, a capacidade regenerativa. Uma linha consistente de evidências que apóiam essa teoria, é a existência de grande quantidade de dados que mostraram, um aumento relacionado à idade no dano oxidativo em várias moléculas celulares em organismos que variam de invertebrados à humanos (CHANDRASEKARAN; IDELCHIK; MELENDEZ, 2017; GENEVA *et al.*, 2015).

Os Radicais livres (RL) são átomos altamente reativos ou moléculas com um ou mais elétrons não-pareados em sua camada externa. Esses radicais podem ser produzidos nas células, perdendo ou ganhando um único elétron, portanto, comportando-se como oxidantes ou redutores. Possuem meia-vida muito curta, são extremamente instáveis pela sua própria configuração e se ligam rapidamente a moléculas vizinhas (HALLIWELL, 1994; GUTTERIDGE, 1987; OLIVEIRA *et al.*, 2010; VITALE *et al.*, 2013).

Os organismos vivos estão constantemente expostos a agentes oxidantes provenientes tanto de fontes endógenas, quanto exógenas, capazes de modificar biomoléculas e induzir danos. Dessa forma, o excesso de RL assume um papel importante como indutor de lesão tecidual em lipídeos, proteínas e DNA, observados no envelhecimento (RIZZO *et al.*, 2011).

Os termos: Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN) referem-se a derivados reativos de radicais e não- radicais de oxigênio e nitrogênio, respectivamente. Tradicionalmente, acredita-se que a maior parte da produção de ERO se origine da cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias, especialmente nos complexos I e III. Entretanto, outras moléculas, como a *nicotina adenina dinucleotídeo* NADH desidrogenase (NADH DH), foram descritas como potenciais produtores de ERO. A geração de espécies reativas surge, muitas vezes, com o rompimento da homeostase celular. Mas, em contraste, várias proteínas produzem ERO para restaurar esse equilíbrio (HOLZEROVÁ; PROKISCH, 2015). A **Figura 3** abaixo ilustra locais de produção de ERO nas células.

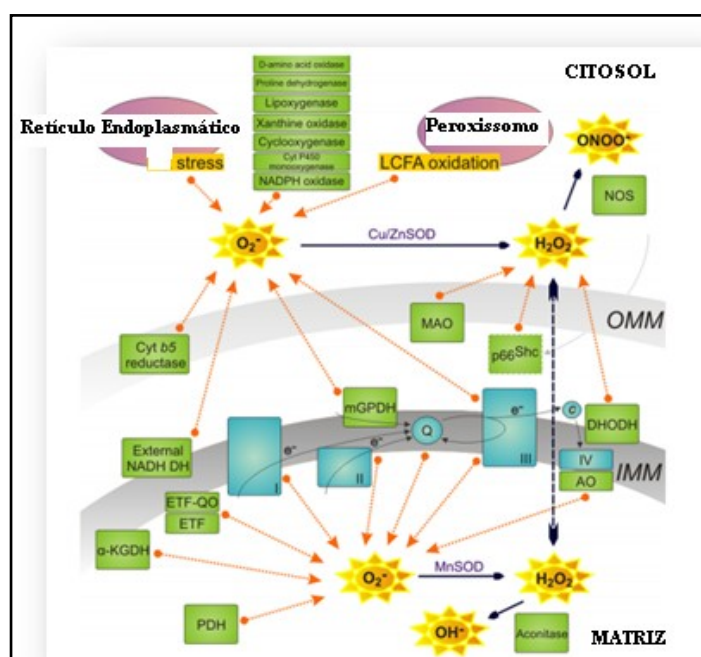


Figura 3: Locais de produção de ERO. Muitos locais diferentes de produção de ERO existem dentro de uma célula. A maioria deles localiza-se no ambiente mitocondrial, como os complexos da cadeia respiratória: complexo I (I), complexo II (II), complexo III (III) ou glicerofosfato desidrogenase mitocondrial (mGPDH)

próximos a α -cetogluturato desidrogenase (α -KGDH), flavoproteína de transferência de elétrons (FTE) ubiquinona oxidoreductase, piruvato desidrogenase (PDH), aconitase, oxidase alternativa (AO), complexo IV (IV), diidroorotato desidrogenase (DHODH), NADH desidrogenase externa (NADH DH), proteína p66Shc, citocromo (cyt) b5 redutase, monoamina oxidase (MAO) e óxido nítrico sintase (NOS). Outras proteínas ou organelas também podem contribuir para a produção de ERO. Complexos da cadeia respiratória são exibidos em azul, outros contribuintes ERO em verde, organelas em violeta. **Fonte:** Modificada HOLZEROVÁ; PROKISCH, 2015

As ERO podem ser geradas endogenamente por reações metabólicas, como: transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, durante a ativação de fagócitos ou células inflamatórias. E, exogenamente, através de poluentes e fumaça de cigarro, por exemplo. (KIRKHAM; RAHMAN, 2006). A geração de ERO e ERN não se limita apenas a determinar efeitos deletérios, mas também está envolvida na extração de energia de moléculas orgânicas, na defesa imunológica e no processo de sinalização celular (LIGUORI *et al.*, 2018). A redução incompleta do oxigênio leva à geração de diferentes espécies de radicais livres, tais como: ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), este radical pode originar outras ERO/ERN como: peróxido de hidrogênio (H_2O_2) sendo este, o principal indutor exógeno de dano oxidativo celular e senescência (HÖHN *et al.*, 2016; VITALE *et al.*, 2013). Na **Figura 4** abaixo, temos uma reação em cadeia da formação de ERO.

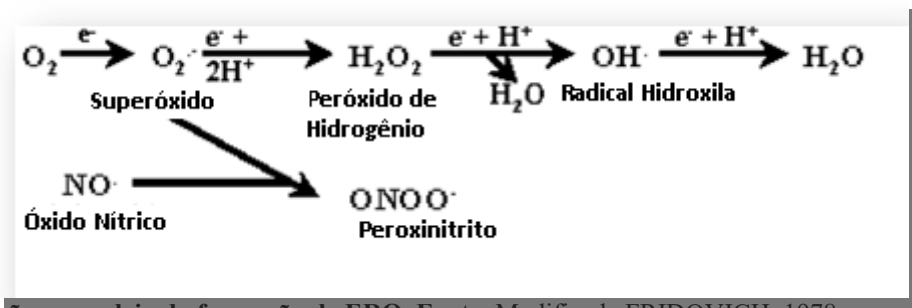


Figura 4: Reação em cadeia da formação de ERO. **Fonte:** Modificada FRIDOVICH, 1978

O H_2O_2 origina-se da dismutação enzimática ou espontânea do O_2 . Devido à sua alta permeabilidade à membrana induz efeitos intracelulares deletérios na célula de origem e em células vizinhas (BASTA-KAIM *et al.*, 2006). Não devemos esquecer, contudo, de descrever os ERN, que incluem espécies não-radicalares como: peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) e espécies radicalares: óxido nítrico (NO^{\cdot}) (RÓDENAS; MITJAVILA; CARBONELL, 1998).

O NO^{\cdot} é uma importante molécula de sinalização com múltiplos papéis centrais nos sistemas: cardiovascular e neural, bem como na resposta inflamatória (MODUM; GIUSTARINI; TSIKAS, 2014; MAITI *et al.*, 2018). Trata-se de um mensageiro molecular importante no cérebro e

desempenha um papel importante na aprendizagem e memória, atuando também como agente neuroprotetor (TATCHER; BENNETT; REYNOLDS, 2006).

Já o ONOO^- é formado por O_2^- e NO , em uma base controlada pela taxa de difusão de ambos os radicais (TURRENS, 2003). Devido à sua forte oxidação e nucleofilia, pode reagir rapidamente com um painel de biomoléculas, incluindo: lipídios, ácidos nucleicos, aminoácidos e proteínas; através de oxidação direta, nitração e decomposição em radicais secundários altamente reativos. Esse potente oxidante de meia-vida curta, têm sido relacionado à numerosas condições patológicas, como inflamação aguda e crônica, acidente vascular cerebral isquêmico, diabetes, aterosclerose e distúrbios neurodegenerativos (CHEN *et al.*, 2018).

Portanto, é importante manter um balanço da homeostase redox com a ajuda de moduladores-redox ou antioxidantes dentro da célula; seja por enzimas que convertem ERO/ERN em espécies menos danosas (como por exemplo, a superóxido dismutase) ou por moléculas antioxidantes que eliminam essas espécies reativas de maneira não-específica (citando caso análogo, a glutatona e tioredoxina). No entanto, o equilíbrio pró-oxidante/antioxidante apropriado em uma célula normal pode ser deslocado em direção ao estado pró-oxidante chamado TEO, quando a produção de ERO/ERN aumenta muito, ou quando os níveis de antioxidantes são diminuídos (GÜLÇIN, 2012; BISSINGER *et al.*, 2018).

A desproporção pró-oxidante/antioxidante mencionada acima pode ser ocasionada por fatores internos e externos. Fatores internos incluem a geração de energia pelas mitocôndrias ou reações de detoxificação. Os fatores externos incluem exposição à fumaça de cigarro, poluição, consumo excessivo de álcool, exposição à radiação, infecções, doenças e outros (SIES, 1993), que podem ser ilustrados na **Figura 5** abaixo.

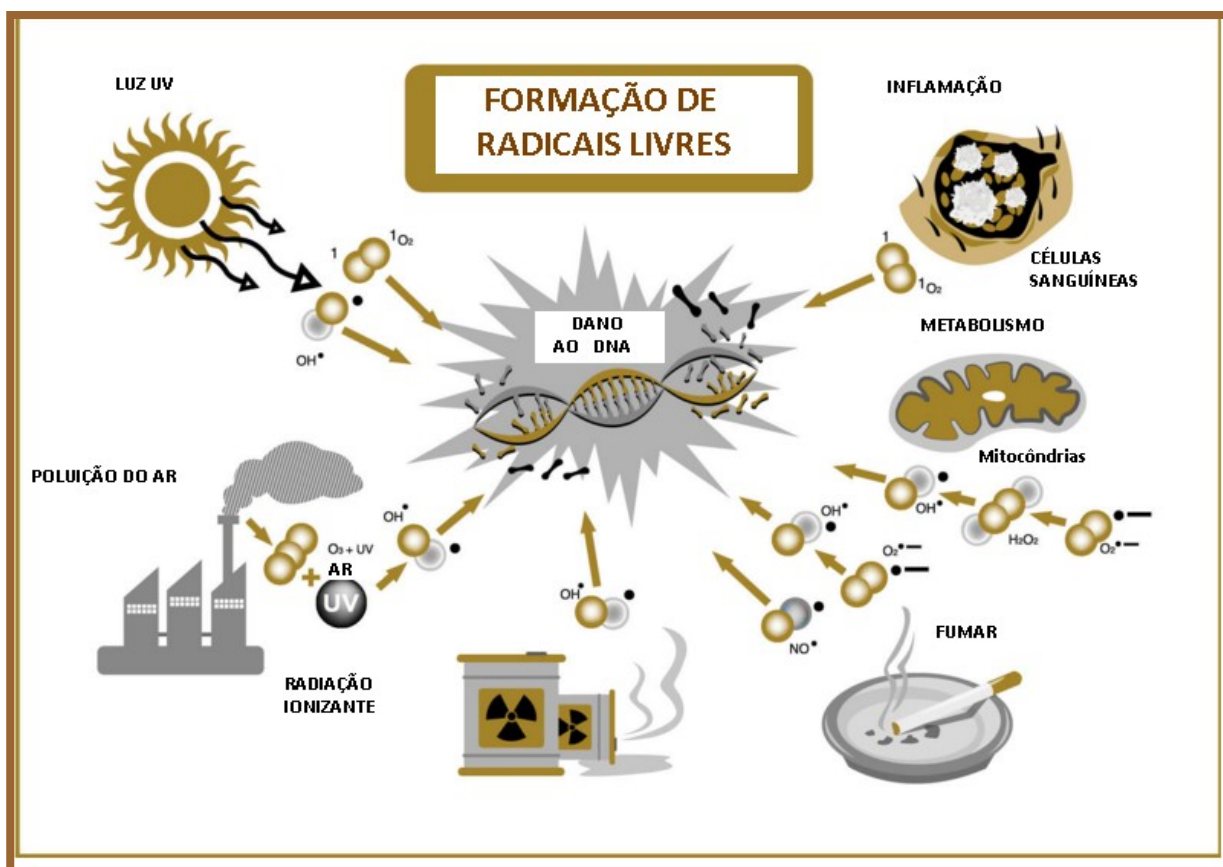


Figura 5: Fatores internos e fatores externos envolvidos na formação de RL que podem contribuir para o desequilíbrio pró-oxidante/antioxidante. Fonte: Modificado PENDYALA; THOMAS; KUMARI, 2008

O Sistema Imunológico (SI) é regulado por neurotransmissores, proteínas, citocinas e hormônios e se comunica de maneira constante e extensiva com o Sistema Nervoso Central (SNC); participando da modulação do comportamento e de outras funções neurológicas críticas ao longo da vida. O intercâmbio entre esses dois principais sistemas adaptativos do organismo se dá através de múltiplos caminhos. A citar como exemplo, a descoberta recente de um sistema linfático meníngeo capaz de transportar: fluído, células imunes e macromoléculas do SNC para os linfonodos de drenagem (LOUVEAU *et. al.*, 2015; RAPER *et.al.*, 2016). Os diversos estímulos captados pelo cérebro durante diferentes situações podem agir de maneira benéfica ou prejudicial sobre o SI, desencadeando uma série de reações com conseqüências importantes. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) é também um dos responsáveis por vários dos elos entre SNC e SI (BAUER, 2005; ALVES, 2007).

O envelhecimento é acompanhado também, por mudanças graduais na estrutura e função do SI. A deterioração progressiva da imunidade inata e adaptativa e o aumento em

baixo grau da inflamação crônica denominam-se “Imunossenescência”. Tais mudanças levam a uma desregulação imunológica, aumentando dessa forma, a frequência e a gravidade das doenças em idosos. Esse quadro onde temos associado: ativação imune inata crônica, alterações significativas nas funções dos monócitos (o que pode ter implicações no aumento da inflamação crônica de baixo grau e no desenvolvimento de doenças relacionadas à idade), juntamente com monócitos inflamatórios, aumento de citocinas pró-inflamatórias e de ERO/ERN contribuem para um processo inflamatório crônico sub-clínico, denominado “Inflammaging” (HOFFMANN; PYRIDOPOULOS, 2015; HEFFNER, 2011; DE LA FUENTE; MIQUEL, 2009; BENEDETTO *et al.*, 2017).

Acredita-se que esse fenômeno conhecido como “Inflammaging” seja o responsável por muitos cânceres, bem como por uma série de outras doenças debilitantes, incluindo: aterosclerose, doença de Alzheimer e doença inflamatória intestinal (ELISIA *et al.*, 2017).

A inflamação é um elemento central que afeta as células da unidade neurovascular durante o envelhecimento. A neuroinflamação tem sido associada principalmente à microglia e, em menor extensão aos astrócitos. De maneira complementar, as ERO são mediadores-chave no processo de desacoplamento neurovascular e alterações do complexo juncional endotelial cerebral no envelhecimento. Além de desencadarem a secreção de citocinas inflamatórias (WILHELM *et al.*, 2017).

À medida que se envelhece, experimenta-se uma maior suscetibilidade a deficiências de memória após um desafio imune, que é caracterizada assim como no estímulo oxidante das ERO citado acima, por uma produção aumentada e prolongada de citocinas pró-inflamatórias no cérebro envelhecido; sendo assim, as citocinas são importantes componentes na biologia do envelhecimento e da neuroinflamação (BARRIENTOS *et al.*, 2015; FRANCESCHI *et al.*, 2017).

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

Citocinas inflamatórias clássicas, como: Interleucina 1 β (IL-1 β), Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) e Interleucina 6 (IL-6), ativam seus receptores cognatos nas células-alvo, induzindo vias que diferem dependendo do tipo de célula, e muitas vezes resultam em efeitos fisiopatológicos divergentes. No sistema nervoso têm funções fisiológicas que incluem neurites, neurogênese, sobrevivência neuronal, podas sinápticas durante o desenvolvimento do cérebro, e também, regulam a força da transmissão e plasticidade sináptica. Entretanto, a hiper-produção e liberação exarcebada de citocinas, ou a sua presença prolongada no tecido, está associada a disfunções neuronais, descritas, por exemplo, na dor neuropática, transtornos psiquiátricos, doenças neurodegenerativas e epilepsia (VEZZANI *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2014).

O TNF- α é uma das citocinas pró-inflamatórias mais comuns, responsável por vários distúrbios inflamatórios. A inibição da geração da forma ativa do TNF- α é uma terapia promissora para diversas doenças inflamatórias (BAHIA; SILAKARI, 2010). Além disso, é um mediador fundamental de reações inflamatórias sistêmicas agudas e crônicas; não apenas por induzir a sua própria secreção, mas também, por estimular a produção de outras citocinas inflamatórias, como por exemplo, a IL-6 (CHU, 2013). Esta tem efeitos nocivos sobre o envelhecimento e foi proposta como um marcador fiável para o declínio funcional, como preditor de morbidade e mortalidade na velhice. Possui atividade redundante e pleiotrópica que medeia uma série de funções fisiológicas, incluindo a diferenciação de linfócitos, proliferação e sobrevivência celular, além de potencializar sinais apoptóticos (GIOVANNINI *et al.*, 2011; KAMIMURA; ISHIHARA; HIRANO, 2003).

Em contrapartida, a IL-10 é a citocina antiinflamatória mais potente. Bloqueia respostas imunes em diferentes níveis, agindo direta e indiretamente nos braços inato e adaptativo do sistema imune. Conseqüentemente, pode inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias (SAXENA *et al.*, 2015). Níveis elevados da mesma foram encontrados em idosos centenários (SALVIOLI *et al.*, 2009).

Como mencionado, o envelhecimento é caracterizado por uma inflamação crônica de baixo grau que provavelmente contribui significativamente para a morbidade e mortalidade em idosos (FRANCESCHI; CAMPISI, 2014). Assim, a imunossupressão periférica e a inflamação podem promover a neuroinflamação por meio da modulação das células gliais em direção a

um estado pró-inflamatório mais ativo, levando à perda da função neuroprotetora, à disfunção neuronal e acúmulo de dano tecidual cerebral (BENEDETTO *et al.*, 2017). A inflamação sistêmica pode, portanto, aumentar o risco de desenvolver comprometimento cognitivo, distúrbios neurológicos e neurodegeneração (GOLDECK *et al.*, 2016). Na **Figura 6** abaixo, temos a representação esquemática dos potenciais mecanismos de imunossenescência e neurosenescência.

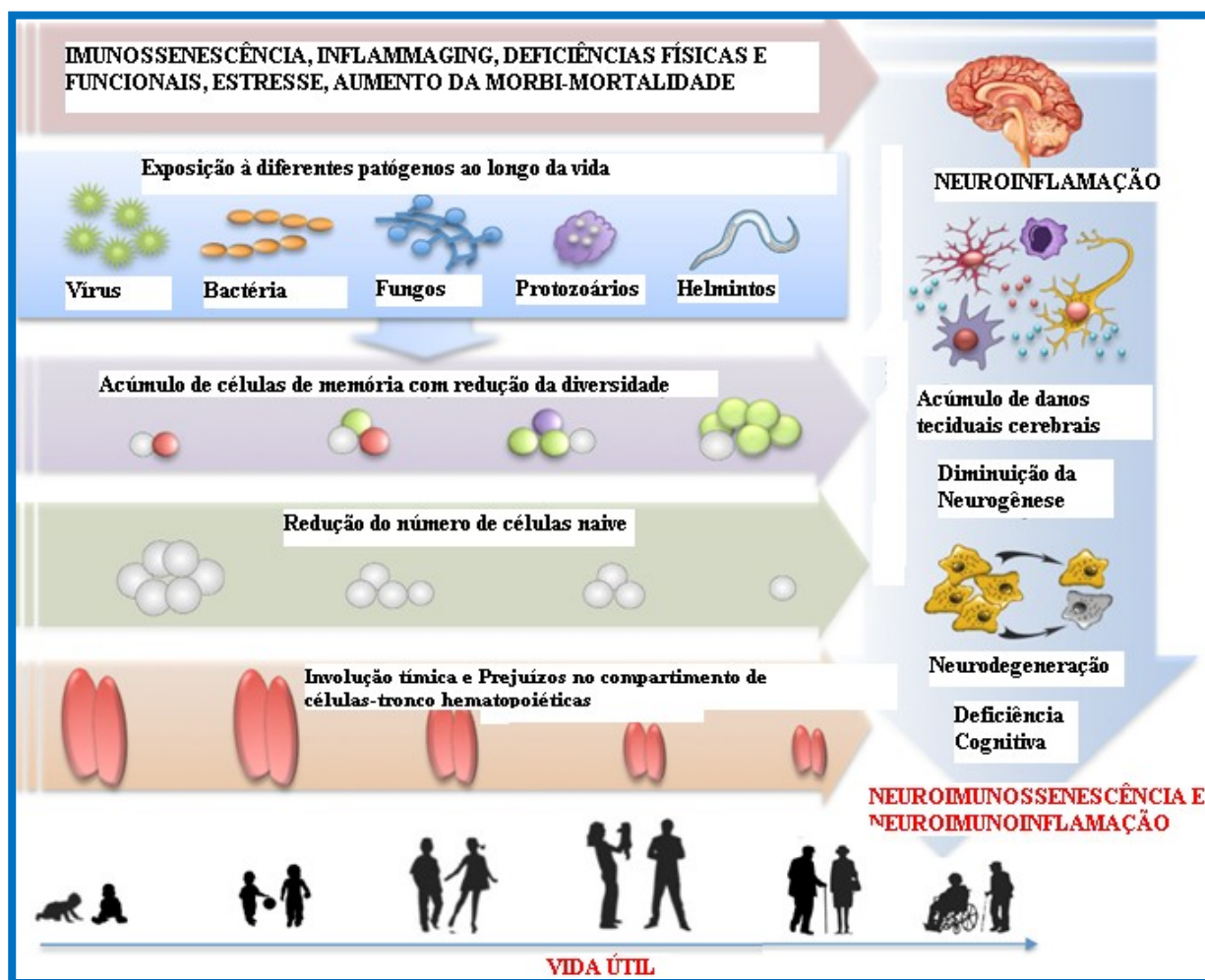


Figura 6: Representação esquemática dos potenciais mecanismos de envelhecimento imunológico e neural. **Fonte:** Modificado BENEDETTO *et al.*, 2017

Os demasiados dados que dão suporte ao importante papel do EO no processo de envelhecimento e doenças neurodegenerativas apóiam o efeito benéfico dos antioxidantes como terapia adjuvante. Isso porque, o cérebro não apresenta defesas antioxidantes totalmente eficientes, tornando-o vulnerável aos danos desse estresse oxidativo e deficiente em prevenir as doenças oxidativas com a senescência do organismo. Os níveis de glutathiona e enzimas

antioxidantes são muito mais baixos no SNC, em comparação aos eritrócitos e os tecidos periféricos (KARUPPAGOUNDER *et al.*, 2009; [FLOYD](#); [HENSLEY, 2002](#); [CHALIMONIUK, 2015](#)).

Os antioxidantes são compostos capazes de inibir ou retardar a oxidação de biomoléculas. Podem ser enzimáticos ou não enzimáticos (exemplos ilustrados na **Tabela 1** abaixo), sendo produzidos endogenamente ou não. Entre os não enzimáticos, temos os polifenóis, distribuídos em frutas, legumes, bebidas e cereais (SCHAFFER *et al.*, 2016; FIORENTINI *et al.*, 2015). Há grande interação entre os compostos produzidos endogenamente e os antioxidantes provenientes da dieta (SIES; STAHL, 1995).

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

Tabela 1: Principais agentes de defesa antioxidante enzimática e não-enzimática. Fonte: BIANCHI; ANUNES, 1999

Estudos em células sanguíneas periféricas de adultos e idosos saudáveis demonstraram em granulócitos, componentes da primeira linha de defesa contra infecções bacterianas, (WANG *et al.*, 2014), um aumento de ERO a partir dos 40 anos e de ERN a partir dos 50 anos. Concomitantemente com este aumento, esses autores observaram uma diminuição significativa do poder antioxidante, sugerindo um desequilíbrio celular metabólico no envelhecimento (CHAVES *et al.*, 2000/1998).

As enzimas antioxidantes desempenham um importante papel no controle do EO. A Catalase (CAT) e a Superóxido Dismutase (SOD) cooperam no controle de específicas moléculas de ERO. Existem várias isoformas de SOD em diferentes compartimentos celulares (TRACHOOTHAM *et al.*, 2008). Enquanto a SOD reduz a concentração de $O_2^{\cdot -}$ livres catalisando sua dismutação para H_2O_2 . A CAT, hemoproteína citoplasmática, decompõe H_2O_2 em uma reação de duas etapas. Sua atividade é efetiva principalmente quando os níveis desse oxidante

estão elevados; sendo portanto indispensáveis em condições de EO. (SEVARATNAM; ROBAIRE, 2016; ROBBINS *et al.*, 2013 HAO *et al.*, 2018).

Como defesa não-enzimática, pode-se citar o RSV (*3,5,4'-tri-hidroxi-trans-estilbeno-* **Figura 7**) pertence ao grupo dos polifenóis. Trata-se de uma fitoalexina naturalmente sintetizada ou induzida em plantas (particularmente da pele da uva, cranberries, blueberries, amendoins, amoras e vinho tinto), é um agente antioxidante e anti-inflamatório amplamente conhecido. Em células e organismos eucarióticos superiores, este composto exibe uma gama notável de atividades biológicas, tais como: as já citadas, propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, atua como agente anti-câncer, antienvhecimento, e tem propriedades cardio e neuro-protetoras (PATEL *et al.*, 2011; BAUER *et al.*, 2005; RASHTBARI *et al.*, 2017).

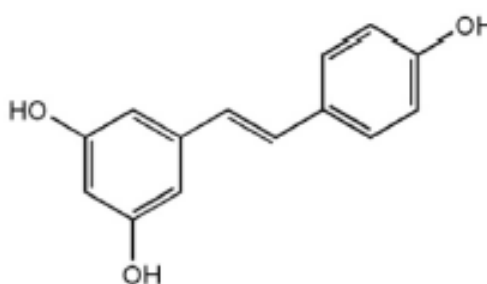


Figura 7: Estrutura química da molécula de RSV. Fonte: SAMMER *et al.*, 2014.

Recentemente, tem sido proposto que o RSV pode exercer efeitos neuroprotetores através da ativação de *Proteína quinase ativada por Monofosfato de Adenosina* (AMPk) e sirtuínas (SIRT's) (Ver **Figura 8** abaixo). AMPK tem emergido como um fator chave com a capacidade de regular o metabolismo do corpo inteiro. Também, promove “turnover” mitocondrial, promovendo a produção de energia em níveis adequados com minimização da geração de ERO pelas mesmas (CETRULLO *et al.*, 2015). Já as sirtuínas são histonas diacetilases NAD-dependentes, e estão envolvidas também com o estado metabólico da célula. Regulam o metabolismo energético e a função mitocondrial. A Sirtuína 1 (SIRT1) faz a mediação de diferentes respostas ao estresse, em particular, inflamação que é uma causa muito importante do envelhecimento e doenças neurodegenerativas (NAKAGAWA; GUARENTE, 2011; JĚSKO *et al.*, 2017).

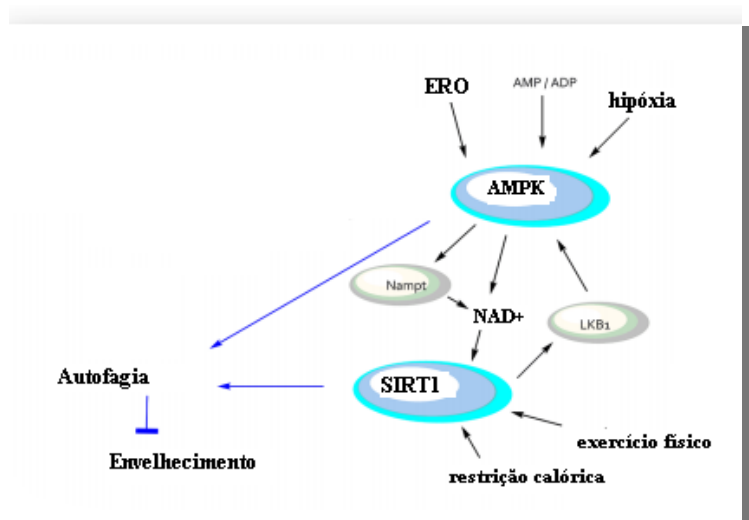


Figura 8: Interações entre AMPK e SIRT1. Fonte: Modificada CETRULLO *et al.*, 2015

Uma questão importante na biologia é se, podem ser concebidas intervenções que melhorem a saúde em conjunto com o aumento da expectativa de vida restante em pessoas idosas? A disfunção física e a incapacidade de responder ao estresse se tornam cada vez mais prevalentes no final da vida, com até 45% das pessoas com mais de 85 anos sendo consideradas frágeis. Essa está associada à diminuição da mobilidade e aumento da carga de doenças crônicas, perda de independência, internações em lares de idosos, hospitalizações e conseqüente mortalidade. A patogênese celular desses distúrbios físicos relacionados ao envelhecimento ainda não foram totalmente elucidados, e atualmente, não há intervenções baseadas em mecanismos direcionados à causa raiz para melhorar essa incapacidade em idosos, que estejam disponíveis para aplicação clínica (XU *et al.*, 2018).

Diante dessa realizada acima elucidada, verificamos que o EO vem tomando um papel decisivo no processo de envelhecimento e conseqüentemente, no surgimento de doenças neurodegenerativas incapacitantes. Sendo assim, torna-se importante estudar quais seriam os mecanismos envolvidos na atuação de moléculas potencialmente importantes no controle desse desequilíbrio existente entre: geração de moléculas oxidantes e capacidade antioxidante intrínseca; como é o caso do RSV.

Objetivos

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Verificar o possível efeito Neuroprotetor e/ou Modulador do RSV, em células da linhagem N2-A previamente ou tardiamente inseridas em um “ambiente de estresse oxidativo” (AEO), causado pela exposição ao H_2O_2 .

3.2 Objetivos Específicos:

→ *Todos os ensaios foram realizados sob duas formas distintas de estímulo sobre as células N-2A pelo RSV:*

- 1) Células N2-A pré-estimuladas com RSV e posteriormente sujeitas ao estímulo estressor (H_2O_2) e também,*
- 2) Células N2-A pós-estimuladas com RSV após exposição a um AEO.*

3.2.1- Avaliação dos Compartimentos Oxidativos e Redutores em Células N2-A

- Quantificar a produção de ERO, por ensaio de Quimioluminescência dependente de luminol, em Células N2-A;
- Qualificar a produção de ERO, de forma complementar e ilustrativa através do “*LIVE Green Reactive Oxygen Species Detection Kit*” com auxílio de microscópio de fluorescência *Olympus IX70*, em Células N2-A;
- Avaliar a Capacidade Redutora Celular por ensaio de MTT [*Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio*], em Células N2-A;
- Mensurar a Produção de NO por *Reação de Griess*, em Células N2-A;
- Quantificar a produção de $ONOO^-$ de acordo com a técnica de *Hughes & Nicklin's*, em Células N2-A;

3.2.2- Avaliação da atividade da enzima catalase em células N2-A

- Quantificar a atividade da CAT por kit específico, em Células N2-A.

3.2.3- Avaliação da atividade da enzima Superóxido dismutase em células N2-A

- Quantificar a atividade da SOD por kit específico, em Células N2-A.

3.2.5- Avaliação da Vias de Sinalização na liberação de ERO por Células N2-A

- Avaliar a produção de ERO por ensaio de Quimioluminescência dependente de luminol, na ausência ou presença de inibidor da via de sinalização celular: Dorsomorphin (*Compound C*): Inibidor de AMPk e Ex527(*6-Cloro-2,3,4,9-tetra-hidro-1H-Carbazol-1-carboxamida*): Inibidor específico da SIRT1; em Células N2-A.

3.2.4- Verificação da Liberação de Interleucinas por células N2-A

- Dosagem de IL-10, IL-6 e TNF- α , através de kits comerciais, em células N2-A.

3.2.6- Avaliação da Viabilidade Celular através de Resazurin em Células N2-A

- Avaliar a viabilidade celular por ensaio de corante de Resazurin, em células N2-A.

Metodologia

4 Metodologia

4.1 Equipamentos

Autoclave vertical (PHOENIX), Banho-Maria a 37°C (HEMOQUÍMICA), Câmara de Neubauer espelhada (OPTIK LABOR), Centrífuga (LS3PLUS-CELM), Estufa (SHEL LAB), Leitor de Microplacas (THERMO PLATE), Microscópio biológico binocular (QUIMIS), Microscópio invertido (MOTIC AE21), Microscópio de Fluorescência (OLYMPUS IX70-SOFTWARE IMAGE PRO PLUS).

4.2 Reagentes

Resveratrol, Ácido Fosfórico 85%, Azul de Trypan, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Dimetilsulfoxido (DMSO), Hidróxido de sódio Luminol (*5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalozinedione*), MTT *3-(4,5 dimethylazol-2yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide*, Naftiletilenodiamida, Resazurin sodium salt, Sulfanilamida e Tripsina foram obtidos pela Sigma Aldrich (St Louis,MO). Ácido Clorídrico, Cloreto de sódio, Cloreto de Potássio, Fosfato de sódio bifásico anidro, Fosfato de potássio monobásico anidro, Nitrito de sódio e Peróxido de Hidrogênio P.A. (H₂O₂) foram obtidos da LabSynth (São Paulo, BR). In solution™ AMPk Inhibitor, Compound C/Dorsomorphin foi obtido pela Calbiochem (Darmstadt, Germany). Finalmente, SIRT1 Inhibitor, EX527 foi obtido pela Tocris Bioscience (MN, USA).

4.3 Kits Comerciais

Image-iT™ LIVE Green Reactive Oxygen Species Detection Kit (I36007) pela Molecular Probes invitrogen detection technologies, Human IL-10 Uncoated ELISA, Human IL-6 Uncoated ELISA e Human TNF-alpha Uncoated ELISA pela Invitrogen by Thermo Fisher Scientific. Por fim, EnzyChrom™ Catalase Assay Kit (ECAT-100) Quantitative Colorimetric/Fluorimetric Catalase Determination e EnzyChrom™ Superoxide Dismutase Assay Kit (ESOD-100) Determination of SOD activity pela BioAssay Systems.

4.4 Preparo das soluções

SOLUÇÃO DE H₂O₂ 21%v/v

Para solução estoque, 6 mL de H₂O₂ 35%v/v foi diluído para um volume final de 10 mL com água MILLI-Q. Posteriormente o conteúdo foi homogeneizado e filtrado em membrana de porosidade de 0,22 microns, e colocado em recipiente estéril.

SOLUÇÃO DE RSV 78.94 µM

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

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

Para o preparo de PBS, foram misturados os seguintes sais: Na₂HPO₄ (1,15g), KH₂PO₄ (0,20g), NaCl (8,0g), KCl (0,20g), sendo o volume final completado para 1 litro com água MILLI-Q. O potencial hidrogeniônico (pH) da solução (7,3) foi acertado utilizando-se HCl 1N ou NaOH 1N. A solução final foi autoclavada a 121°C por 20 minutos.

SOLUÇÃO DE AZUL DE TRYPAN

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

MEIO DE CULTURA DMEM

Um frasco de DMEM foi diluído em 900 mL de água destilada. Em seguida foram adicionados 2,0g de bicarbonato de sódio e solução antibiótica / antimicótica. O pH foi ajustado para a faixa de 7,3 – 7,4, utilizando-se NaOH 0,5N. O volume final da solução foi ajustado para 1000 mL. Em seguida a solução foi filtrada em membrana de porosidade de 0,22 microns, e colocada em recipiente estéril.

SOLUÇÃO PADRÃO DE NITRITO

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

SOLUÇÃO DE SUFANILAMIDA 1%

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

SOLUÇÃO DE NAFTILENODIAMIDA 0,1%

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

SOLUÇÃO DE *GRIESS*

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

SOLUÇÃO DE LUMINOL

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

MTT

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

SOLUÇÃO DE TRIPSINA 0,20% E EDTA 0,02%

A Tripsina 1:250 (2,0g) foi dissolvida em aproximadamente 800 mL de PBS sob agitação constante e após 2 horas de agitação o EDTA foi adicionado (0,20g) e volume

completado para 1 litro com solução de PBS. O pH da solução foi acertado para 7,4 - 7,5 utilizando-se HCl 1N ou NaOH 1N e a solução filtrada em membrana de porosidade de 0,22 millipore e conservada sob congelamento.

SOLUÇÃO DE RESAZURIN

Ao frasco de resazurin foi adicionado 10 mL de H₂O MilliQ . Dessa forma, temos uma solução estoque a uma concentração de 597200µM. Foi pipetado 0.7µL dessa e diluído em 9999.3 µL de H₂O MilliQ; para a solução de trabalho a 40 µM; estocada em recipiente fechado, vedado de luz e ar sob refrigeração até 8° C .

4.5 Cultivo celular da Linhagem N-2A

A linhagem celular N2-A (ATCC CCL131) foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro. Para o cultivo, as mesmas foram colocadas em frascos estéreis de crescimento com 75cm² contendo o meio de cultura DMEM enriquecido com 25 mM de hepes. Ao meio de cultura previamente preparado foram adicionados 10%v/v de soro fetal bovino (SFB). As garrafas foram incubadas em estufa a 37°C. O meio foi substituído a cada dois ou três dias, de acordo com a confluência da monocamada celular, que era diariamente observada em microscópio invertido. Os subcultivos eram realizados quando as células apresentavam 100% de confluência para a manutenção da linhagem. As células eram utilizadas para os ensaios quando a confluência atingia em torno de 80%, assim o meio era aspirado e a monocamada lavada com PBS. Após a lavagem para o descolamento da monocamada utilizou-se 4 mL de solução de Tripsina e EDTA (0,20% e 0,02% respectivamente). Posteriormente, as células foram retiradas do frasco, colocadas em tubos Falcon estéreis, completando-se o volume para 10mL com meio DMEM. O tubo contendo as células foram centrifugados e após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuspensão em 1 mL de meio DMEM. Em seguida, foi realizada a contagem das células com Azul de Trypan 0,3% em Câmara de Neubauer. Para manter as células em estoque, periodicamente foi realizado um congelamento. As células (1,0x10⁶ células/mL) foram armazenadas em criotubos de 2 mL contendo 950µL de SFB e 50µL de DMSO. Estes criotubos foram identificados e armazenados no freezer a -80°C por 24 horas. Após este tempo os criotubos foram transferidos para nitrogênio líquido. Para o descongelamento, retirou-se o criotubo do nitrogênio líquido e transferiu-

se todo o conteúdo do criotubo para uma garrafa de 75 cm², contendo meio de cultura suplementado com 10% de SFB.

4.6 Ensaio para Definição da concentração de H₂O₂ utilizada no estudo

Na tentativa de mimetizar um “ambiente de estresse oxidativo” (AEO) em células N2-A, repetimos os procedimentos descritos por *Chang Chi-I e cols. 2014* que estimularam tais células com H₂O₂ 700µM por 7 horas. Porém, não obtivemos sucesso já que as células não se mantiveram viáveis. O mesmo ocorreu quando simulamos o estímulo com H₂O₂ 300µM por 24 horas, usado no estudo de *Tanaka Ken-ichi e cols. 2000* (TANAKA *et al.*, 2000). Dentro desse contexto fizemos uma Curva Dose-Resposta de H₂O₂ pelo Teste de Viabilidade por Resazurina. As N2-A foram estimuladas com concentrações crescentes de H₂O₂: H₂O₂ 2.6%v/v; H₂O₂ 5.25%v/v; H₂O₂ 10,5%v/v; H₂O₂ 21%v/v; H₂O₂ 31,5%v/v; H₂O₂ 35%v/v, por 20 minutos a 37°C e umidade. O ensaio de Resazurina é descrito no item 4.9. Foi realizado teste de quimioluminescência (item 4.10) para as concentrações que apresentaram viabilidade celular dentro dos parâmetros aceitáveis.

4.7 Ensaio para Definição da concentração de RSV utilizada no estudo

Para escolha da concentração do RSV a ser usada em Células da linhagem N2-A fizemos uma Curva Dose-Resposta através do teste de Viabilidade por Resazurina, com concentrações distintas desse polifenol. As células foram estimuladas com concentrações crescentes de RSV a 0,63µM; 1,25µM; 2,5µM; 5µM; 10µM e 20µM, por 24 horas a 37°C e umidade. O ensaio de Resazurina é descrito no item 4.9.

4.8 Tratamentos das células N2-A com RSV

Após a confirmação de que o RSV na concentração avaliada não foi citotóxica para células N2-A em 24 horas de incubação, foram realizados os tratamentos para as análises subseqüentes. As células N2-A foram incubadas a 37°C e umidade de duas maneiras distintas (Pré-estímulo e Pós-estímulo com RSV a 5 µM).

Pré-estímulo: as N2-A foram estimuladas com RSV 5µM por 24 horas e lavadas com Hanks antes de serem expostas ao H₂O₂ 10.5%v/v por 20 minutos.

Pós-estímulo: as N2-A foram expostas ao H₂O₂ 10.5%v/v por 20 minutos, lavadas com Hanks e estimuladas por RSV 5μM por 24 horas.

Subsequentemente, as células foram lavadas em solução de Hanks e usadas nos ensaios (Detalhes nas **Tabela 2** e **Tabela 3** abaixo).

Tabela 2: Disposição dos grupos estimulados com H₂O₂ 60%v/v em Células N2-A

Tubos Silconizados/Placas de 96 ou 6 poços	N2-A	DMEM	H ₂ O ₂ 21%v/v	PBS
Controle(DMEM)	5x10 ³			200μL
RSV 5 μM	5x10 ³			200μL
H ₂ O ₂ 10.5%*v/v	5x10 ³	100μL	100μL	
RSV 5 μM + H ₂ O ₂ 30%*v/v *	5x10 ³	100μL	100μL	

*100μL H₂O₂ 21%v/v +100μL DMEM (estímulo de 20 minutos/37°C e umidade)→ concentração final: H₂O₂ 10%,5v/v

Tabela 3: Disposição dos grupos estimulados com RSV 78.94μM em Células N2-A

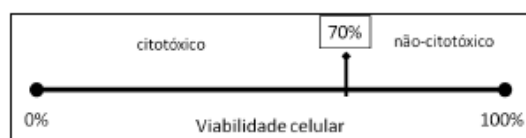
Tubos Silconizados/Placas de 96 ou 6 poços	N2-A	DMEM	RSV 78.94μM
Controle (DMEM)	5x10 ³	200μL	
RSV 5 μM **	5x10 ³	187μL	13μL
H ₂ O ₂ 10.5%*v/v	5x10 ³	200μL	
RSV 5 μM **+ H ₂ O ₂ 30%*v/v	5x10 ³	187μL	13μL

**13μL RSV 78.94μM +187μL DMEM (estímulo por 24 horas/37°C e umidade)→ concentração final: RSV 5μM

4.9 Ensaio de Viabilidade Celular

A viabilidade celular é avaliada em termos de capacidade metabólica das células em converter o indicador redox não fluorescente, resazurina, em um produto altamente fluorescente, resorufin. A redução celular da resazurina ocorre por meio de enzimas metabólicas localizadas nas mitocôndrias, no citosol e nas frações microsossomais (STEINER *et.al.*, 2016). Para a realização do procedimento experimental, as células foram colocadas em placas de cultura celular de 96 poços na concentração de 5x10³ células em cada poço em presença de meio DMEM e 10% de SFB, perfazendo um volume final de 200μL. As placas foram então incubadas em estufa umidificada à 37°C e umidade por 24 horas para a aderência das células e formação da monocamada celular. Decorrido este tempo, o sobrenadante foi retirado, e procedeu-se com os 2

diferentes tipos de tratamentos nas células N2-A (item 4.8) As placas foram então incubadas novamente em estufa umidificada à 37°C e umidade por 24 horas. Decorrido o tempo de incubação, o sobrenadante foi retirado e os poços lavados com PBS. Foi adicionado 100 µL/poço de uma solução contendo 0.125mg/L de resazurina em DMEM e incubadas por 3 h a 37°C. A absorbância foi lida a 570 nm. O cálculo utilizado para avaliar a porcentagem de viabilidade celular foi: absorvância das células tratadas/absorvância do controle (células não-tratadas) x100. Ao controle atribuiu-se 100% de viabilidade (0% de citotoxicidade). Um composto é considerado citotóxico quando a viabilidade celular é menor ou igual a 70%. Sendo assim, os resultados obtidos no teste de resazurina foram comparados.



4.10 Ensaio de Quimioluminescência

Esta técnica baseia-se na reação entre luminol (*5-amino-2,3-dihidro-1,4-phthalozinedione*) e as espécies reativas geradas na ausência ou presença das diferentes concentrações das substâncias, individualmente. As células produzem uma luminosidade natural definida como quimioluminescência nativa ou natural. Contudo, esta luminosidade pode ser amplificada, usando-se reagentes químicos que, ao reagirem com as ERO produzidas, passam a emitir a luminescência amplificada, conforme a reação abaixo (**Figura 9**):

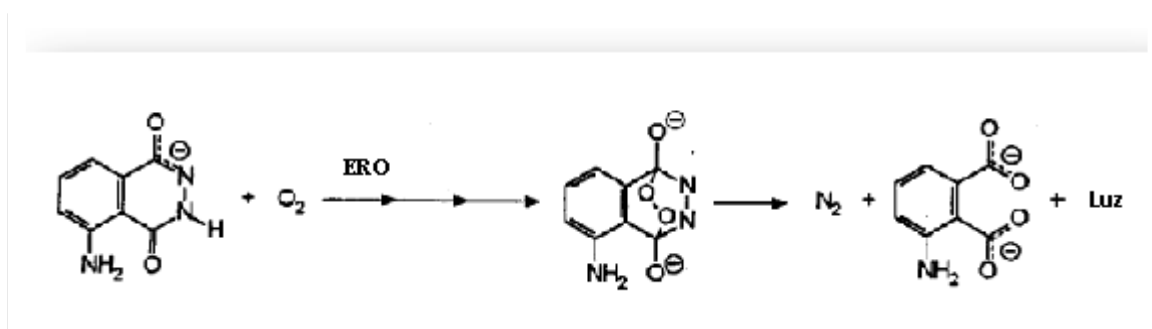


Figura 9. Reação de Quimioluminescência dependente de Luminol. Fonte: Modificada de Aboelenen *et al.*, 1998.

4.10.1 Quimioluminescência em Células N2-A

Um total 5×10^3 células N2-A receberam 2 tipos de tratamentos diferentes com RSV $5 \mu\text{M}$ (Pré e Pós- estímulo), como descrito no item 4.8 (Vide **Tabela 2 e Tabela 3**). Em tubos específicos para Luminômetro, foram, então, colocados os $100 \mu\text{L}$ de células, $10 \mu\text{L}$ de luminol 10^{-4}M e PBS para completar o volume final de $700 \mu\text{L}$. Cada tubo foi colocado no Luminômetro e a leitura foi realizada em corridas de 15 minutos. Após o tempo decorrido, retirava-se o tubo e a fita de papel com os valores de Unidades Relativas de Luz/minuto. (RLU/min.) colocando novo tubo para leitura. O processo foi repetido para todos os tubos. Foi feita, então, a média dos minutos de cada tubo, excluindo os 5 primeiros minutos.

4.10.2 Quimioluminescência com inibidores da via de SIRT1 (EX527) e de AMPk (Dorsomorphin) em Células N2-A

Um total 5×10^3 células N2-A receberam 2 tipos de tratamentos diferentes com RSV $5 \mu\text{M}$ (Pré e Pós- estímulo), como descrito no item 4.8 (Vide **Tabela 2 e Tabela 3**). Em tubos específicos para Luminômetro, foram, então, colocados os $100 \mu\text{L}$ de células, $10 \mu\text{L}$ de luminol 10^{-4}M , $100 \mu\text{L}$ de EX527 a $10 \mu\text{M}$ ou Dorsomorphin a $20 \mu\text{M}$ e PBS para completar o volume final de $700 \mu\text{L}$. Cada tubo foi colocado no Luminômetro e a leitura foi realizada em corridas de 15 minutos. Após o tempo decorrido, retirava-se o tubo e a fita de papel com os valores de RLU/min., colocando novo tubo para leitura. O processo foi repetido para todos os tubos. Foi feita, então, a média dos minutos de cada tubo, excluindo os 5 primeiros minutos.

4.11 Análise Qualitativa de ERO por Microscopia de Fluorescência

Para avaliação da produção de ERO em células da linhagem N-2A foi utilizado o Kit Image-iT™ LIVE Green Reactive Oxygen Species (Invitrogen®) que permite a detecção de ERO intracelular por microscopia de fluorescência. A técnica utiliza um marcador fluorogênico não fluorescente (5-ou-6)-carboxi-2',7', diclorodihidro fluoresceína diacetate (carboxi- H_2DCFDA), que quando quebrado por esterases intracelulares não específicas, gera a molécula carboxy-DCFH que reage com as ERO tornando-se fluorescente. Os ensaios foram feitos após o descolamento das células nas

garrafas com solução de tripsina/EDTA. O delineamento experimental foi realizado conforme ilustrado na **Figura 10**. Para tal, as células (5×10^5 /ensaio) foram ressuspensas em meio DMEM e plaqueadas em placas de 6 poços. As mesmas foram tratadas similarmente (como descrito no item 4.8*). De acordo com o tratamento das amostras, estas foram incubadas com o marcador carboxi- H_2DCFDA ($10 \mu M$) para avaliar a produção de ERO. Estas amostras foram incubadas a $37^\circ C$ e umidade durante 30 minutos, sob o abrigo de luz. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes em solução de PBS (pH 7.4). As imagens de fluorescência foram obtidas para ilustrar a produção de ERO em células da linhagem N2-A; utilizando microscópio (OLYMPUS IX70-SOFTWARE IMAGE PRO PLUS).

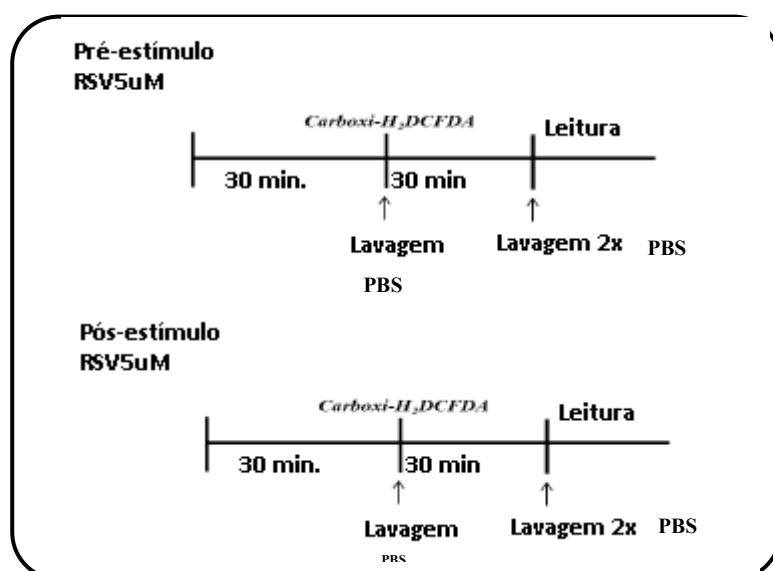


Figura 10: Delineamento experimental dos 2 diferentes Tratamentos: Pré-estímulo e Pós-estímulo com RSV $5 \mu M$.

*Quantidade de células usada: 5×10^5 . Volume: 2mL. Placa usada para o plaqueamento das células: 6 poços; para otimizar a visualização das células N2-A no microscópio de fluorescência.

4.12 Ensaio de MTT em Células N2-A

O teste MTT constitui-se em um modelo para avaliar a capacidade redutora celular, de forma rápida e objetiva, com base em uma reação colorimétrica. A mitocôndria é uma organela de extrema importância neste estudo, pois é a maior fonte de origem de ERO através da cadeia transportadora de elétrons, e o MTT irá reagir com enzimas indicando assim a atividade da cadeia transportadora de elétrons e,

conseqüentemente, a viabilidade da célula. O MTT, quando incubado com células vivas, tem seu substrato quebrado por enzimas mitocondriais denominadas succinato-desidrogenases, transformando um composto amarelo em um composto violeta (Formazan). Assim, quanto mais escura a coloração, ao final da reação, maior é a viabilidade celular e a atividade da cadeia respiratória (MOSMANN, 1983). As células foram colocadas em placas de cultura celular de 96 poços na concentração de 5×10^3 células/poço, e um volume final de 200 μ L de células e DMEM e 10% de SFB. Foram incubadas em estufa umidificada a 37°C por 24 horas para aderência. Após essas 24 horas, as N2-A receberam 2 diferentes tipos de tratamentos (como especificado no item 4.8). Após esse tempo, o sobrenadante foi retirado e os poços lavados com PBS. Acrescentou-se 190 μ L de DMEM e 10 μ L da solução de MTT aos poços e a placa foi colocada mais uma vez em estufa a 37°C por 1 hora. Em seguida, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 100 μ L de DMSO homogeneizando para dissolução dos cristais de formazan gerados. A absorbância foi lida a 570nm no leitor de microplacas. O cálculo utilizado para avaliar a porcentagem da capacidade redutora celular foi: $\frac{\text{absorbância das células tratadas}}{\text{absorbância do controle (células não-tratadas)}} \times 100$. Foi realizado um controle com DMSO para cada tempo analisado para avaliar a viabilidade das células expostas somente a este composto e não foi observada nenhuma diferença significativa (resultados não mostrados).

4.13 Produção de NO pela “*Reação de Griess*” em Células N2-A

Foi avaliada a quantificação de nitrito segundo reação de Griess (GRIESS, 1864) para observar a produção de NO por Células N2-A no qual segue o seguinte protocolo: As células foram colocadas em placas de cultura celular de 96 poços na concentração de 5×10^3 células para cada poço, e um volume final de 200 μ L de células e meio de cultura DMEM+SFB. Foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas para aderência. Após estas 24 horas receberam os tratamentos com RSV (vide item 4.8). Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e utilizado para dosagem do nitrito. O *pellet* foi resuspenso em 200 μ L de DMEM pH 7,4 e imediatamente, submetido à análise de viabilidade celular. Para dosagem do nitrito, foi utilizado 100 μ L de sobrenadante, que foram dispostos em placas de 96 poços. Aos sobrenadantes, foram adicionados 100 μ L de solução de Griess, que é formada de sulfanilamina 1% em 2,5% de ácido fosfórico e naitilenodiamina 0,1% em 25% de ácido fosfórico, na proporção

1:1. O conteúdo da placa foi analisado por leitor de microplacas, no comprimento de onda 540nm. A concentração de nitrito foi calculada por regressão linear, utilizando a curva padrão obtida a partir de uma solução de nitrito de sódio 1 mM e meio de cultura DMEM.

4.14 Produção de ONOO⁻ em Células N-2A

A quantificação de ONOO⁻ foi avaliada de acordo com a técnica de *Hughes & Nicklin, 1996*. Para observar a produção desse oxidante por N2-A usando o seguinte protocolo: as células foram plaqueadas em placas de cultura de 6 poços a 5×10^5 células perfazendo um volume final de 2 ml de meio de cultura DMEM+SFB. Incubadas em estufa úmida a 37 °C e umidade por 24 horas. Após esse tempo, o sobrenadante foi removido e exposto aos tratamentos descritos similarmente no item 4.8*. A placa foi novamente incubada a 37°C e umidade por 16 horas. Após este período de incubação, o sobrenadante foi descartado e 2 mL de H₂O MilliQ foram adicionados aos pellets de células e agitados em vórtex por 1 minuto. Tal conteúdo foi medido e quantificado em um espectrômetro de placa no comprimento de onda de 302 nm.

*Quantidade de células usada: 5×10^5 . Volume: 2mL. Placa usada para o plaqueamento das células: 6 poços; para otimizar a visualização das células N2-A no microscópio de fluorescência.

4.15 Avaliação da atividade da CAT em Células N2-A

As células foram transferidas para placas de cultura celular de 96 poços na concentração de 5×10^3 células para cada poço, e um volume final de 200 µL de células e meio de cultura DMEM (acrescido de 10% de SFB e enriquecido com hepes). Foram incubadas em estufa umidificada a 37°C por 24 horas para aderência. Após essas 24 horas, o sobrenadante foi retirado e procedemos com os tratamentos como especificado no item 4.8. Após os mesmos, o sobrenadante foi coletado e procedeu-se com os procedimentos descritos no Kit específico usado para a dosagem da atividade da catalase.

EnzyChrom™ Catalase Assay Kit (ECAT-100) – Bioassay systems:

Os cálculos foram realizados através da análise do *slope* da curva e regressão linear.

4.16 Avaliação da atividade da SOD em Células N2-A

As células foram colocadas em placas de cultura celular de 96 poços na concentração de 5×10^3 células para cada poço, e um volume final de 200 μ L de células e meio de cultura DMEM (acrescido de 10% de SFB e enriquecido com hepes). Foram incubadas em estufa umidificada a 37°C por 24 horas para aderência. Após essas 24 horas, o sobrenadante foi retirado e procedemos com os tratamentos como especificado no item 4.8. Após os mesmos, o sobrenadante foi coletado e procedeu-se com os procedimentos descritos no Kit específico usado para a dosagem da atividade da superóxido dismutase.

EnzyChrom™ Superoxide dismutase Assay Kit (ESOD-100) – Bioassay systems

Os cálculos foram realizados através da análise do *slope* da curva e regressão linear.

4.17 Avaliação da atividade de IL-10 em Células N2-A

As células foram colocadas em placas de cultura celular de 96 poços na concentração de 5×10^3 células para cada poço, e um volume final de 200 μ L de células e meio de cultura DMEM (acrescido de 10% de SFB e enriquecido com hepes). Foram incubadas em estufa umidificada a 37°C por 24 horas para aderência. Após essas 24 horas, o sobrenadante foi retirado e procedemos com os tratamentos como especificado no item 4.8. Após os mesmos, o sobrenadante foi coletado e procedeu-se com os procedimentos descritos no Kit específico usado para a dosagem da atividade de IL-10.

Human IL-10 Uncoated ELISA- Thermo Fisher Scientific

As amostras foram lidas a 450nm e 570 nm. Os cálculos foram realizados através da análise do *slope* da curva e regressão linear.

4.18 Avaliação da atividade de IL-6 em Células N2-A

As células foram colocadas em placas de cultura celular de 96 poços na concentração de 5×10^3 células para cada poço, e um volume final de 200 μ L de células e meio de cultura DMEM (acrescido de 10% de SFB e enriquecido com hepes). Foram incubadas em estufa umidificada a 37°C por 24 horas para aderência. Após essas 24 horas, o sobrenadante foi retirado e procedemos com os tratamentos como

especificado no item 4.8. Após os mesmos, o sobrenadante foi coletado e procedeu-se com os procedimentos descritos no Kit específico usado para a dosagem da atividade de IL-6.

Human IL-6 Uncoated ELISA- Thermo Fisher Scientific

As amostras foram lidas a 450nm e 570 nm. Os cálculos foram realizados através da análise do *slope* da curva e regressão linear.

4.19 Avaliação da atividade de TNF- α em Células N2-A

As células foram colocadas em placas de cultura celular de 96 poços na concentração de 5×10^3 células para cada poço, e um volume final de 200 μ L de células e meio de cultura DMEM (acrescido de 10% de SFB e enriquecido com hepes). Foram incubadas em estufa umidificada a 37°C por 24 horas para aderência. Após essas 24 horas, o sobrenadante foi retirado e procedemos com os tratamentos como especificado no item 4.8. Após os mesmos, o sobrenadante foi coletado e procedeu-se com os procedimentos descritos no Kit específico usado para a dosagem da atividade de TNF- α .

Human TNF- α Uncoated ELISA- Thermo Fisher Scientific

As amostras foram lidas a 450nm e 570 nm. Os cálculos foram realizados através da análise do *slope* da curva e regressão linear.

4.20 Análise estatística

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

Resultados

5 Resultados

5.1 PADRONIZAÇÃO ATRAVÉS DE CURVA CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA DA CONCENTRAÇÃO DE H₂O₂ UTILIZADA EM CÉLULAS N2-A

O tratamento com H₂O₂ é usado com a finalidade de causar EO em células em cultura, prejudicando a sua proliferação. Esse oxidante interage com metais no meio, produzindo radicais hidroxila que induzem neurotoxicidade. (CHANG-CHI *et al.*, 2014; MIRA

et.al., 2015). As N2-A foram estimuladas com concentrações crescentes de H_2O_2 . Obtivemos a partir dessa diluição do H_2O_2 os resultados apresentados na **Figura 11**.

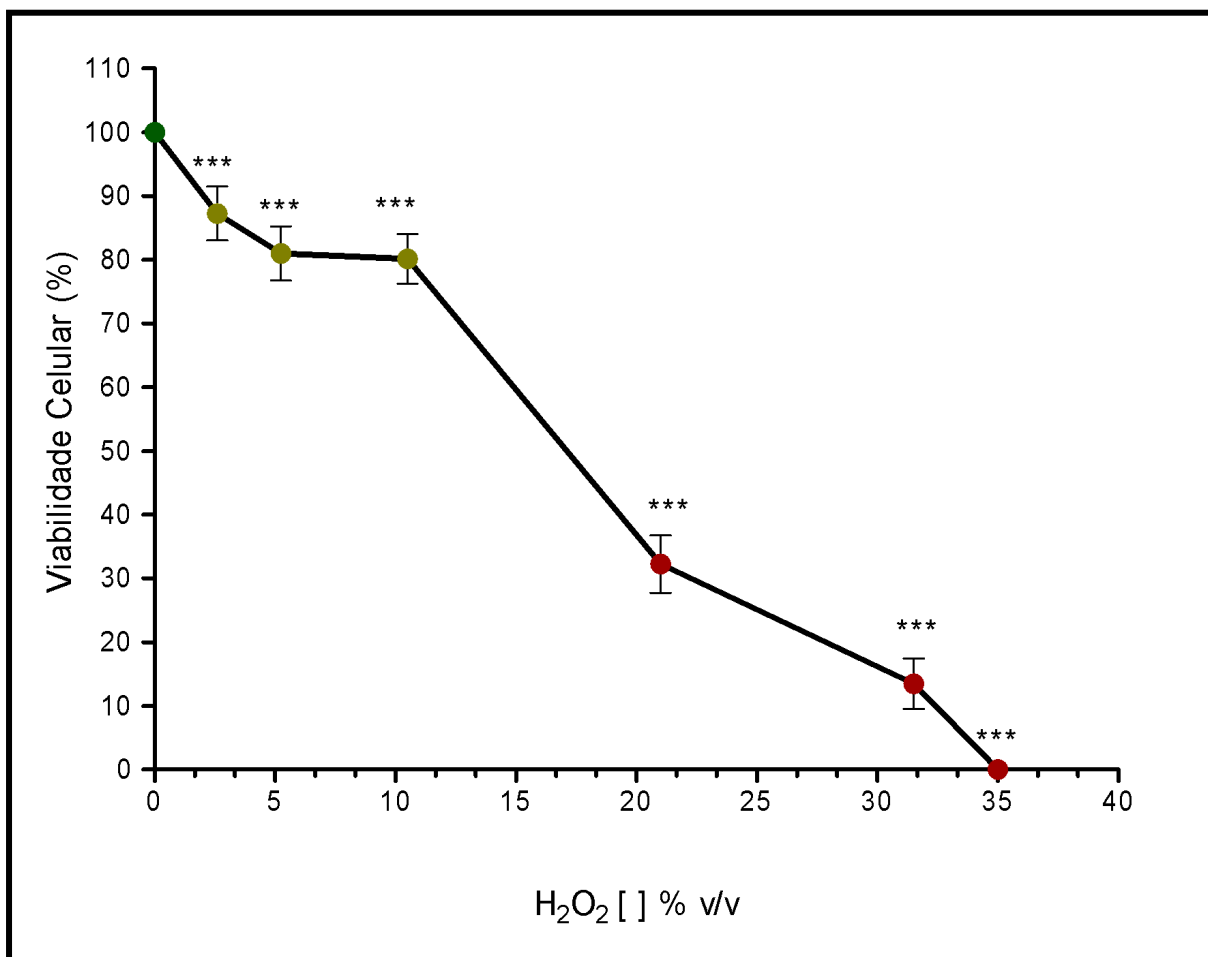


Figura 11: Curva Concentração-Resposta de H_2O_2 em Células N2-A. As células N2-A foram estimuladas por concentrações crescentes de H_2O_2 por 20 minutos (0.0%; 2.6% v/v ; 5.2% v/v; 10.5%v/v; 21%v/v; 31.5%v/v; 35%v/v;) e a viabilidade das mesmas foi testada através do teste de Resazurina, que para ser considerado viável deve apresentar pelo menos 70% de células vivas. Os ensaios foram realizados em sextuplicata para cada concentração.

Pela análise da **Figura 11** acima, torna-se claro que a partir da concentração de H_2O_2 21%v/v e as subsequentes, as células N2-A não se mantiveram dentro do limite aceitável de viabilidade para procedência de ensaios celulares.

5.1.1 AVALIAÇÃO POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA DA PRODUÇÃO DE ERO INDUZIDA POR H_2O_2 EM CÉLULAS DA LINHAGEM N2-A

As células N2-A foram estimuladas com as três concentrações de H_2O_2 nas quais as mesmas se mantiveram viáveis, e, posteriormente, expostas ao ensaio de

quimioluminescência dependente de luminol; para avaliação da produção de ERO. Obtivemos assim os resultados apresentados na **Figura 12**.

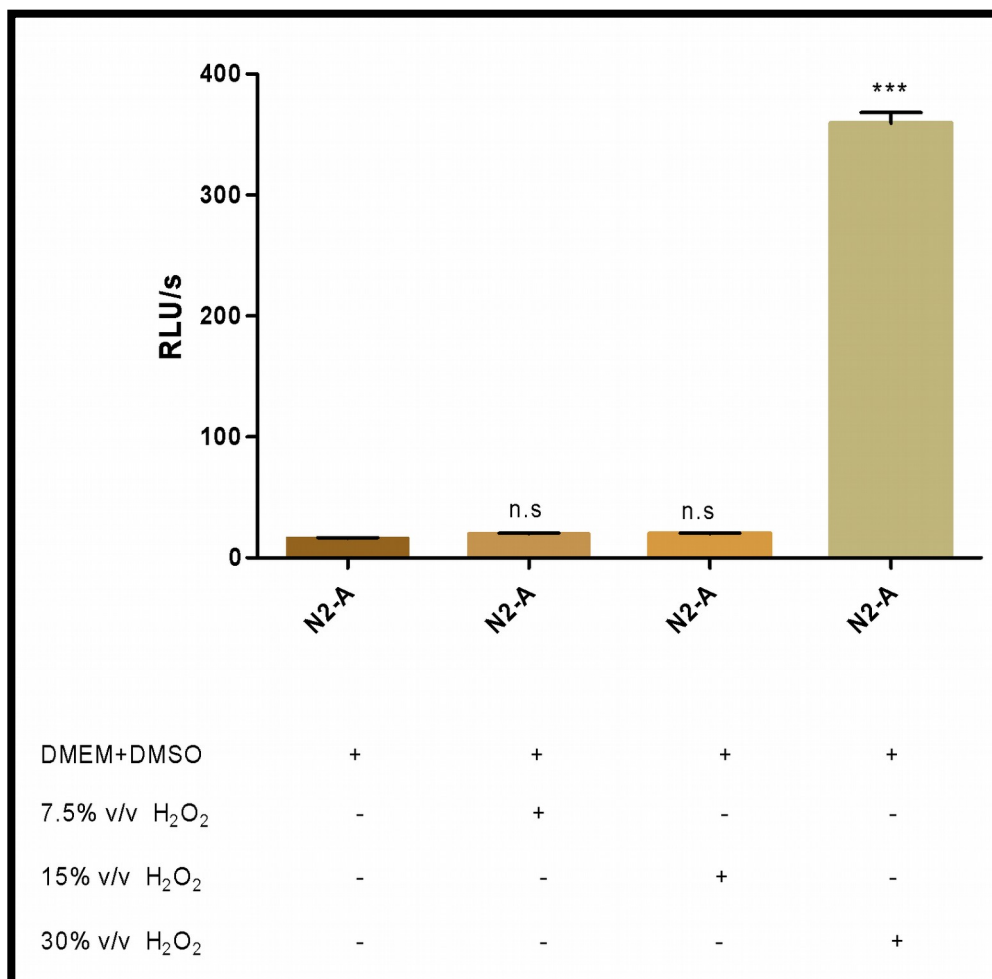


Figura 12: Avaliação da produção de ERO induzida pelo H₂O₂. A geração de ERO foi expressa em RLU/min durante 15 minutos; *** = $p < 0,0001$; = resultado significativo pela análise de ANOVA seguido pelo teste de Dunn's.

Os resultados ilustrados pelas **Figura 11 e Figura 12** corroboram a escolha de H₂O₂ 10.5% v/v como dose de estímulo para as células N2-A, já que aumenta a produção de ERO; mimetizando dessa forma um AEO, e as células permaneceram viáveis (80.12%).

5.2 PADRONIZAÇÃO ATRAVÉS DE CURVA CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA DA CONCENTRAÇÃO DE RSV UTILIZADA EM CÉLULAS N2-A

As N2-A foram estimuladas com concentrações crescentes de RSV. Os resultados encontrados estão expostos na **Figura 13**.

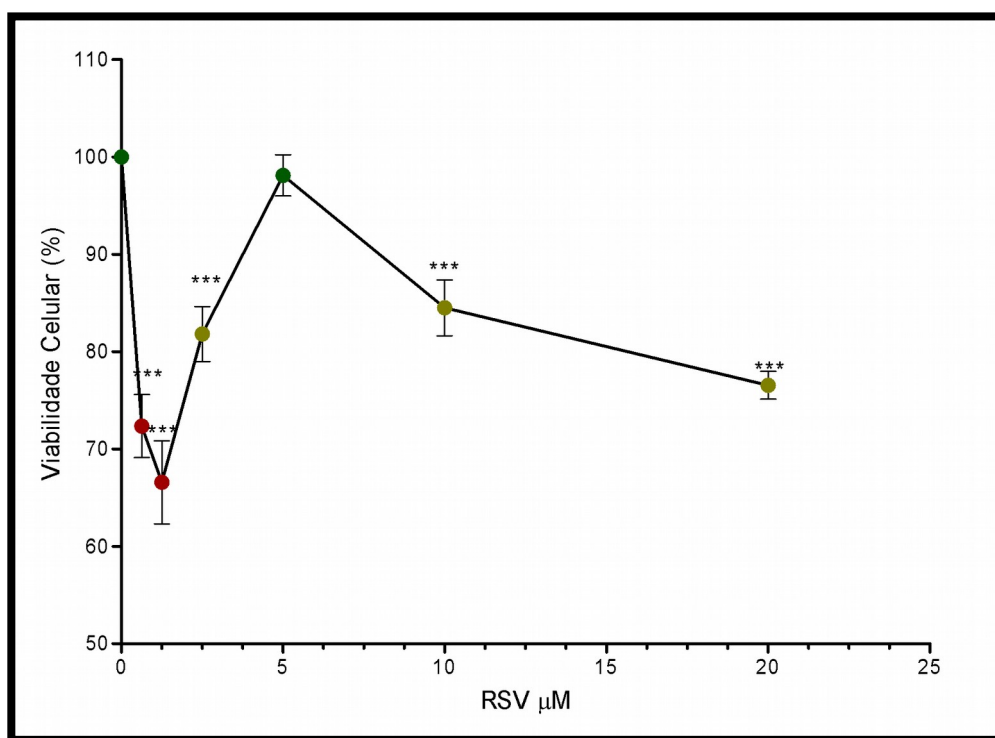


Figura 13: Curva Concentração-Resposta de RSV em Células N2-A. As células N2-A foram estimuladas por concentrações crescentes de RSV (0,63µM; 1,25µM; 2,5µM; 5µM; 10µM e 20µM) e a absorvância, a fim de se verificar o estímulo do RSV nas células foi medida por mudança da intensidade da coloração à 570 nm em Leitor de microplacas através do Teste de Resazurin. A concentração escolhida foi 5µM que apresentou maior viabilidade celular. Os ensaios foram realizados em 10 repetições para cada concentração.

Pelos resultados ilustrados na **Figura 13** acima, percebemos que a concentração do RSV na qual encontramos o melhor índice de viabilidade celular, foi a de 5µM. Sendo esta, a concentração de escolha para os ensaios desenvolvidos nas células N2-A.

5.3 VIABILIDADE DAS CÉLULAS N2-A EXPOSTAS AO RSV 5µM COMO: PRÉ E PÓS-ESTIMULO, E AO H₂O₂ 10.5%v/v

A fim de mensurar a viabilidade das células N2-A frente aos estímulos padronizados: RSV 5µM e H₂O₂ 10.5%v/v, procedemos com o teste colorimétrico de Resazurina. Os resultados obtidos são ilustrados na **Figura 14** abaixo.

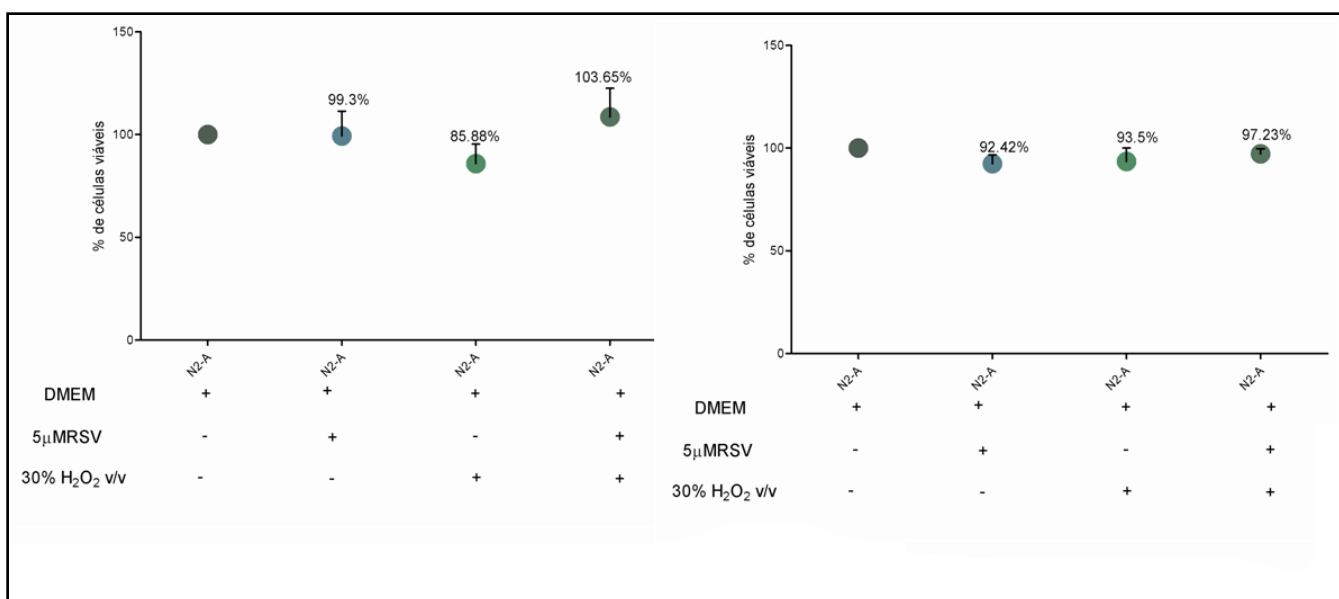


Figura 14: Avaliação da viabilidade das N2-A expostas ao Pré e Pós-estímulo com RSV5µM e H₂O₂30%v/v. Painel A= Pré-estímulo Painel B= Pós-estímulo. A viabilidade celular foi expressa em % de células vivas. Não há diferença significativa entre os grupos. ANOVA teste, pós-teste de Bonferroni's Multiple Comparasion.

O teste de viabilidade celular pelo método colorimétrico de Resazurina provou que nas duas situações: **Pré-estímulo com RSV (Painel A)** e **Pós-estímulo com RSV (Painel B)**, as N2-A mantiveram-se dentro dos parâmetros exigidos de viabilidade celular. Ou seja, permaneceram em valores acima de 80% de células viáveis para todos os grupos avaliados.

5.4 AVALIAÇÃO COMPARATIVA POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA DEPENDENTE DE LUMINOL DO EFEITO DO RSV COMO: PRÉ E PÓS-ESTÍMULO NA PRODUÇÃO DE ERO EM CÉLULAS N2-A INDUZIDA POR H₂O₂

Diante da certificação de que H₂O₂ 10.5% v/v promove um AEO nas células N2-A mantendo a viabilidade das mesmas, e de que o RSV5µM seria nossa concentração de escolha; estimulamos as células N2-A com o polifenol de 2 formas diferentes (Pré-estímulo e Pós-estímulo). Seguem abaixo os resultados obtidos na **Figura 15**.

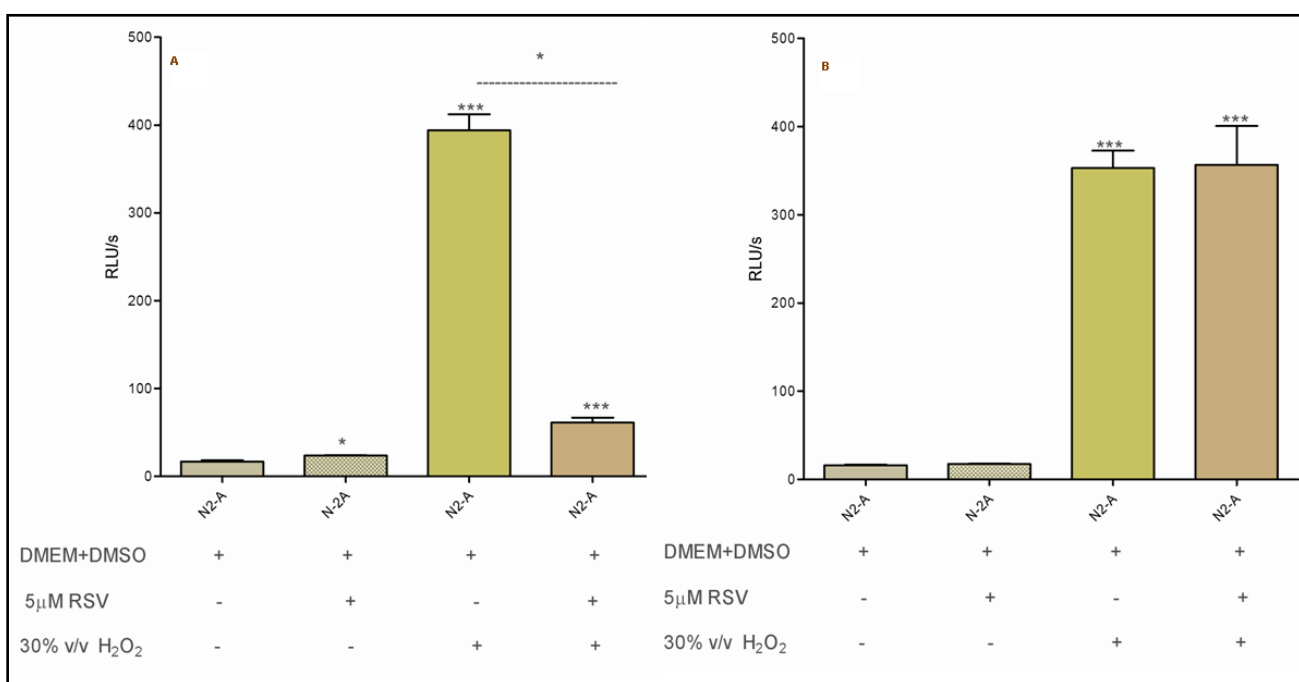


Figura 15: Avaliação comparativa do efeito do RSV na produção de ERO em N2-A induzida por H₂O₂. Painel A= Pré-estímulo Painel B= Pós-estímulo. A geração de ERO foi expressa em RLU/min. *p <0.01; ***p <0.0001 significativo por ANOVA-Kruskal-Wallis teste, pós-teste de Dunn's Multiple Comparasion.

Quando as N2-A foram **Pré-estimuladas com RSV 5μM**, situação que pode ser ilustrada pela observação do *Painel A*, percebemos que: quando essas células são expostas isoladamente ao H₂O₂, há um aumento de quase 25 vezes na produção de ERO em relação ao grupo sem nenhum estímulo. Porém, o fomento precoce com o RSV 5 μM anteriormente à exposição ao H₂O₂ fez com que essa geração de ERO diminuísse em mais de 6 vezes, permanecendo ainda, 3 vezes acima da produção basal. Entretanto, quando as N2-A foram primeiramente estimuladas com H₂O₂, ou seja, **Pós-estímulo com RSV 5μM (Painel B)**, percebemos que a exposição tardia ao RSV não foi capaz de diminuir a produção aumentada de ERO causada pelo oxidante em questão.

5.5 AVALIAÇÃO COMPARATIVA QUALITATIVA POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DO EFEITO DO RSV COMO: PRÉ E PÓS-ESTÍMULO NA PRODUÇÃO DE ROS EM CÉLULAS N2-A INDUZIDA POR H₂O₂

Com o intuito de qualificar e visualizar a produção de ERO pelas N2-A estimulamos as células sob condições de: Pré e Pós-estímulo com RSV. Os resultados estão expostos nas **Figura 16 e Figura 17.**

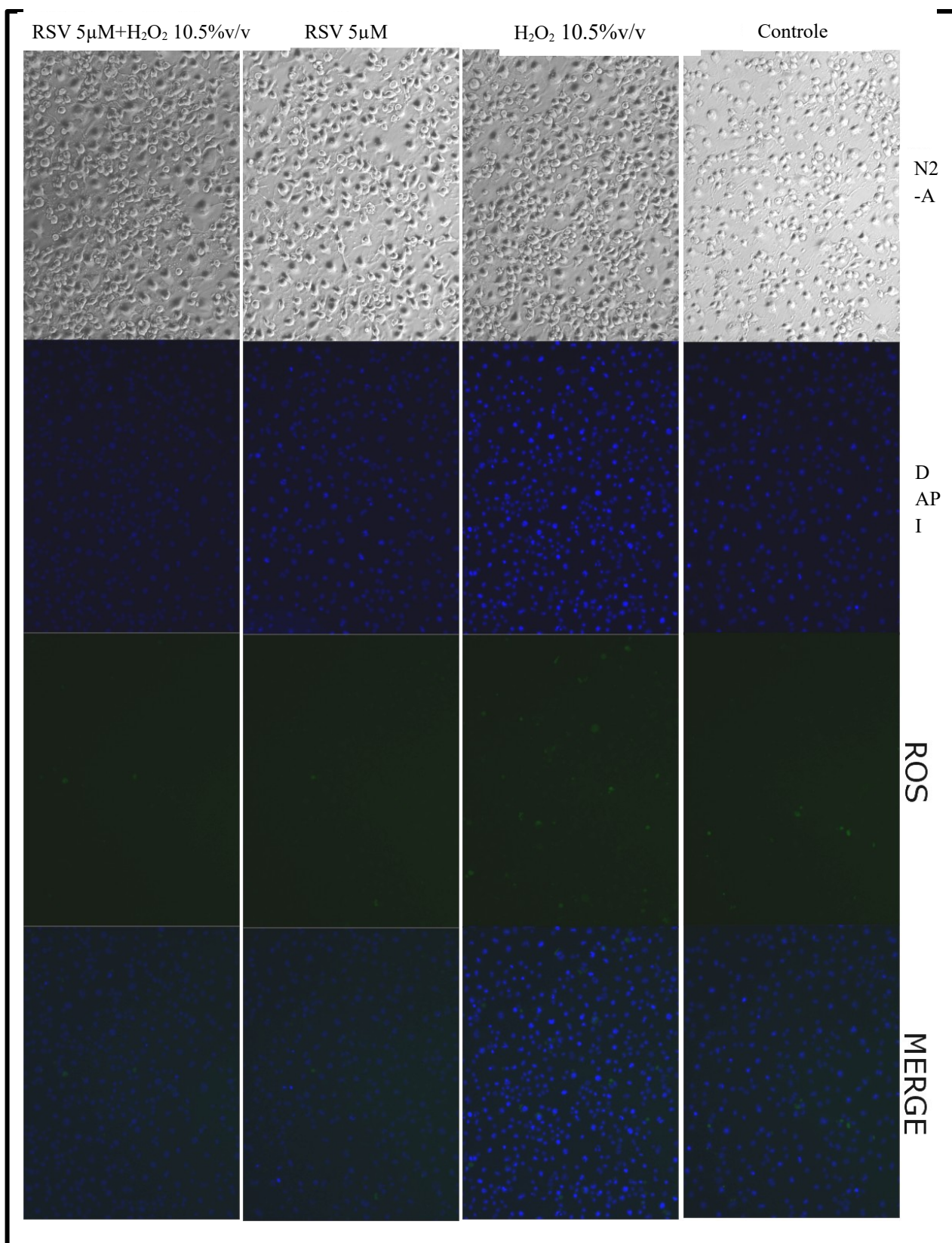


Figura 16: Representação qualitativa da produção de ERO em células N2-A Pré-estimuladas com RSV. As amostras foram marcadas com Carboxi- H₂DCFDA e visualizadas através de microscopia de fluorescência.

RSV 5 μ M+H₂O₂ 10.5%v/vH₂O₂ 10.5%v/vM
ER
GE

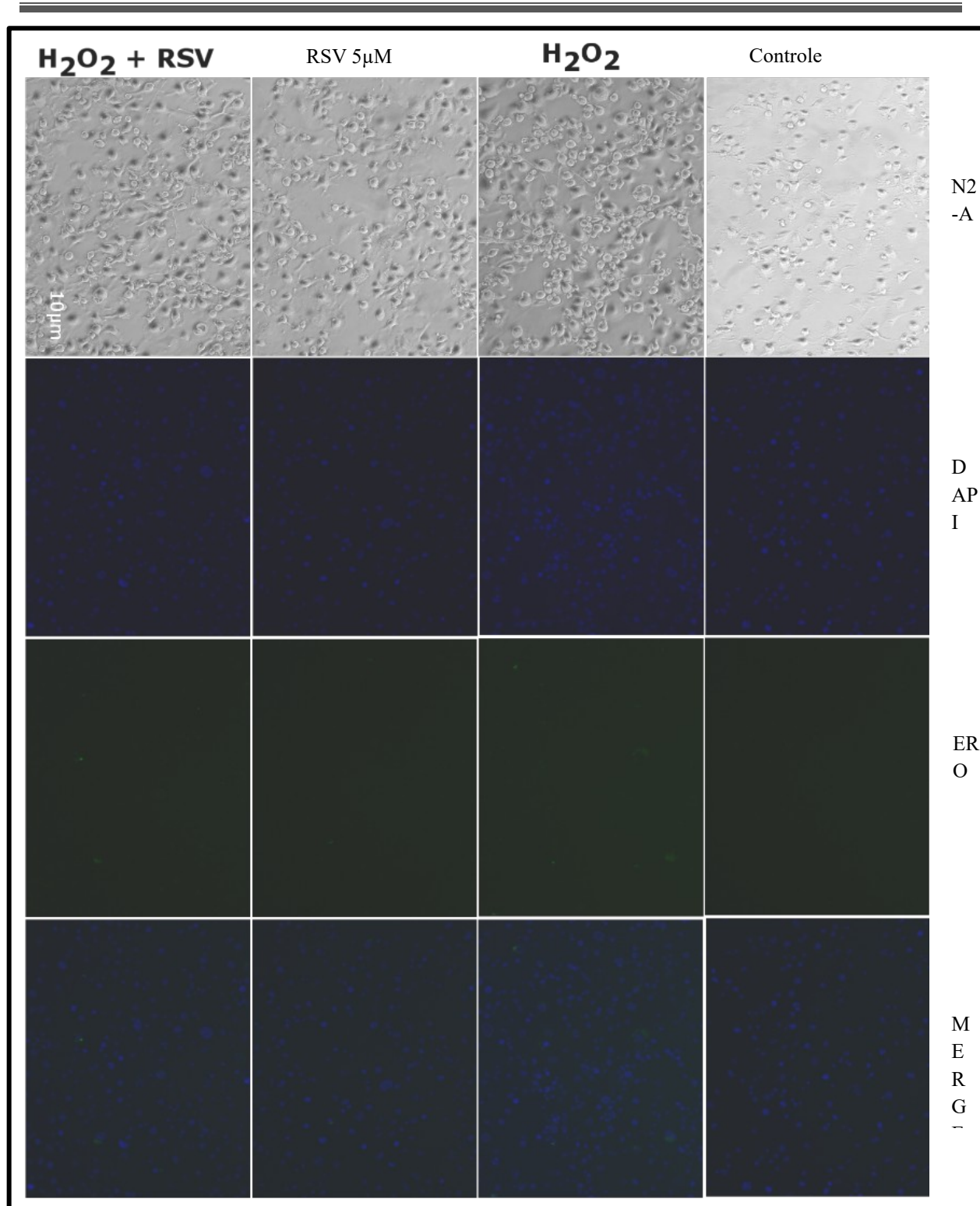


Figura 17: Representação qualitativa da produção de ERO em células N2-A Pós-estimuladas com RSV. As amostras foram marcadas com Carboxi- H_2DCFDA e visualizadas através de microscopia de fluorescência.

A análise das **Figuras 16 e 17** ilustram os resultados da quimioluminescência apresentados na Figura 15. O DAPI é um fluorocromo para marcação nuclear do DNA celular. O RSV foi capaz de diminuir a geração de ERO gerada por H_2O_2 , no caso do Pré-estímulo

com esse polifenol (**Figura 16**). O perfil de produção de ERO no caso do Pós-estímulo é praticamente o mesmo no grupo de N2-A estimuladas isoladamente com o H₂O₂ e deste em associação com RSV (**Figura 17**)

5.6 AVALIAÇÃO COMPARATIVA PELO MÉTODO DE *GRIESS* DO EFEITO DO RSV COMO: PRÉ E PÓS-ESTÍMULO NA PRODUÇÃO DE NO EM CÉLULAS N2-A INDUZIDA POR H₂O₂

Com o propósito de quantificar a produção de NO, outro importante componente do estresse oxidativo/envelhecimento juntamente com as ROS, estimulamos as Células N2-A novamente sob condições de: Pré e Pós-estímulo com RSV. Os resultados estão expostos na **Figura 18**.

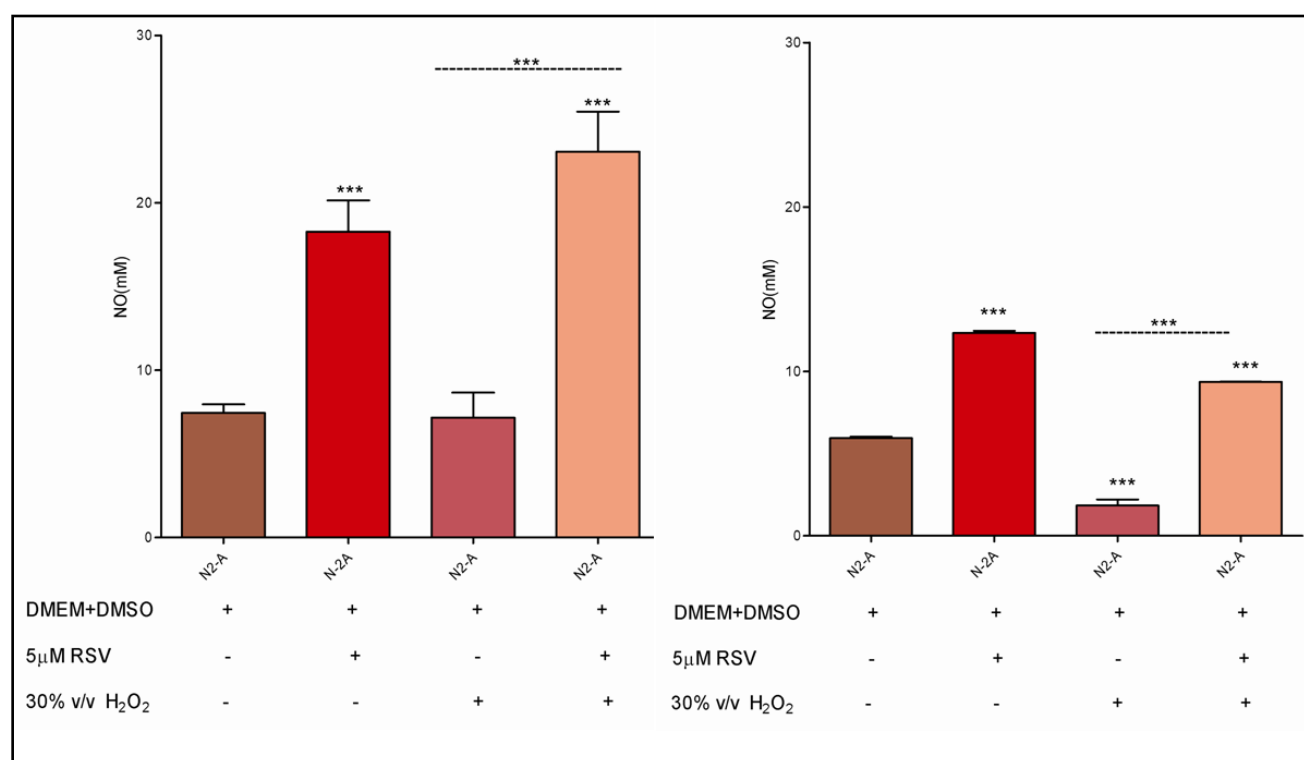


Figura 18: Avaliação comparativa do efeito do RSV na produção de NO em N2-A. Painel A= Pré-estímulo Painel B= Pós-estímulo. A geração de NO foi expressa em mM. ***p<0.0001 significativo por ANOVA teste, pós-teste de Bonferroni's Multiple Comparasion.

Analisando o Painel A, Pré-estímulo com RSV 5µM, e o Painel B, Pós-estímulo com RSV 5µM, percebe-se que nas duas situações, as células N2-A impelidas isoladamente com RSV geram um aumento da quantidade de NO, se comparadas às mesmas N2-A sem nenhum

estímulo. O mesmo perfil é observado para ambas às ocasiões, quando avaliamos que tanto o Pré quanto o Pós-estímulo com RSV antecedente ou consecutivo à exposição ao H_2O_2 foi capaz de aumentar a produção de NO comparada às N2-A em estado basal e também, em confrontação ao fomento isolado com o oxidante. É importante perceber que a elevação de NO quando as células são incitadas pelo RSV+ H_2O_2 em relação ao estado basal é de 3.097 vezes no Pré-estímulo, e, de 1.57 vezes no Pós-estímulo. Já em contraposição àquelas expostas somente ao H_2O_2 , o acréscimo é de 3.21 vezes para o Pré-estímulo e de 5.06 vezes no Pós-estímulo.

5.7 AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO EFEITO DO RSV COMO: PRÉ E PÓS-ESTÍMULO NA PRODUÇÃO DE $ONOO^-$ EM CÉLULAS N2-A INDUZIDA POR H_2O_2

Com a finalidade de mensurar a produção de $ONOO^-$, potente oxidante, incitamos as Células N2-A mais uma vez sob condições de: Pré e Pós-estímulo com RSV. Os resultados foram ilustrados na **Figura 19**.

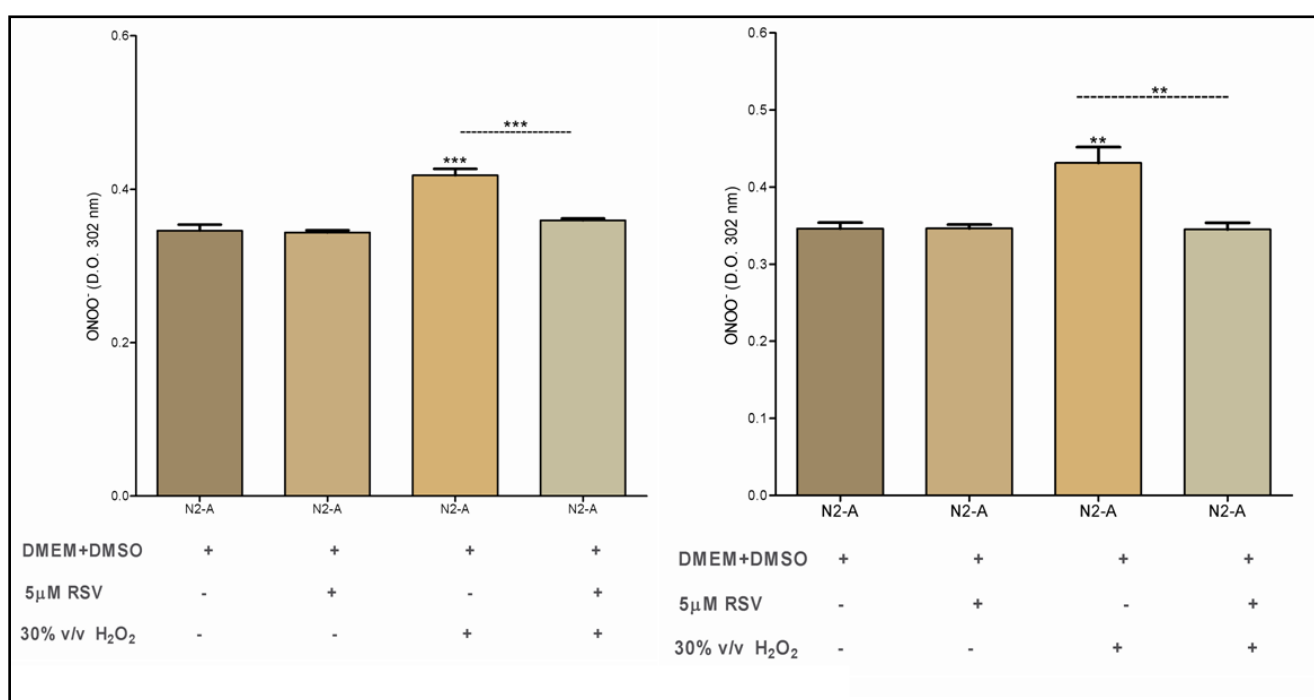


Figura 19: Avaliação comparativa do efeito do RSV na produção de $ONOO^-$ em N2-A. Painel A= Pré-estímulo Painel B= Pós-estímulo. A geração de $ONOO^-$ foi expressa em D.O.(Densidade Óptica). *** $p < 0.0001$ significativo por ANOVA teste, pós-teste de Bonferroni's Multiple Comparasion.

Observando a Figura 19 acima, percebemos exatamente o mesmo delineamento de resultados tanto para o **Pré-estímulo**, Painel A, quanto para o **Pós-estímulo**, Painel B. O

principal é que as N2-A que receberam ambos os fomentos (RSV e H₂O₂) conseguiram diminuir a produção de ONOO⁻ que havia sido aumentada pela exposição ao H₂O₂ quando isolado. Entretanto, podemos também observar um maior grau de significância da atuação do RSV sobre a formação do H₂O₂ na condição de Pré-estímulo.

5.8 AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO EFEITO DO RSV COMO: PRÉ E PÓS-ESTÍMULO NA CAPACIDADE REDUTORA DAS CÉLULAS N2-A

Avaliamos a influência do RSV sobre a capacidade redutora celular, expondo as N2-A sob condições de: Pré e Pós-estímulo com o RSV 5μM. Os resultados foram representados na **Figura 20**.

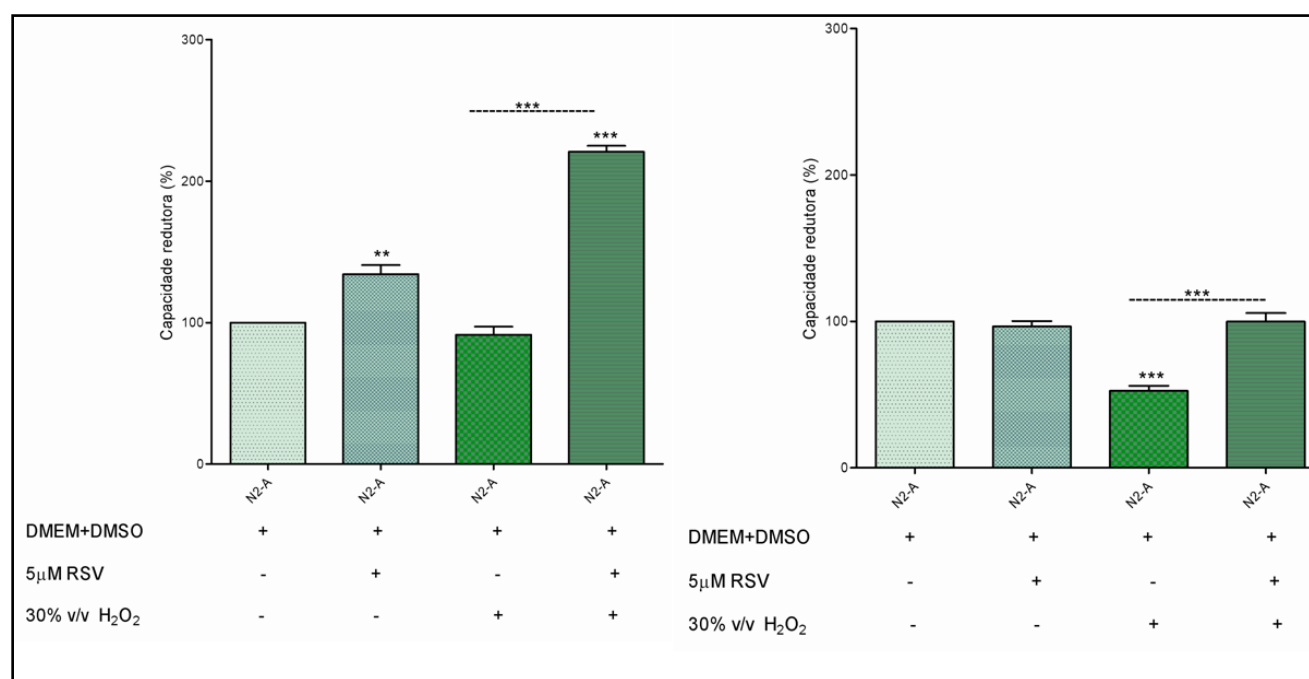


Figura 20: Avaliação comparativa do efeito do RSV na capacidade redutora das N2-A. Painel A= Pré-estímulo Painel B= Pós-estímulo. A capacidade redutora celular foi expressa em %. **p<0.001;***p<0.0001 significativo por ANOVA-Kruskal-Wallis teste, pós-teste de Dunn's Multiple Comparasion.

Analisando a figura acima, observa-se que nos dois cenários, **Pré-estímulo (Painel A)** e **Pós-estímulo (Painel B)**, o RSV, pré ou pós-incubado ao H₂O₂, foi capaz de aumentar a capacidade redutora celular das N2-A, no âmbito de mapeamento da atuação da NADPH, em relação ao fomento isolado com o mesmo H₂O₂. Esse acréscimo da vocação antioxidante mencionado foi de 2.41 vezes na situação de Pré-estímulo, e de 1.90 vezes no caso do Pós-estímulo. Observamos também, que apenas na condição de Pré-estímulo, obtivemos o

aumento da capacidade redutora celular das N2-A quando estimuladas isoladamente pelo RSV. (Painel A).

5.9 AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO EFEITO DO RSV COMO: PRÉ E PÓS-ESTÍMULO SOBRE A ATIVIDADE DA CAT EM CÉLULAS N2-A

Para avaliar a interferência do RSV sobre a atividade da CAT em N2-A, estimulamos as sobre a forma de: Pré e Pós-estímulo com o RSV 5 μ M. Os resultados foram expressos na **Figura 21**.

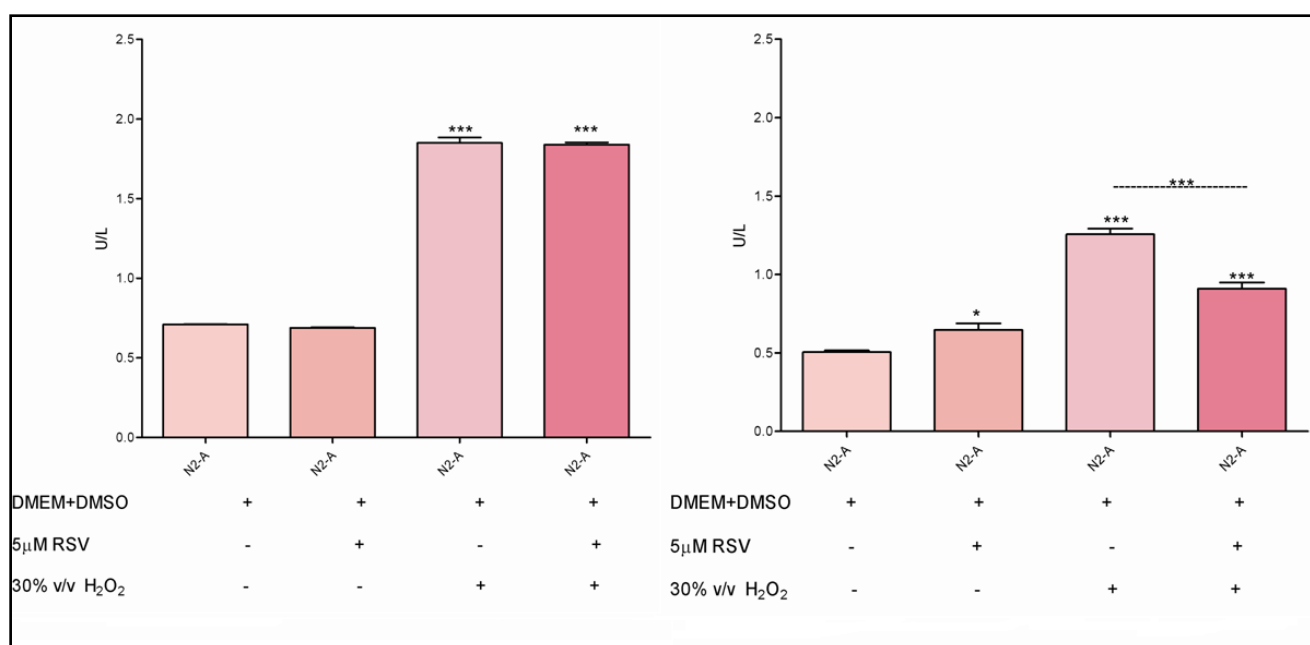


Figura 21: Avaliação comparativa do efeito do RSV na atividade da CAT em N2-A. Painel A= Pré-estímulo Painel B= Pós-estímulo. A atividade foi medida em U/L (Unidade de massa atômica/litro). * $p < 0.01$ *** $p < 0.0001$ significativo por ANOVA teste, pós-teste de Bonferroni's Multiple Comparasion.

Os resultados expressos na **Figura 21** acima demonstram que, a atividade da CAT foi aumentada quando as células N2-A foram estimuladas separadamente por H₂O₂ tanto no **Pré-estímulo (Painel A)**, quanto no **Pós-estímulo (Painel B)**; confirmando que as mesmas realmente se encontravam acometidas pelos efeitos do EO. Quando tais células foram incitadas também pelo RSV antecedente ou consecutivo ao H₂O₂, esse polifenol não conseguiu ativar a CAT além do estímulo que havia sido causada pelo oxidante no âmbito do Pré-estímulo, e ainda, a quantificação da enzima diminuiu no Pós-estímulo.

5.10 AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO EFEITO DO RSV COMO: PRÉ E PÓS-ESTÍMULO SOBRE A ATIVIDADE DA SOD EM CÉLULAS N2-A

Para avaliar a interferência do RSV sobre a atividade da SOD em N2-A, estimulamos sobre a forma de: Pré e Pós-estímulo com o RSV 5 μ M. Os resultados foram expressos na **Figura 22**.

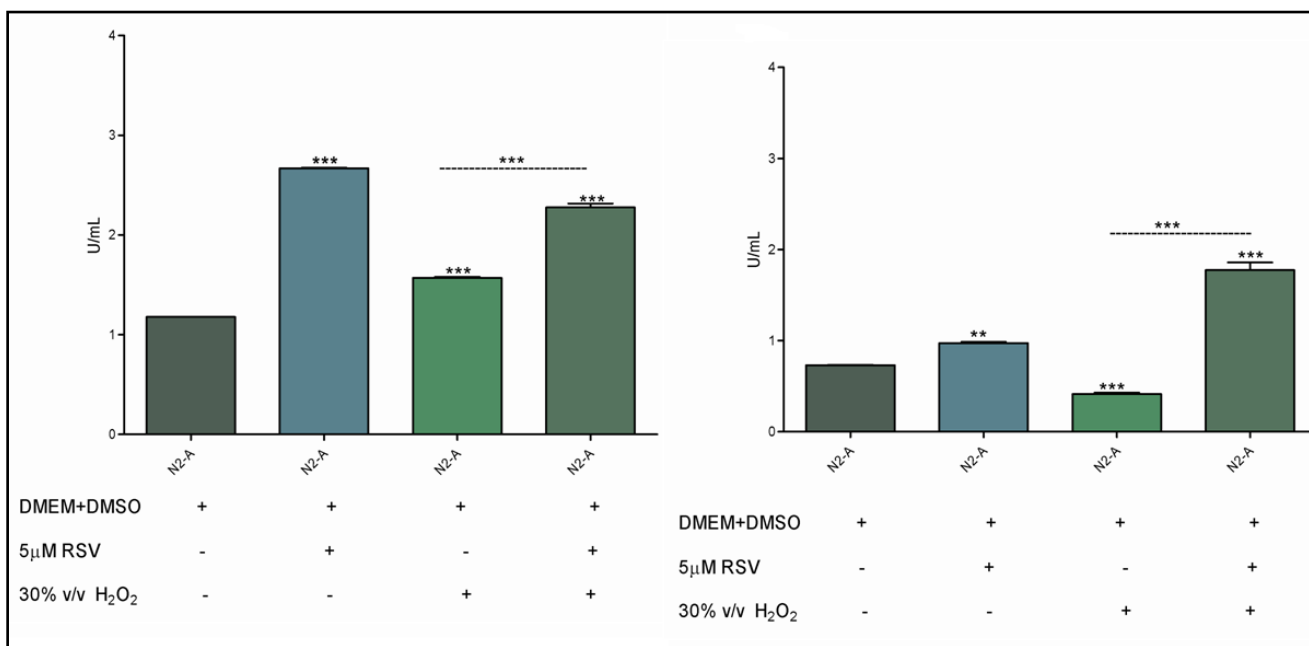


Figura 22: Avaliação comparativa do efeito do RSV na atividade da SOD em N2-A. Painel A= Pré-estímulo Painel B= Pós-estímulo. A atividade foi medida em U/L (Unidade de massa atômica/litro). **p<0.001***p<0.0001 significativo por ANOVA teste, pós-teste de Bonferroni's Multiple Comparasion.

Analisando a figura acima, é possível perceber o mesmo perfil de atuação do RSV em intensidades diferentes, nos dois cenários, **Pré-estímulo (Painel A)** e **Pós-estímulo (Painel B)**. O RSV isoladamente, e em antecedência ou consecutivo ao H₂O₂ foi capaz de aumentar a atividade da SOD nas N2-A, em relação às células em estado basal. O H₂O₂ diminuiu a atividade enzimática em ambas as situações; e finalmente, a exposição ao polifenol aumentou a performance de SOD comparada às células incitadas apenas com peróxido.

5.11 AVALIAÇÃO COMPARATIVA POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA DO EFEITO DO RSV COMO: PRÉ E PÓS-ESTÍMULO NA PRODUÇÃO DE ERO EM CÉLULAS N2-A SOBRE A VIA DE AMPk

As células N2-A foram estimuladas de 2 formas diferentes, seguindo o padrão de **Pré-estímulo e Pós-estímulo com RSV 5 μ M**. Adicionalmente, usamos o Inibidor de AMPk, Dorsomorphin, a fim de avaliar o papel desse polifenol sobre essa via de sinalização. Seguem abaixo os resultados obtidos na **Figura 23**.

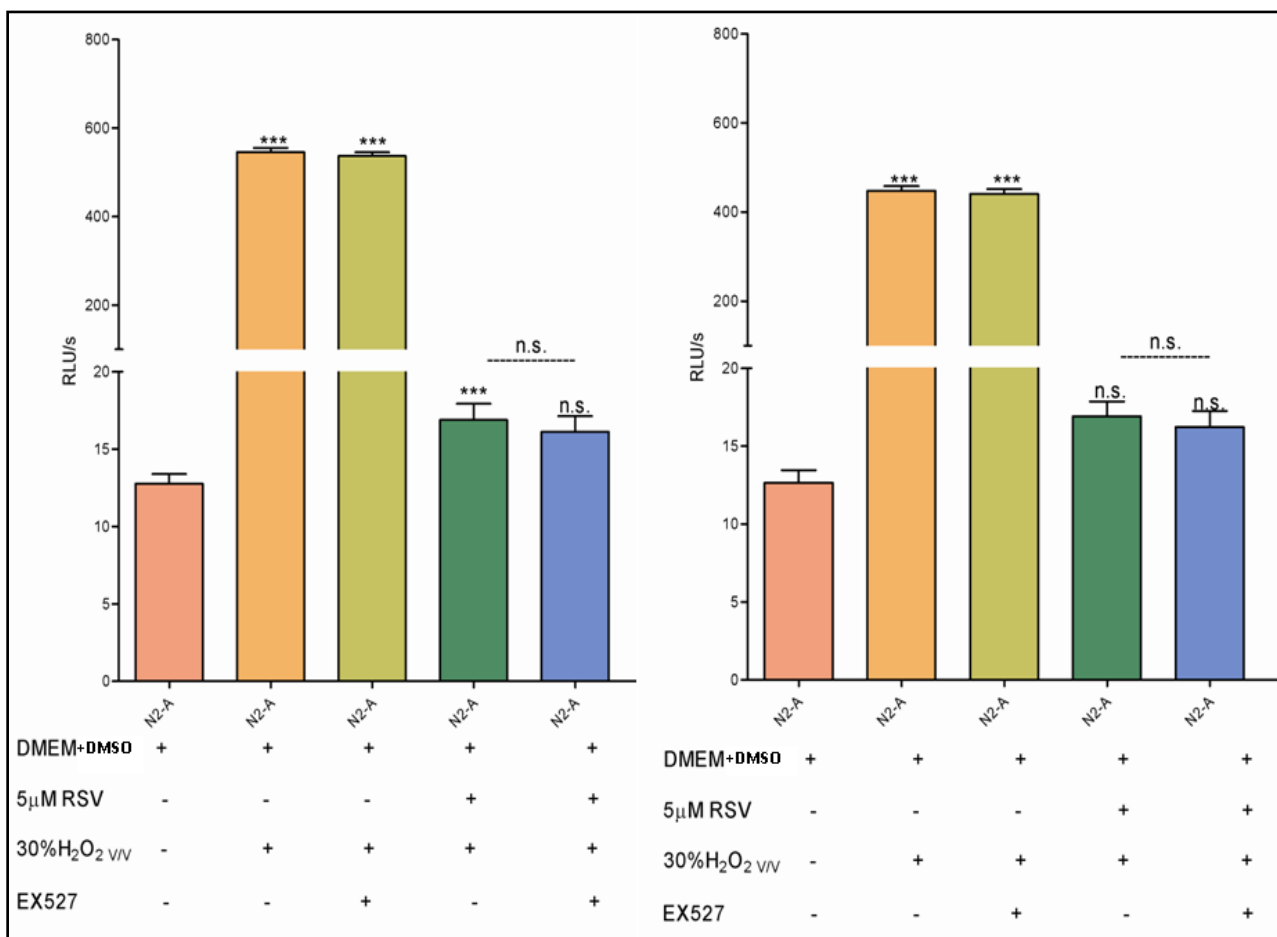


Figura 23: Avaliação comparativa do RSV sob a via de AMPk na produção de ERO em N2-A induzida por H₂O₂. Painel A= Pré-estímulo Painel B= Pós-estímulo. A geração de ERO foi expressa em RLU/min. **p < 0.001; ***p < 0.0001 significativo por ANOVA-Kruskal-Wallis teste, pós-teste de Dunn's Multiple Comparasion.

Observando a **Figura 23** acima, verificamos o mesmo perfil de resposta do RSV sob a via de sinalização AMPk nos dois cenários, **Pré-estímulo (Painel A)** e **Pós-estímulo (Painel B)**. O H₂O₂ isoladamente, assim como em acréscimo com Dorsomorphin, inibidor de AMPk, aumentaram em grande escala a produção de ERO; sugerindo dessa maneira que a AMPk é uma via ativada em células N-2A em situações de EO. As células que tiveram fomento do RSV em antecedência ou consecutivo ao H₂O₂ diminuíram a geração de ERO comparando-se ao incitamento único com o oxidante, o que era esperado. Já as encorajadas com a tríade (RSV, H₂O₂ e Dorsomorphin) não apresentaram diferença em referência ao grupo apenas sem

inibidor, atingindo valores similares aos da N2-A em estado basal. Esse resultado, sinaliza que o RSV não opera sob a via de AMPk; nas condições estudadas.

5.12 AVALIAÇÃO COMPARATIVA POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA DO EFEITO DO RSV COMO: PRÉ E PÓS-ESTÍMULO NA PRODUÇÃO DE ERO EM CÉLULAS N2-A SOBRE A VIA DE SIRT1

As células N2-A foram novamente estimuladas de 2 formas diferentes, seguindo o padrão de **Pré-estímulo e Pós-estímulo com RSV 5µM**. Aditivamente, usamos o Inibidor de SIRT1, EX527, a fim de avaliar o papel do RSV sobre essa via de sinalização. Seguem abaixo os resultados obtidos na **Figura 24**.

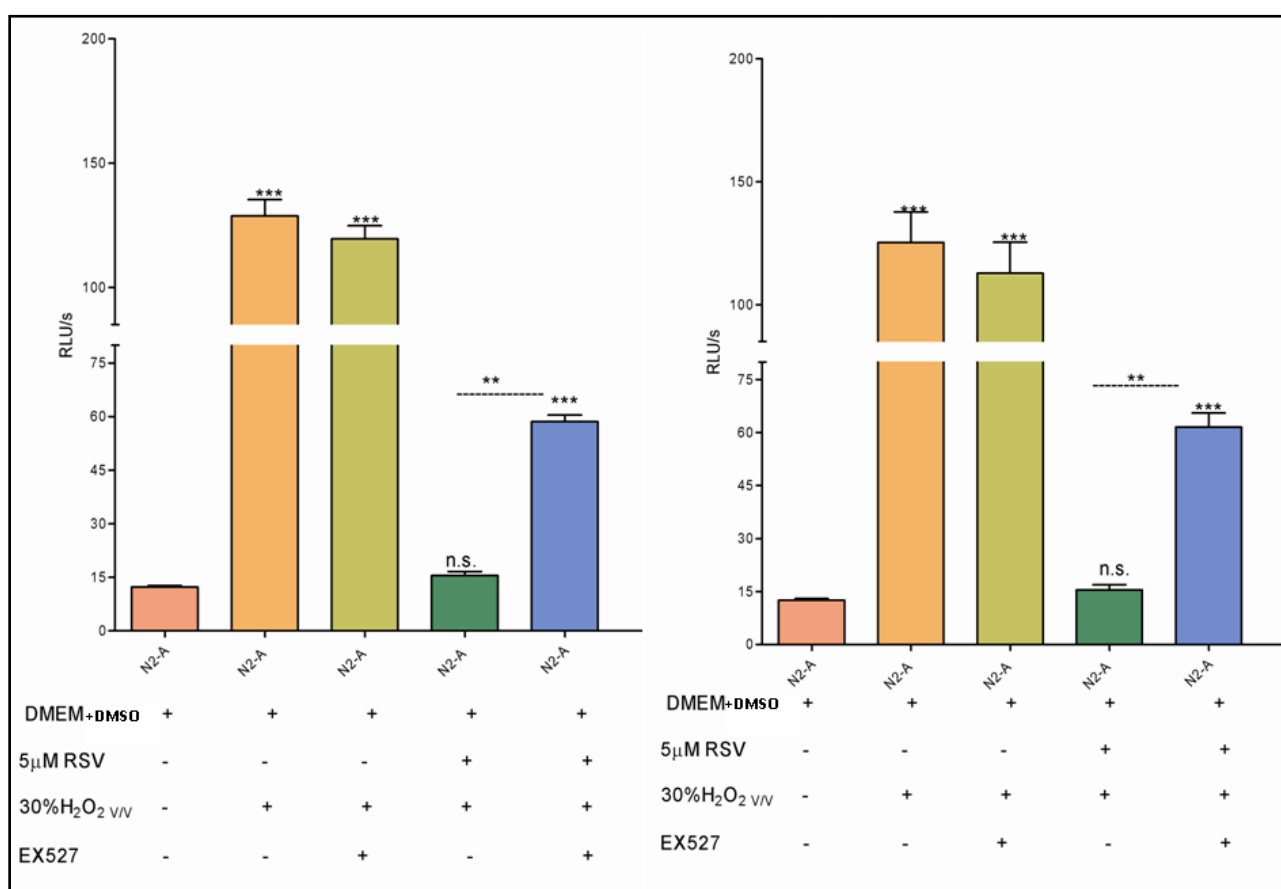


Figura 24: Avaliação comparativa do RSV sob a via de SIRT1 na produção de ERO em N2-A induzida por H₂O₂. Painel A= Pré-estímulo Painel B= Pós-estímulo. A geração de ERO foi expressa em RLU/min. **p <0.001; ***p <0.0001 significativo por ANOVA-Kruskal-Wallis teste, pós-teste de Dunn's Multiple Comparasion.

Analisando a figura acima, repetidamente temos o mesmo perfil de resposta do RSV nos dois cenários, **Pré-estímulo (Painel A)** e **Pós-estímulo (Painel B)**. Porém, agora sob a via de sinalização da SIRT1. O H_2O_2 isoladamente, assim como em acréscimo com EX527, inibidor de SIRT1, aumentaram a produção de ERO; propondo que a SIRT1 é uma via ativada em células N-2A em situações de EO. As células estimuladas com RSV em antecedência ou consecutivo ao H_2O_2 diminuíram a geração de ERO comparando-se ao incitamento único com o oxidante, o que era esperado. Todavia, nesse contexto, as que foram encorajadas com a tríade (RSV, H_2O_2 e EX527) apresentaram diferença em comparação àquelas apenas sem EX527, exibindo valores de produção de ERO em média 3 vezes maiores. Esse resultado mostra que o RSV atua sobre a via de SIRT1, de modo que existem outras vias também envolvidas, já que, os valores de ERO são aproximadamente a metade dos encontrados quando as N2-A são expostas ao H_2O_2 e EX527.

5.13 AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO EFEITO DO RSV COMO: PRÉ E PÓS-ESTÍMULO SOBRE A ATIVIDADE DA IL-6 EM CÉLULAS N2-A

Para avaliar a interposição do RSV sobre a atividade da IL-6 em células N2-A, estimulamo-las sobre a forma de: Pré e Pós-estímulo com o RSV $5\mu M$. Os resultados foram enunciados na **Figura 25**.

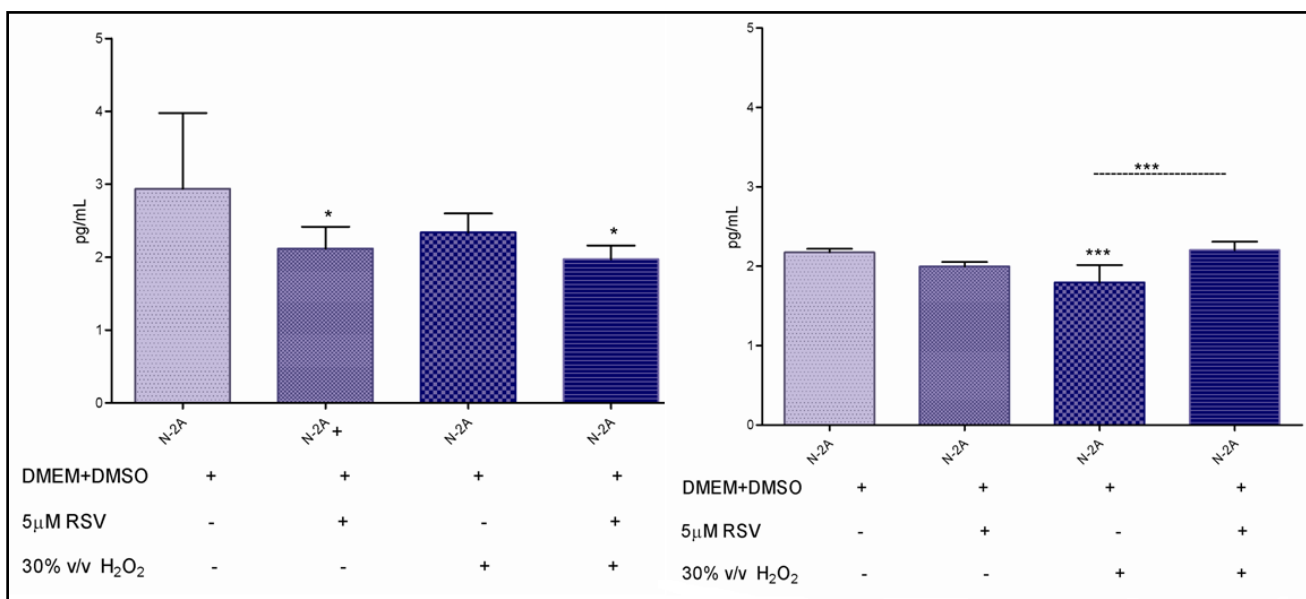


Figura 25: Avaliação comparativa do efeito do RSV na atividade de IL-6 em N2-A. Painel A= Pré-estímulo Painel B= Pós-estímulo. A atividade foi medida em

pg/mL(picogramas/militros). * $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$ significativo por ANOVA teste, pós-teste de Bonferroni's Multiple Comparasion.

A Figura acima traz um perfil diferenciado para os dois panoramas: **Pré-estímulo** (Painel A) e **Pós-estímulo** (Painel B) com RSV. Onde o polifenol isoladamente diminui em 1.39 vezes a liberação de IL-6 pelas células N2-A no quadro de Pré-estímulo; mas não o faz no Pós-estímulo. E de maneira conjugada ao H_2O_2 , reduz em 1.19 vezes os valores da interleucina inflamatória em relação ao estímulo isolado com o oxidante no Pré-estímulo; e os exarcerba em 1.23 vezes, no Pós-estímulo, também comparando-se ao fomento apenas com H_2O_2 .

5.14 AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO EFEITO DO RSV COMO: PRÉ E PÓS-ESTÍMULO SOBRE A ATIVIDADE DE TNF- α EM CÉLULAS N2-A

Para analisar a interposição do RSV sobre a atividade da TNF- α em células N2-A, estimulamo-las sobre a forma de: Pré e Pós-estímulo com o RSV $5\mu M$. Os resultados foram representados na **Figura 26**.

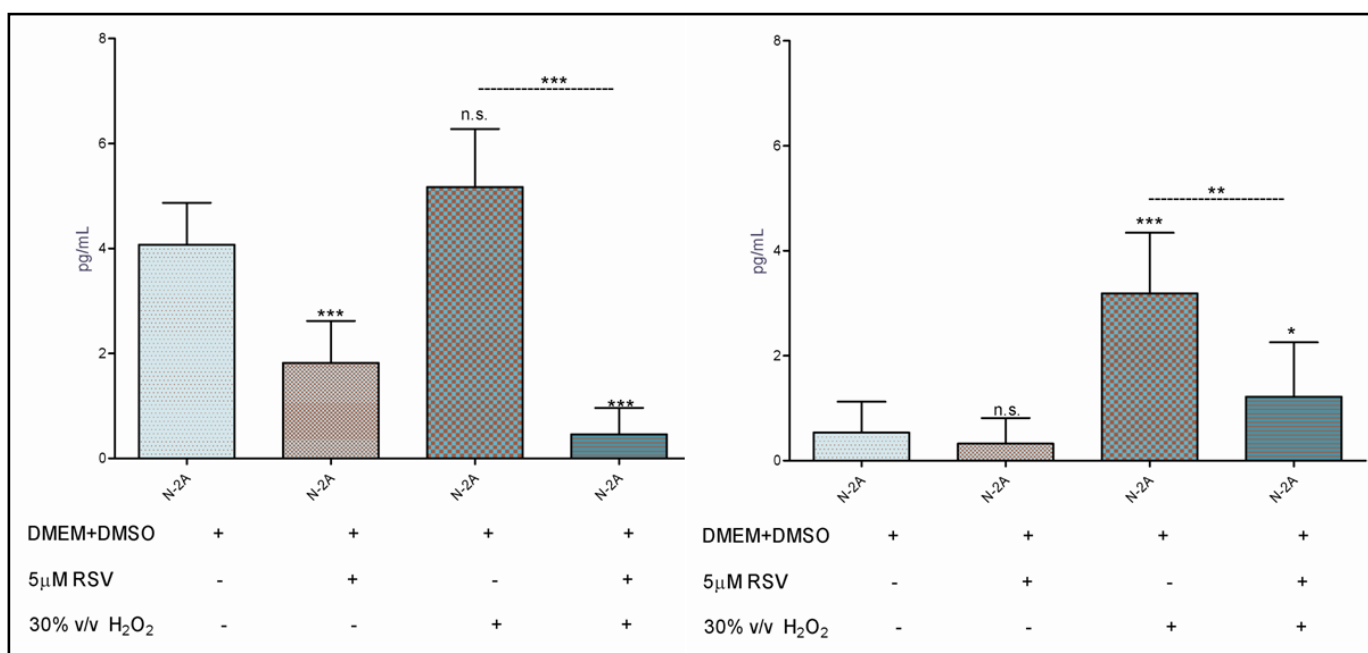


Figura 26: Avaliação comparativa do efeito do RSV na atividade de TNF- α em N2-A. Painei A= Pré-estímulo Painei B= Pós-estímulo. A atividade foi medida em pg/mL(picogramas/mililitros). * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$ significativo por ANOVA teste, pós-teste de Bonferroni's Multiple Comparasion.

Examinando a figura acima, verificamos primeiramente que na situação de **Pré-estímulo** (Painei A), o RSV diminuiu em 2.24 vezes a atividade de TNF- α de maneira isolada, em relação às células em estado basal. E também o fez quando em conjunto com o H₂O₂ no tocante ao estado basal na proporção de 8.84 vezes, e às N2-A fomentadas unicamente com o oxidante em 11.22 vezes. No **Pós-estímulo** (Painei B), o RSV consecutivo ao H₂O₂ foi capaz de minorar a atuação de TNF- α , em 2.61 vezes quando comparado às células estressadas apenas com H₂O₂. Essa diminuição ainda fez com que as N2-A fomentadas pelo oxidante e antioxidante, ativassem a interleucina inflamatória 2.28 vezes mais que as células basais.

5.15 AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO EFEITO DO RSV COMO: PRÉ E PÓS-ESTÍMULO SOBRE A ATIVIDADE DE IL-10 EM CÉLULAS N2-A

Avaliamos a influência do RSV sobre a atividade da IL-10, expondo as N2-A sob condições de: Pré e Pós-estímulo com o RSV5 μ M. Os resultados foram representados na **Figura 27** abaixo.

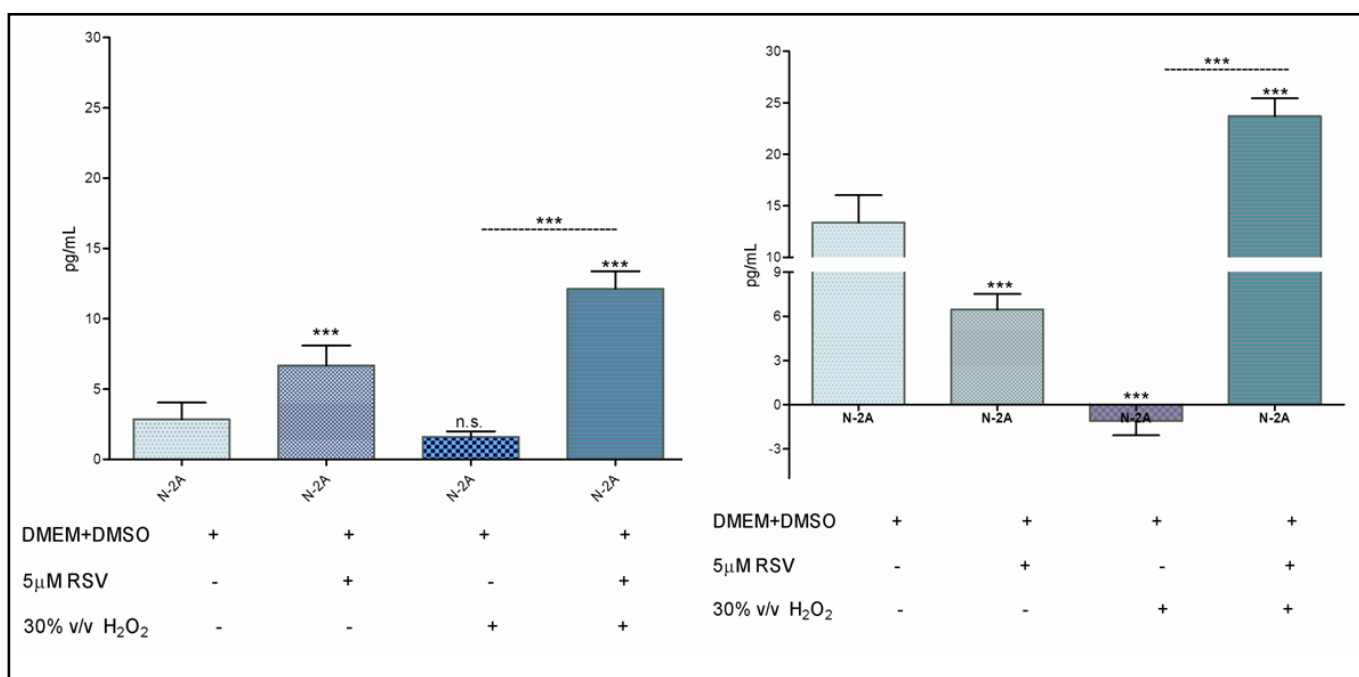


Figura 27: Avaliação comparativa do efeito do RSV na atividade de IL-10 em N2-A. Painel A= Pré-estímulo Painel B= Pós-estímulo. A atividade foi medida em pg/mL(picogramas/mililitros). * $p < 0.01$ *** $p < 0.0001$ significativo por ANOVA teste, pós-teste de Bonferroni's Multiple Comparasion.

A observação da **Figura 27** acima, nos dá o seguinte panorama: No **Pré-estímulo** (**Painel A**), o RSV 5 μ M aumentou em 2.35 vezes a atividade de IL-10 em contrapartida às células N2-A em estado basal. Ocorreu também, um acréscimo de 4.26 vezes em relação às células basais dessa interleucina anti-inflamatória, quando o RSV foi incubado em antecedência ao H₂O₂. Adicionalmente, um aumento de 7.58 vezes no tocante às N2-A fomentadas unicamente com o peróxido. No **Pós-estímulo** (**Painel B**), o RSV de forma isolada diminui a atividade de IL-10. Entretanto, similarmente ao que acontece no Pré-estímulo, quando as células são fomentadas por RSV consecutivamente ao H₂O₂, aumenta em 1.77 vezes a liberação de IL-10 se comparado às células basais. E eleva do mesmo modo, em 22.48 vezes a atividade dessa interleucina anti-inflamatória quando comparadas às N2-A estimuladas apenas com o oxidante.

5.16 AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO EFEITO MODULADOR, ANTI-OXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIO DO RSV COMO: PRÉ E PÓS-ESTÍMULO FRENTE OS ENSAIOS REALIZADOS

Com o intuito de comparar o efeito do RSV nos testes realizados na forma de Pré-estímulo e Pós-estímulo segue a **Tabela 4** abaixo.

	Pré-Estímulo RSV 5 μ M	Pós-Estímulo RSV 5 μ M
Produção de ROS		n.s.
Geração de NO	↑ ↑	↑
Produção de ONOO⁻		
Capacidade Redutora Celular	↑ ↑	↑

Atividade da CAT	n.s.	
Atividade da SOD	↑	↑ ↑
Atuação sob a via de AMPk	-	-
Atuação sob a via de SIRT1	+	+
Atividade de IL-6		
Atividade de TNF-α	↓ ↓	↓
Atividade de IL-10		

Tabela 4: Avaliação comparativa do efeito modulatório / anti-oxidante e anti-inflamatório do RSV em células N2-A. ↑: aumento; ↓: diminuição; --- : ausência de efeito; + : atuação; -: não-atuação.

Discussão

6 Discussão

O envelhecimento é um fenômeno biológico inevitável e universal. Embora diferentes hipóteses tenham sido apresentadas para explicar os mecanismos celulares e moleculares desse processo, estudos recentes tornaram cada vez mais claro que o envelhecimento ocorre devido ao acúmulo de danos moleculares no organismo. Entre as principais causas que contribuem para esses prejuízos; temos as reações com radicais livres (RL) e outras espécies reativas de oxigênio/espécies reativas de nitrogênio (ERO/ERN) (SADOWSKA-BARTOSZ & BARTOSZ, 2014; ABDEL-DAIM *et.al.*, 2018). As ERO, como o superóxido e o peróxido, são potencialmente tóxicas para os produtos do metabolismo energético, bem como, para as moléculas de sinalização. Tais propriedades são firmemente implicados no processo de envelhecimento (DESJARDINS *et. al.*, 2017).

O entendimento sobre o envelhecer ainda é bastante limitado. Como um processo biológico complexo, ele certamente envolve uma variedade de fatores. É também permissivo para o desenvolvimento de vários distúrbios crônico/degenerativos e doenças

infecciosas; que são fortemente influenciados por desequilíbrios nutricionais, inflamação, exaustão metabólica e pelo próprio processo natural de senescência celular. Sob essa perspectiva, a maioria dos organismos realmente morre de patologias relacionadas à idade, ao invés de envelhecer (PENG *et.al.*, 2014).

Após os 60 anos de idade, as deficiências de algumas habilidades cognitivas, como: a velocidade de processamento de informações, a memória de trabalho e funções executivas tornam-se aparentes. Enquanto outras, a título de exemplo: a memória de curto prazo, o conhecimento autobiográfico e o processamento de emoções, permanecem relativamente intactas. Na sociedade moderna, as enfermidades neurodegenerativas associadas ao envelhecimento, como, A Doença de Alzheimer e de Parkinson, Demência Frontotemporal, têm sido uma ameaça letal crescente aos seres humanos (DENVER; MCCLEAN, 2018; FLORENCE *et.al.*, 2014 FREITAS *et.al.*, 2017).

A sobrevivência celular depende do equilíbrio entre as espécies oxidativas geradas nos processos metabólicos e o sistema antioxidante presente naquele sistema. Essa harmonia pode ser interrompida em situações de exposição ao tabagismo, ao álcool, à radiação ou às toxinas ambientais; como também, pela diminuição das defesas antioxidantes endógenas; advinda com o passar dos anos. O excesso dessas espécies oxidativas causa a oxidação de biomoléculas, com conseqüente desequilíbrio homeostático. Este, manifesta-se nos efeitos patológicos, metabólicos e degenerativos. Instaurando-se nesse momento, o quadro de estresse oxidativo (EO). (XU *et.al.*, 2018).

O EO é sem dúvidas, um fator etiológico comum no envelhecimento, doenças metabólicas e distúrbios degenerativos. O corpo contém um sistema antioxidante endógeno para ajudar a neutralizar RL, ERO/ERN e mitigar o potencial dano oxidativo por elas causado. Além disso, o incremento da ingestão de antioxidantes exógenos pode melhorar os danos originados pelo EO. O qual acontece através da interdição do início ou propagação da reação oxidativa em cadeia; onde tais antioxidantes exógenos atuam como sequestradores de RL ou inibidores de *oxigênio singlet*; mitigando assim, os processos neurodegenerativos (ABEL-DAIM *et.al.*, 2018).

Nosso trabalho buscou entender alguns mecanismos moduladores do RSV, no que tange aos danos causados pelo EO no processo de envelhecimento em células N2-A. Objetivando principalmente, assemelhar-se ao que acontece na senescência neural. Sendo assim, as células neuronais foram expostas ao H₂O₂ 10.5%v/v; concentração obtida através de curva Concentração-Resposta; a qual gerou maior potencial oxidativo com morte celular menor do que 20% (**Figura 11 e Figura 12**).

De fato, o H₂O₂ é um marcador biológico importante do EO devido a sua capacidade em atravessar membranas celulares, podendo atuar como um potente indutor de senescência celular. A adição exógena do mesmo contribui para a formação endógena de outras ERO, como, superóxido e radical hidroxila, mantendo assim no sistema alvo as características comuns do envelhecimento (APOSTOLOVA & VICTOR, 2015; HÖHN *et al.*, 2017).

Foi demonstrado que o RSV possui propriedades multifacetadas, como por exemplo: qualidades anti-inflamatórias, anti-oxidativas, terapêuticas em patologias relacionadas à idade, e anti-envelhecimento (KO *et al.*, 2017). Além disso, esse polifenol pode proteger neurônios contra a degeneração e disfunção; resultados esses, obtidos em modelos experimentais de acidente vascular cerebral isquêmico, doença de Alzheimer e doença de Parkinson. (KUMAR *et al.*, 2016).

A concentração de RSV utilizada foi de 5µM, obtida por curva Concentração-Resposta (**Figura 13**), e corrobora com um estudo de SIMÃO *e cols.*, onde o RSV 5µM promoveu angiogênese em células do endotélio cerebral (SIMÃO *et al.*, 2012). Demonstrando seu papel como modulador/protetor neural nessa concentração.

A molécula de RSV foi testada sempre sob duas perspectivas nas células neuronais em questão: Pré-estímulo das N2-A anteriormente à exposição ao H₂O₂, agente indutor de senescência, buscando avaliar o uso do polifenol na prevenção de danos possivelmente trazidas pelo EO/envelhecimento. E sob um cenário de Pós-estímulo das células N2-A, que já haviam sido expostas ao oxidante, examinando suas capacidades neuro-regeneradoras.

O cérebro depende da reação redox da coenzima *dinucleotídeo de adenosina e adenina* (NADH) para transferir elétrons ao oxigênio, necessários na produção de ATP.

Alguns dos elétrons fazem a redução desse oxigênio, transformando-o em $O_2^{\cdot -}$, que é ainda mais reduzido a OH^{\cdot} , $ONOO^-$, OH^- , coletivamente chamadas de ERO (GHOSH *et al.*, 2012). O Sistema Nervoso é particularmente vulnerável aos efeitos deletérios dessas ERO por algumas razões. Podemos citar: a alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados que podem ser alvos de peroxidação lipídica, o consumo elevado de oxigênio para produção energética, e seu sistema antioxidante relativamente deficiente. O acúmulo anormal de RL causa danos oxidativos e nitrosativos às proteínas, lipídeos e moléculas de DNA. O que gera uma cascata de falhas bioenergéticas, depleção de defesas antioxidantes, disrupção microtubular, desmielinização, neuroinflamação, mitofagia e morte celular apoptótica; levando ao envelhecimento e neurodegeneração (SAS; SZABÓ; VÉCSEI, 2018).

Assim, o nosso próximo passo foi verificar, perante esse cenário de envelhecimento neural causado pelo acúmulo de ERO, se o RSV5 μ M seria capaz de atuar sobre a produção dessas ERO nas células N2-A sob as duas perspectivas mencionadas acima. Para isso, usamos o teste de Quimioluminescência dependente de luminol.

Nossos resultados demonstraram que o RSV diminuiu a formação das ERO, quando usado como Pré-estímulo, não o fazendo quando a intenção foi tratar as células já oxidadas (**Figura 15- Painel A e B, respectivamente**).

No intuito de confirmarmos esses resultados e visualizarmos a distribuição destas ERO nas células N2-A, realizamos o ensaio de microscopia de fluorescência pelo uso do marcador de Carboxi- H_2DCFDA . Os resultados aqui encontrados corroboram com os achados do teste de quimioluminescência; onde as ERO diminuíram quando o RSV 5 μ M foi usado sob a perspectiva de Pré-estímulo; mas em contrapartida, não decresceram nas células já oxidadas quando comparadas ao estímulo com H_2O_2 (**Figura 16 e Figura 17, respectivamente**).

Essa resposta nos dá indício de uma capacidade antioxidante do RSV sob um prisma preventivo. E corrobora com os achados de *LIN & cols.* que mostraram que o pré-tratamento de astrócitos com RSV 5 μ M foi capaz de suprimir a geração de ERO como também, a taxa de morte celular, que haviam sido induzidas por glutamato (LIN *et al.*, 2014). Também, com os estudos de Bobermim & cols. onde o RSV pré-incubado com SH-SY5Y

(linhagem neuroblastoma humano) diminuiu a produção de ERO que havia sido induzida por amônia.

De maneira consecutiva, decidimos avaliar a capacidade do RSV 5 μ M em atuar sobre a produção de NO. Nossos resultados mostraram que tanto o pré, quanto o pós-estímulo das N2-A com o polifenol na concentração em questão, aumentou a geração dessa molécula sinalizadora. Uma observação importante é que houve uma melhor recuperação da produção de NO pelas células N2-A quando estas foram pré-tratadas com RSV e depois desafiadas com H₂O₂ (**Figura 18 – Paineis A e B, respectivamente.**)

O NO medeia a maioria das respostas dependentes do endotélio cerebral, enquanto o RSV, polifenol com efeitos pleiotrópicos, pode reduzir o EO e aumentar a produção vascular desse NO; como realmente o fez em achados de HUANG & cols. em neurônios corticais de ratos, injuriados pela privação de oxigênio e glicose (HUANG *et.al.*, 2014). Perfil semelhante ao encontrado em nosso estudo nas células N2-A.

Adicionalmente, no SNC o NO influencia a plasticidade sináptica, a viabilidade neuronal, neurotransmissão, resposta imune. Além de ser neuroprotetor (TRIPATHI, *et.al.*, 2007; THATCHER, *et.al.*, 2006; EVANGELOPOULOS *et.al.*, 2010). Nessa perspectiva, o RSV em nossos achados, atuou como protetor neural quando elevou a geração de NO nas células N2-A no Pré-estímulo; e como neuro-regenerador quando o fez ainda no Pós-estímulo.

Continuando nossa busca sob os efeitos do RSV como modulador e agente antioxidante; seguimos para a investigação da atuação do mesmo sob a geração do ONOO⁻. Ânion este, formado pela reação controlada por difusão dos radicais O₂^{•-} e NO[•], onde sua formação não-equilibrada representa um dos principais mecanismos de lesão e morte celular; por modificar o metabolismo e a sinalização nas células. Sendo amplamente distribuído na aorta, coração, fígado, rins e cérebro, no envelhecimento (VALEZ *et.al.*, 2013; SUN *et.al.*, 2016).

Nossos achados mostram que o RSV 5 μ M foi capaz de minorar a produção de ONOO⁻ nas células N2-A quando usado de maneira preventiva e como tratamento (**Figura**

19). Entretanto, podemos observar que esta diminuição se mostrou mais efetiva quando o RSV foi usado sob a ótica de Pré-estímulo (observação possível através do grau de significância, $p > 0,001$). E corroboram com os achados de Olas & cols. que provaram que esse polifenol foi capaz de diminuir a geração de ONOO^- em células periféricas sanguíneas de doadores jovens (OLAS *et.al.*, 2008).

Diante dos resultados acima, o nosso interesse foi então verificar por quais mecanismos o RSV poderia exercer o seu efeito anti-oxidante. Sabemos que os mecanismos antioxidantes celulares podem ser enzimáticos e não enzimáticos. Neste contexto, iniciamos a nossa pesquisa avaliando a capacidade redutora celular através do teste de MTT (**Figura 20**). Este teste envolve reações com moléculas redutoras tais como NADPH oxido/redutase que transferem elétrons/prótons para o MTT fazendo com que ele mude do seu estado oxidado (amarelo) para o seu estado reduzido (faixa – azul a roxo).

Nesta avaliação os nossos resultados mostraram que o RSV aumentou a capacidade redutora celular tanto na condição basal, como quando as N2-A foram estimuladas por H_2O_2 na condição de Pré-estímulo (**Figura 20 – painel A**). Ao analisarmos os resultados do Pós-estímulo, verificamos que estes se mostraram significativos apenas na condição onde o RSV foi adicionado às N2-A posteriormente ao fomento com H_2O_2 (**Figura 20 – painel B**).

O acoplamento neurovascular depende de uma interação coordenada de neurônios ativados, astrócitos e células endoteliais vasculares e musculares lisas. A transdução de sinais de neurônios e astrócitos inicia uma vasodilatação regional na microcirculação cerebral, que envolve, produção e liberação de NO por células endoteliais microvasculares. Achados anteriores em camundongos, demonstram que o envelhecimento está associado a uma produção aumentada de ERO derivadas da NADPH oxidase na microvasculatura cerebral; que contribuem para o comprometimento do acoplamento neurovascular em idosos, provavelmente pela diminuição da biodisponibilidade de NO promovendo disfunção endotelial. Estudos fornecem fortes evidências de que o tratamento de roedores de laboratório com RSV exerce efeitos protetores endoteliais significativos na microcirculação cerebral durante o envelhecimento. É importante ressaltar que o RSV mostrou aumentar a biodisponibilidade do NO e inibir as NADPH oxidases (TOTH *et.al.*, 2014).

Nossos resultados corroboram com os achados de TOTH & cols. acima mencionados. O RSV 5µM foi capaz de aumentar a capacidade redutora/antioxidante das células N2-A sob ambas as perspectivas de estímulo (Pré e Pós-estímulo); em maior intensidade quando utilizado sob uma concepção preventiva (**Figura 20**). Visto sua atuação direta sobre a NADPH. Inibindo a NADPH oxidase; ao passo que reduziu a NAD, fazendo com que a mesma deslocasse do estado de oxidada (NADP+) para o de reduzida (NADPH).

Existem alguns grupos de defesa antioxidante nas células, nomeadamente, enzimas (como: SOD e CAT), antioxidantes de baixo peso molecular e ação indireta (por exemplo, agentes quelantes) e os compostos de ação direta, como: NADPH e agentes exógenos de fontes dietéticas: polifenóis - RSV (SAS; SZABÓ; VÉCSEI, 2018).

Tanto o sistema antioxidante enzimático como o não enzimático já citados, são essenciais ao combate do EO. Os antioxidantes enzimáticos incluem SOD, CAT e glutathiona peroxidase (GPx). O H₂O₂ formado pela reação catalítica da SOD é um metabólito celular, posteriormente desintoxicado em água pela GPx e pela CAT (LI *et.al.*, 2015; SKRAJNOWSKA *et.al.*, 2013).

A CAT é um antioxidante que monitora as concentrações de H₂O₂ no espaço intracelular. Embora nenhum estudo tenha examinado o impacto da deficiência de CAT humana no cérebro *in vivo*, estudos em animais mostraram que camundongos *knockout* de CAT demonstram uma taxa mais lenta de síntese de ATP em mitocôndrias cerebrais, em comparação com camundongos transgênicos com superexpressão de CAT. Similarmente, camundongos transgênicos com superexpressão mitocondrial de CAT estão associados a um menor dano oxidativo, maior tempo de vida e neuroproteção contra isquemia cerebral (SALMINEM; PAUL, 2014).

O tratamento com RSV aumentou a expressão de CAT e GPx, mas não SOD ,em segmentos aórticos de ratos; como também, aumentou a capacidade antioxidante hepática via CAT, SOD e GPx, impedindo dano oxidativo no fígado desses animais, induzido por administração crônica de etanol (TRUONG; JUN; JEONG, 2018).

Nossos resultados quanto à ação do RSV5 μ M sobre a atividade da CAT em células N2-A revelou-nos que o polifenol na concentração em questão, não foi capaz de exercer efeitos sobre a atividade da CAT quando na forma de Pré-estímulo nessa linhagem neural. E, contrariando os achados da literatura, diminuiu a atividade da mesma, quando usado sob a perspectiva de tratamento quando estimulada com H₂O₂, mas aumentou a sua atividade em condições basais. **(Figura 21)**

A SOD é uma enzima que catalisa a dismutação do O₂⁻ em oxigênio molecular e H₂O₂ ($2 O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$). Três formas de SOD foram identificadas no cérebro humano, diferindo pelo seu cofator de metal. Cobre (Cu) zinco (Zn) e manganês (Mn) compõe SOD1, SOD3 e SOD2. A SOD2 é uma importante enzima no controle da produção de ERO, já que, é o único antioxidante conhecido dentro da mitocôndria. Evidências mostraram que a superexpressão de SOD2 é um fator protetor contra a neurotoxicidade do NMDA em cultivo de linhagens de células corticais do cérebro de ratos. Da mesma forma, a expressão deficiente de SOD2 mostrou causar disfunção mitocondrial, atrofia neuronal e senescência acelerada do SNC em alguns organismos (SALMINEM; PAUL, 2014).

Nossos resultados mostraram que no Pré-estímulo o RSV foi mais eficiente em ativar a SOD do que na condição de Pós-estímulo **(Figura 22 – painéis A e B respectivamente)**. Mais uma vez esses resultados corroboram com os de TUNG & cols. que revelaram que o RSV protege membranas musculares, cardíacas e hepáticas em camundongos idosos; pela indução dos sistemas antioxidantes endógenos nesses órgãos; afetando principalmente a atividade da SOD (TUNG *et.al.*, 2015). Outros estudos, também demonstraram a atuação do polifenol na elevação da expressão protéica e atividade de SOD no cérebro de ratos diabéticos. Além disso, o aumento da atuação de SOD em células neuronais também de ratos, é um importante mecanismo de proteção neural do RSV contra apoptose dessas células, induzida por EO mitocondrial (WANG *et.al.*, 2014; TRUONG; JUN; JEONG, 2018).

Quando falamos em EO e seus mecanismos moduladores, observamos que a avaliação molecular é importante para podermos verificar como acontece este equilíbrio metabólico. Entretanto, se torna necessário uma análise mais aprofundada para entender como estas moléculas e os seus pares conversam entre si. Para tal, o estudo das vias de

sinalização envolvidas nestes processos, nos dá um norte de como os mesmos se comunicam. Neste contexto, duas vias de sinalização merecem a nossa atenção: AMPK e SIRT1.

A atividade da AMPK é induzida por níveis elevados de AMP/ATP, exercício, drogas antidiabéticas, como: metformina e tiazolidinedionas, equilíbrio NAD^+/NADH e RSV. Nos neurônios, essa quinase desempenha um papel na citoproteção sob condições isquêmicas e patológicas (PATEL; GUPTA; DEY, 2011). O fluxo metabólico pode mudar o equilíbrio NAD^+/NADH . Um dos resultados dessa mudança é a ativação de uma classe de deacetilases conhecidas como sirtuínas, que requerem NAD^+ na realização de sua atividade enzimática e são fortemente implicadas no envelhecimento (BUIKEWITZ; ZHANGE; MAIR, 2014).

Nossos resultados mostraram que a inibição da via AMPk não foi capaz de alterar o perfil oxidativo das células Neuro 2-A em condições Pré ou Pós-tratamento (**Figura 23 – painéis A e B respectivamente**). Também a inibição da via de AMPk não foi capaz de alterar o padrão anti-oxidante gerado pelo RSV nos dois tratamentos estudados (**Figura 23**). Nossos resultados elucidaram um perfil diferente do descrito na literatura. Isso porque o RSV 5 μM não conseguiu ativar a via de AMPk nas células N2-A nas duas condições por nós estudadas, no que tange a geração de um EO nestas células. (**Figura 23, painéis A e B respectivamente**).

A SIRT1, outro alvo putativo do RSV têm sido associada à longevidade em diversos modelos de sistemas. Estudos de IDO & cols estabeleceram que o RSV medeia a ação de AMPK quanto à prevenção da senescência induzida por H_2O_2 em queratinócitos primários. Indicando conjuntamente, que a SIRT1 é um fator chave na senescência desses mesmos queratinócitos; sugerindo que essa possa ser uma importante via reguladora do envelhecimento da pele *in vivo* (IDO *et. al.*, 2015).

As SIRT1 são enzimas responsáveis pela regulação de sinais em respostas fisiológicas e metabólicas, desempenhando um papel crítico na sobrevivência celular. É um modulador analítico em resposta ao estresse neuronal e está envolvida na diferenciação neuronal embrionária (CHIANG *et.al.*, 2014). Também participa da conservação da homeostase celular da glicose; que favorece a longevidade do organismo e protege

contra o envelhecimento. Ainda mais, a SIRT1 age diretamente no combate ao EO; onde os polifenóis, como RSV, contribuem induzindo a superexpressão dessas SIRT1. Foi demonstrado que níveis reduzidos dessas enzimas no hipocampo de ratos contribuem para o envelhecimento cerebral, e para a progressão de muitas doenças com comprometimento cognitivo (exemplo: Alzheimer) (SARUBBO *et.al.*, 2018).

Nossos resultados sobre a atuação do RSV 5 μ M em células N2-A na via de SIRT1 (**Figura 24**), nos mostrou que o mesmo ativa tal via, tanto na perspectiva de pré, quanto pós- estímulo.

Considerando a neuroinflamação como um fator-chave no processo de envelhecimento cerebral, muitas das estratégias anti envelhecimento são orientadas para a prevenção ou atenuação desse estado pró-inflamatório. Nesse sentido, tem sido apontado que os polifenóis exercem efeitos neuroprotetores e também modulam o sistema imunológico do cérebro. Por exemplo, foi encontrado que as dietas enriquecidas com RSV reduzem a neuroinflamação, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo de roedores idosos com um impacto na melhoria dos processos cognitivos.

Assim, como nessa linhagem celular (N2-A) não houve ativação da via de AMPk, mas sim de SIRT; a nossa hipótese é que tal estímulo tenha ocorrido pela modulação do complexo de NF- κ B, como sugerido por Sarubbo e cols. e ilustrado abaixo na **Figura 28**, e não através da via clássica onde as SIRT1 é ativada indiretamente pelo desequilíbrio entre NAD⁺/NADH ou diretamente pela ação da AMPk.

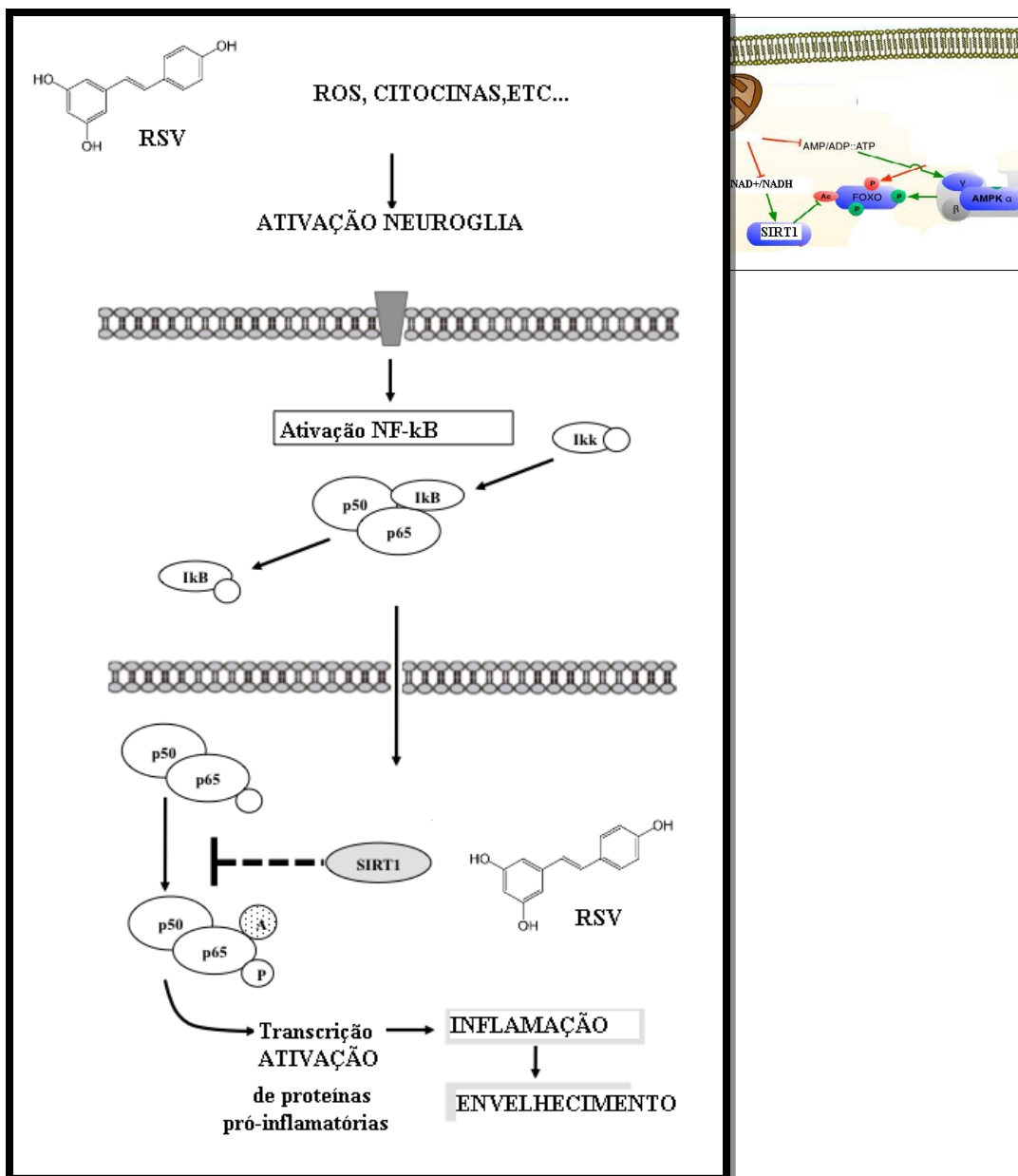


Figura 28: Esquema do efeito do RSV na via de sinalização SIRT1 e NF-κB envolvidos na neuroinflamação. Modificado de SARUBBO *et.al.* 2018

Buscando então dar suporte para a nossa hipótese levantada acima, o nosso próximo passo foi verificar a influência do RSV quanto ao perfil anti e pro-inflamatório nas células N2-A induzidas à senescência pelo H_2O_2 . Dosamos IL-6 e TNF- α , citocinas pró-inflamatórias. Como também, IL-10, citocina anti-inflamatória.

De acordo com a Teoria do estresse oxidativo do envelhecimento, os RL são responsáveis pelo declínio da função e eficiência dos sistemas biológicos no envelhecimento.

Uma das principais fontes de EO sistêmico são as reações inflamatórias; e fortes evidências sustentam que a inflamação sistêmica crônica de baixo grau é uma manifestação comum desse processo, chamada “Inflamming”. Está associado à desregulação imunológica, das quais as características mais evidentes são níveis de mediadores pró-inflamatórios na ausência de desencadeantes evidentes e, paralelamente, redução da capacidade de montar uma resposta inflamatória efetiva a estímulos imunogênicos adequados (TUNG *et.al.*, 2015 b).

O maior modulador de sinalização celular, para ocorrência de inflamação induzida pelo EO é o NF- κ B (CATANA; CALIN; NEAGOE, 2015). Sua ativação é rigidamente controlada por um complexo quinase, I κ B (IKK), composto de três proteínas principais: IKK1 / IKK α , IKK2/IKK β e NEMO/IKK γ . As duas primeiras são quinases estruturalmente relacionadas; enquanto a terceira é uma subunidade reguladora que exibe afinidade por ativadores modificados por cadeias de poliubiquitina.

Estudos baseados em transfecções celulares e ablação de genes de camundongos revelaram que o NF- κ B pode realmente ser ativado por duas vias de sinalização alternativas. A via principal é induzida por uma grande variedade de estímulos; como citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α), produtos bacterianos (peptidoglicano), proteínas virais ou diversas formas de estresse (UV, EO) e é estritamente dependente do NEMO; que garante a transmissão do sinal do receptor para a subunidade catalítica IKK2. Na maioria das situações, a IKK1 contribui apenas moderadamente para a atividade quinase geral da IKK, mas na ausência da IKK2 pode ajudar a preservar baixos níveis de ativação do NF κ B (SENEGAS; GAUTHERON; COURTOIS, 2015). Essa modulação é ilustrada de maneira esquemática na **Figura 29**, abaixo.

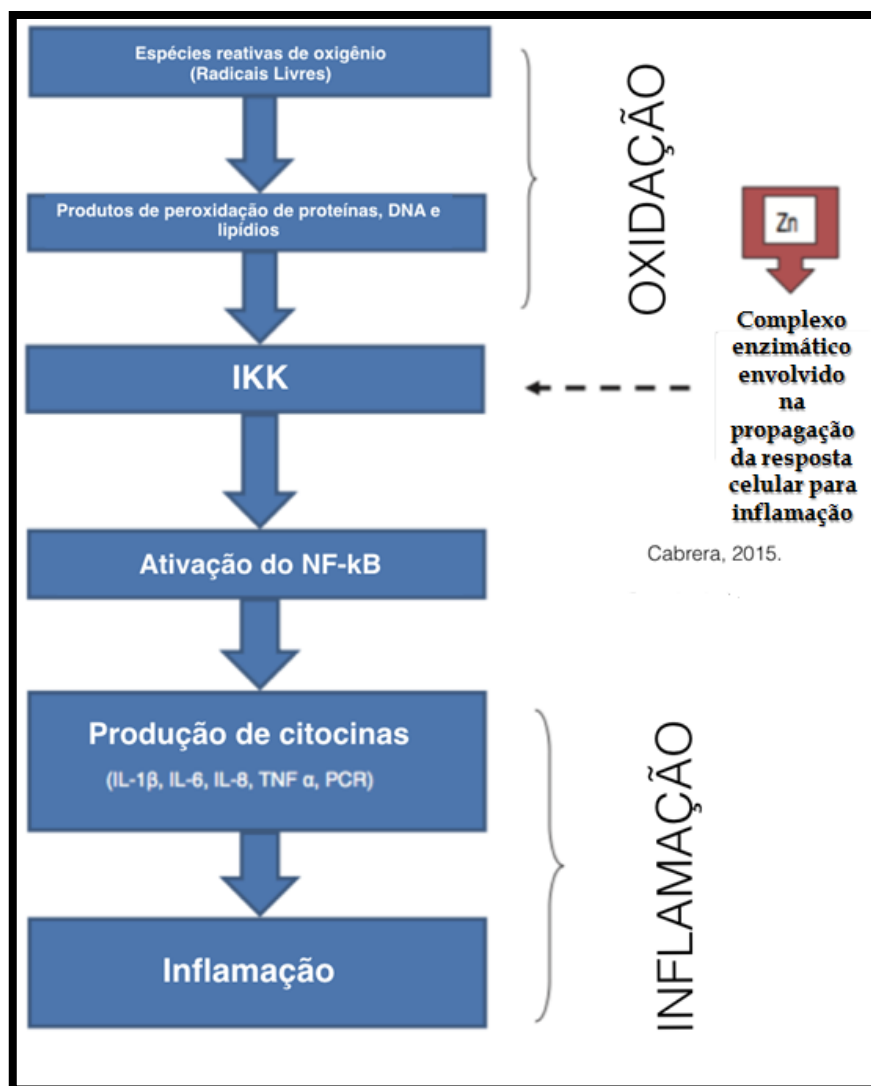


Figura 29: Papel modulatório do NF-κB entre os processos de Oxidação e Inflamação característicos do “Inflammaging”. Fonte: CABRERA, 2015. IKK: complexo de proteínas responsáveis pelas vias de transdução de sinais que levam à ativação do NF-κB. Zn como co-fator de ativação.

O “Inflammaging” caracteriza-se por um aumento acentuado na secreção de fatores de crescimento, enzimas proteolíticas e citocinas inflamatórias (IL-6, IL-8, TNF α , IFN, e TGF- β), o que denomina o chamado: “Fenótipo Secretor Associado à Senescência” (SASP) (TUNG *et.al.*, 2015 b; LIU *et.al.*, 2018).

Altos níveis de marcadores pró-inflamatórios associados à idade são detectados na maioria dos idosos, mesmo na ausência de fatores de risco e doenças clinicamente ativas. Apesar de seu papel fisiológico fundamental como um mecanismo de defesa contra infecções ou moléculas estranhas, quando a inflamação se torna sustentada e prolongada, ela se torna prejudicial à saúde (FERRUCI; FABBRI, 2018).

Os níveis de citocinas no sangue e no tecido nervoso são relativamente baixos em condições fisiológicas; e essa produção controlada e oportuna é necessária para a manutenção das funções normais do tecido, como: controle da sinalização celular e plasticidade sináptica. Mas, em inflamação crônica de baixo grau, ocorre aumento permanente de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α , e diminuição das anti-inflamatórias; o que contribui para o desenvolvimento de mecanismos neuropatológicos (VEZZANI & VIVIANI *et.al.*, 2015; WANG *et. a.,l* 2017).

A IL-6 tem efeitos pleiotrópicos e seu aumento está associado a inflamações crônicas, doenças autoimunes e distúrbios hematopoiéticos. O TNF- α também é uma citocina multifuncional pró-inflamatória e contribui para a produção de IL-6 (TUNG *et.al.*, 2015 b).

Nossos ensaios sobre a influência do RSV 5 μ M na atividade inflamatória sob células N2-A, mostrou resultados distintos, a saber: No Pré-estímulo verificamos que o RSV foi capaz de inibir a concentração de IL-6 tanto nas condições basal como estimulada por H₂O₂ (**Figura 25 – painel A**). Já no Pós-estímulo, observamos que em condições basais o RSV não diminuiu ou aumentou a produção de IL-6 e quando estimuladas com H₂O₂ o RSV aumentou a produção de IL-6. (**Figura 25 – painel B**). Estes resultados mostraram que a atuação dos RSV nas condições estudados tem efeitos inflamatórios distintos. Zhong & cols. mostraram um efeito inibitório do RSV sobre a liberação da IL-6 em macrófagos do peritônio de camundongos estimulados com ionóforo de cálcio A₂₃₁₈₇ e fMLP. Já estudos realizados por Wendling & cols. demonstraram que o RSV ativa a via da SIRT1 em PBMC aumentando a produção de IL-6 em pacientes com osteoartrite no joelho (ZHONG *et.al.*, 1999; WENDLING *et.al.*, 2013).

Estudos de TUNG & cols. mostraram que o RSV não foi capaz de reverter ao aumento da expressão de IL-6 e TNF- α em células hepáticas de ratos idosos (TUNG *et.al.*, 2015 b). Em contrapartida, inibiu significativamente a expressão de IL-6 em células de fibroblastos pulmonares humanos senescentes (LIU *et.al.*, 2018).

Quando analisamos a atuação do RSV sobre a produção de TNF- α verificamos um quadro distinto do observado com a IL-6. Em condições de Pré-estímulo, nossos resultados mostraram uma inibição significativa (p< 0,001) do RSV tanto em condição basal, quanto estimulada por H₂O₂ (**Figura 26 – painel A**). Estes resultados estão de acordo com trabalhos

da literatura que mostram a atuação inibitória do RSV em vários tipos celulares: endoteliais, células dendríticas, células mesenquimais, adipócitos (MOON *et. al.*, 2014, SILVA *et. al.*, 2008; ZHU *et. al.*, 2008). Este último estudo com células adiposas mostrou que o RSV inibe a ativação da síntese de DNA que ativa o complexo do NF- κ B suprimindo a atividade do TNF- α (ZHU *et al.*, 2008). Adicionalmente, estudos de Bellaver & cols. em astrócitos hipocâmpais de ratos Wistar idosos, estimulados por H₂O₂, o RSV diminuiu a expressão de TNF- α (BELLAVÉR *et.al.*, 2014).

Já quando analisamos o efeito do RSV no Pós-estímulo, observamos que este só foi capaz de inibir ($p < 0,05$) a liberação de TNF- α na condição de EO (H₂O₂) (**Figura 26 – painel B**). Estudos realizados por Wu & cols. demonstraram que o RSV inibiu a liberação de TNF- α e IL-1 no tratamento da artrite reumatóide, elucidadas por avaliações de simulação computacional e *in vitro* (WU *et al.*, 2016).

Outro ponto a ser observado é que quando se fala de “INFLAMMAGING” (inflamação crônica subclínica) não podemos nos esquecer de avaliar os mecanismos anti-inflamatórios.

A IL-10 é uma citocina imunorreguladora e anti-inflamatória clássica. Seu efeito principal é inibir a síntese de outras citocinas, como o IFN-g, IL-2, IL-12, TNF- α (CIANCIULLI *et.al.*, 2015).

Quando avaliamos a produção de IL-10 no ensaio de Pré-estímulo, verificamos que o RSV foi eficiente em aumentar ($p < 0,000,1$) a liberação da mesma tanto a nível basal, quanto estimulada com H₂O₂; gerando um ambiente de compensação anti-inflamatória (**Figura 27 – painel A**). Cianciulli & cols. desmostraram que o pré-tratamento com RSV de células da microglia e posterior estimulação com LPS foi capaz de aumentar a liberação de IL-10 (CIANCIULLI *et al.*, 2015). Estes resultados demonstram que de maneira preventiva, o RSV é eficiente em regular a resposta anti-inflamatória; propiciando uma regulação eficaz em células neurais.

Na avaliação do Pós-estímulo, observa-se que em ausência de um ambiente de estresse oxidativo (AEO)-(H₂O₂), o RSV não foi eficiente em elevar os níveis de IL-10. Por não ser necessário a ativação destes mecanismos anti-inflamatórios. Mas, quando geramos um AEO verificamos que em ausência de RSV houve uma diminuição da síntese de IL-10 mas, a presença do RSV gerou um ambiente altamente anti-inflamatório (**Figura 27 – painel B**).

Estudos de Cianciulli & cols., também demonstraram, que o RSV foi capaz de regular positivamente, de maneira dose-dependente, os níveis de IL-10; efeitos que podem ajudar a explicar a capacidade neuroprotetora desse polifenol (CIANCIULLI *et.al.*, 2015). Song & cols. elucidaram ainda, que o RSV induz a expressão de IL-10 e BV2 em condições de hipóxia cerebral (SONG *et al.*, 2014).

Outro fato que merece a nossa atenção é que o RSV 5 μ M foi capaz de ativar os mecanismos anti-inflamatórios mais eficientemente em situação de Pré-estímulo nas células N2-A, do que em condições de estresse já estabelecido (Pós-estímulo). Estes resultados, mostram que o RSV se torna uma ferramenta altamente eficiente no que tange às defesas anti-inflamatórias a nível neural. Situação ilustrada na **Figura 30**, abaixo. Estabelecendo-se como uma possível ferramenta de controle inflamatório das doenças neurodegenerativas.

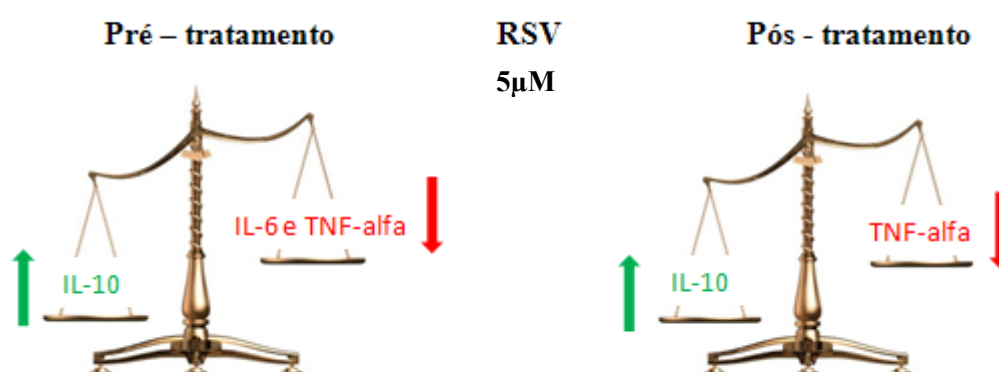


Figura 30: Mecanismo anti inflamatórios ativados pelo RSV 5 μ M em células N2-A nas perspectivas de Prevenção e Tratamento. Criado por: Lara & Chaves, 2018.

Assim, os resultados do presente estudo nos fornecem fortes evidências da capacidade antioxidante, anti-inflamatória e cito protetora do RSV na dose de 5 μ M, em células da linhagem N2-A. Devido a eficácia em diminuir a geração de ERO, aumentar a produção de NO, importante molécula sinalizadora e protetora neuronal, diminuição do ONOO $^-$, aumento da capacidade redutora e anti-oxidante celular, a atividade do mesmo ocorrer por ativação da via das SIRT1, através da modulação do complexo NF- κ B e pelos seus efeitos anti-inflamatórios. Por fim, seus efeitos benéficos são mais pronunciáveis com seu uso preventivo em células neurais.

Conclusão

7 Conclusão

Observamos neste estudo que o RSV 5 μ M em células N2-A exerce poder antioxidante, anti-inflamatório e neuro-protetor. E o mesmo ocorre majoritariamente sob a forma de Prevenção.

Referências Bibliográficas

8 Referências

ABDEL-DAIM, M.M.; ZAKHARY, N.I.; ALEYA, L.; BUNGĂU, S.G.; BOHARA, R.A.; SIDDIQI, N.J. Aging, Metabolic, and Degenerative Disorders: Biomedical Value of Antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018.

ALBERTIN, R. et.al. Quimiluminescência orgânica: alguns experimentos de demonstração para a sala de aula. *Educação*. 1998.

ALVES, G.J.; JOÃO, P. Neuroimunomodulação: sobre o diálogo entre o sistema nervoso e imune. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v.29, 363-369, 2007.

AMAZZAL, L.; LAPÔTRE, A.; QUIGNON, F.; BAGREL, D. Mangiferin protects against 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity mediated by oxidative stress in N2A cells. *Neurosci Lett*, v. 418, 159-164, 2007.

APOSTOLOVA, M.; VICTOR, V.M. Molecular Strategies for Targeting Antioxidants to Mitochondria: Therapeutic Implications. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*, v. 22, 2015.

BASTA-KAIM, A.; BUDZISZEWSKA, B.; JAWORSKA-FEIL, L.; TETICH, M.; KUBERA, M.; ET AL. Antipsychotic drugs inhibit the human corticotropin-releasing-hormone gene promoter activity in neuro-2A cells-an involvement of protein kinases. *Neuropsychopharmacology*, v.31:, 853-865, 2006.

BAUER, M.E. Stress, glucocorticoids and ageing of the immune system. *Stress*, v. 8, 69-83, 2005.

BENEDETTO, S.D.; MULLER, L.; WENGER, E.; DUZEL, S.; PAWELWC.G. Contribution of neuroinflammation and immunity to brain aging and the mitigating effects of physical and cognitive interventions. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, V. 75.) 114–128, 2017.

BUHRMANN, C.; POPPER, B.; AGGARWAL, B.B.; SHAKIBAEI, M. Resveratrol downregulates inflammatory pathway activated by lymphotoxin α (TNF- β) in articular chondrocytes: Comparison with TNF- α . *PLOS ONE*, 2017.

Burkewitz, K.; Zhang, Y.; Mair, W.B. AMPK at the Nexus of Energetics and Aging. *Cell Metab.*, V.20, 10–25, 2014.

CALDERÓN, F.H.; BONNEFONT, A.; MUÑOZ, F.J.; FERNÁNDEZ, V.; VIDELA, L.A. et. al. PC12 and neuro 2a cells have different susceptibilities to acetylcholinesterase-amyloid complexes, amyloid25-35 fragment, glutamate, and hydrogen peroxide. *J Neurosci Res*, v. 56, 620-631, 1999.

CATANA, C.S.; CALIN, J.A.; NEAGOE, I.B. Imflama-mirs in Aging and breast cancer: are they realible players? *Frontiers in medicine*, v.2, 2015.

CETRULLO, S.; D'ADAMO, S.; TANTINI, B.; BORZÌ, R.M.; FLAMIGNI, F. MTOR, AMPK, and Sirt1: Key Players in Metabolic Stress Management. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, v.25, 59-75, 2015.

CHALIMONIUK, M.; JAGSZ, S.; SADOWSKA-KREPA, E.; CHRAPUSTA, S.J. KLAPCIN, B, et al. Diversity of endurance training effects on antioxidant defenses and oxidative damage in different brain regions of adolescent male rats. *J Physiol Pharmacol*, v. 66, 539-547, 2015.

CHANDRASEKARAN, A.; IDELCHIK, M.D.P.S.; MELENDEZ, J.A. Redox control of senescence and age-related disease, *Redox Biol*, v.11:, 91-102, 2017.

CHAVES, M.M. ROCHA-VIEIRA, E.; PEREIRA DOS REIS, A.; et al. Increase of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species generated by phagocytosing granulocytes related to age. *Mech Ageing Dev*, v. 119, 1-8, 2000.

CHAVES, M.M.; COSTA, D.C.; SOUZA, D.A.; LIMA E SILVA F.D.; MACHADO, J.A. Correlation between ROS production and InsP3 released by granulocytes from type 1 diabetic patients in a cAMP-dependent manner. *Curr Aging Sci* 1: 51-55, 2008.

CHEN, Z.; YAN, P.; ZOU, L.; ZHAO, M.; et al. Using Ultrafast Responsive Phosphorescent Nanoprobe to Visualize Elevated Peroxynitrite In Vitro and In Vivo via Ratiometric and Time-Resolved Photoluminescence Imaging. *Adv. Healthcare Mater*, 2018.

CHIANG, M.C.; CHENG, Y.C.; CHEN, H.M.; LIANG, Y.J.; YEN, C.H. Rosiglitazone promotes neurite outgrowth and mitochondrial function in N2A cells via PPARgamma pathway. *Elsevier*, v. 14, 7-17, 2014.

CHIANG.; [CHUAN,y.CHENGHAN-MINCHENYAO-JENLIANG](#). Rosiglitazone promotes neurite outgrowth and mitochondrial function in N2A cells via PPARgamma pathway. *Elsevier*, v.14, 7-17, 2014.

CIANCIULLI, A. et al. IL-10 plays a pivotal role in anti-inflammatory effects of resveratrol in activated microglia cells. *International Immunopharmacology*. v. 24, 369-376, 2015.

DE LA FUENTE, M.; MIQUEL, J. Um update the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging, *Current Pharmacological Disease*, v.15, 3003-26, 2009.

DENVER, P.; MCCLEAN, P.L. Distinguishing normal brain aging from the development of Alzheimer's disease: inflammation, insulin signaling and cognition. *NEURAL REGENERATION RESEARCH*, v. 13, 1719-1730, 2018.

DESJARDINS,D.; CACHO-VALADEZ, B.; LIU, J.L.; WANG, Y. Antioxidants reveal an inverted U-shaped dose-response relationship between reactive oxygen species levels and the rate of aging in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* v.16, 104–112, 2017.

ELISIA, I.; LAM, V.; HOFSE, E.; LI, M.Y. KRYSTAL, G. Effect of age on chronic inflammation and responsiveness to bacterial and viral . *PLOS ONE*, 2017.

EVANGELOPOULOS, M.E.; et.al. A role of nitric oxide in neurite outgrowth of neuroblastoma cells triggered by mevastatin or serum reduction. *Neuroscience Letters*, V.468, 28-33, 2010.

FERRUCCI, L.; FABBRI, E. Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nature Reviews Cardiology*, v.15, 2018.

FIORENTINI, D. et al. Polyphenols as Modulators of Aquaporin Family in Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. *Hindawi Publishing Corporation*, 2015.

FLORENCE, C.C. et.al. Are There Roles for Brain Cell Senescence in Aging and Neurodegenerative Disorders? *Biogerontology*, v. 15, 643–660, 2014.

FLOYD, R.A.; HENSLEY, K. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging*, v. 23, 795-807, 2002.

FRANSCESCHI, C.; GARAGNANI, P.; VITALE, G.; CAPRI, M.; SALVIOLI, S. Inflammaging and "Garb-aging"™. *Trends in endocrinology and metabolism*, v. 28, 199-212, 2017.

FREITAS, H.R.; FERREIRA, G.C.; TREVENZOLI, I.H.; REIS, R.A. Fatty Acids, Antioxidants and Physical Activity in Brain Aging. *NUTRIENS*, V.9, 2017.

GENEVA, M; ROMAM, M.,G.; FLORES, L.C.; HUBBARD, G.B.; SALMON, A.B.; ZHANG, Y. IKENO, Y. The paradoxical role of thioredoxin on oxidative stress and aging. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.576, 32–38, 2015.

GHOSH, D., LEVAULT, K.; BARNETT, A.; BREWER, G.J. A reversible early oxidized redox state that precedes macromolecular ROS damage in aging non-transgenic and 3xTg-AD mouse neurons. *J Neurosci.*, v.32, 5821–5832, 2012.

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, 667-731, 1864.

GÜLÇİN, İ. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol*, v. 86, 345-391, 2012.

GUTTERIDGE, J. M. Ferrous-salt-promoted damage to deoxyribose and benzoate. The increase effectiveness of hydroxyl-radical scavengers in the presence of EDTA. *Biochemical Journal*, v. 243, 709-714, 1987.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews*. v. 52, 253-265, 1994.

HAO, X.; ZHANG, L.; ZHENG, X.; ZONG, W.; LIU, C. Molecular mechanism of composite nanoparticles TiO₂/WO₃/GO-induced activity changes of catalase and superoxide dismutase. *Chemico-Biological Interaction*, v. 292, 30–36, 2018.

HEFFNER, K. Neuroendocrine Effects of Stress on Immunity in the Elderly: Implications for Inflammatory Disease. *Immunol Allergy Clin North Am*. v. 31, 95–108, 2011.

HOFFMANN, J.; SPYRIDOPOULOS I. Senescent cytotoxic T cells in acute myocardial infarction: innocent bystanders or the horsemen of apocalypse? *Cellular & Molecular Immunology* v.12, 510–512, 2015.

HÖHN, A.; WEBER, D.; JUNG, T.; OTT, C.; HUGO, M. et al. Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. *Redox Biol*, v. 11, 482-501, 2016.

HÖHN, A.; WEBER, D.; JUNG, T.; OTT, C. et al. Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. *Redox Biology*, v.11,) 482–501, 2017.

HOLZEROVÁ, E.; PROKISCH, H. Mitochondria: Much ado about nothing? How dangerous is reactive oxygen species production? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 63, 16–20, 2015.

HUANG, T.; GAO, D.; JIANG, X.; HU, S.; ZHANG, L. FEI, Z. Resveratrol inhibits oxygen-glucose deprivation-induced MMP-3 expression and cell apoptosis in primary cortical cells via the NF- κ B pathway. *MOLECULAR MEDICINE REPORTS*, V. 10, 1065-1071, 2014.

Hughes, M.N.; Nicklin, H.G. The chemistry of pernitrites. Part I. Kinetics of decomposition of pernitrous acid. *Journal of the Chemical Society A: Inorganic, Physical, Theoretical*, 450-452, 1968.

IDO, Y.; DURANTON, A.; LAN, F.; WEIKEL, K.A.; BRETON, L.; RUDERMAN, N.B. Resveratrol Prevents Oxidative Stress-Induced Senescence and Proliferative Dysfunction by Activating the AMPK-FOXO3 Cascade in Cultured Primary Human Keratinocytes. *PLOS ONE*, 2015.

JÉSKO, H. WENCEL, P.; STROSZNAJDER, R.P. STROSZNAJDER, J.B. Sirtuins and Their Roles in Brain Aging and Neurodegenerative Disorders. *Neurochem Res*, v. 42, 876–890, 2017.

KARUPPAGOUNDER, S.S.; PINTO, J.T.; XU, H.; CHEN, H.L.; BEAL, M.F. et al. Dietary supplementation with resveratrol reduces plaque pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, v. 54, 111-118, 2009.

KO, J.H.; SETHI, G.; UM, J-Y.; SHANMUGAN, M.K. ARFUSO, F. The Role of Resveratrol in Cancer Therapy. *Molecular science*, 2017.

- KUMAR, V.; PANDEY, A.; JAHAN, S.; et.al. Differential responses of *Trans*- Resveratrol on proliferation of neural progenitor cells and aged rat hippocampal neurogenesis. *Nature*, 2016.
- KUMAR. A.; SINGH.S.; TRIPATH, V.K.; BISSOY,A.; GARG, G.; RIZVI, S.B. Rapamycin confers neuroprotection against aging induce oxidative-stress, mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in old rats via activation of autophagy. Rejuvenation research, v.0, lifespan in old age.*Nature Medicine*, 2018.
- LI,S. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *Molecular Science*, 2015.
- LIGUORI.; I, RUSSO, G.; CURCIO, F.; BULLI, G.; ARAN, L.; et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*, v. 13, 757-772, 2018.
- LIN, C-J; CHEN, T-H.; YANG, L-Y; SHIH,C-M. Resveratrol protects astrocytes against traumatic brain injury through inhibiting apoptotic and autophagic cell death. *Nature*, 2014.
- LIU,S. et.al. Resveratrol reduces senescence-associated secretory phenotype by SIRT1/ NF- κ B pathway in gut of the annual fish *Nothobranchius guentheri*. *Fish and Shellfish Immunology* ,v. 80,473–479, 2018.
- MAITI, D.; ISLAM, A.S.M.; SASMAL,M.; PRODHAN, C.; ALI,M. Selective sensing of nitric oxide by a 9,10-phenanthroquinone–pyridoxal based fluorophore†. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2018.
- MIRA,A.; YAMASHITA, S.; KATAKURA, Y., SHIMIZU,K. In vitro neuroprotective activities of compounds from *Angelica Shikokiana* Makino. *Molecules*, v. 16, 2015.
- MODUN, D.; GIUSTARINI, D.; TSIKAS, D. Nitric Oxide-Related Oxidative Stress and Redox Status in Health and Disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2014.
- MOON, S.O.; KIM, W.; SUNG, M.J.; LEE, S.; KANG, K.P.; KIM, D.H.; LEE, S.Y.; SO, J.N.; PARK, S.K. Resveratrol suppresses tumor necrosis factor-alpha-induced fractalkine expression in endothelial cells. *PLOS ONE*, 2014.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65,55-63, 1983.
- MURPHY, M.P.; PARTRIDGE, L. Toward a control theory analysis of aging. *Annu Rev Biochem*. V.77, 777–798, 2015.
- NAKAGAWA,T; GUARENTE,L. Sirtuins at a glance. *Journal of Cell Science*,v. 124, 833-838, 2011.
- NAMSI, A.; NURY, T.; HANDOUNI, H.; YAMMINE,A. et.al. Induction of Neuronal Differentiation of Murine N2a Cells by Two Polyphenols Present in the Mediterranean Diet Mimicking Neurotrophins Activities: Resveratrol and Apigenin. *Diseases*, 2018.
- NICOLAI, S.; ROSSI, A.; DI DANIELE, N.; MELINO, G. DNA repair and aging: the impact of the p53 family. *Aging* ,v.7, 1050-1065, 2015.

NOGUEIRA-MACHADO, J. A. et al. Modulation of the production of reactive oxygen species (ROS) by cAMP-elevating agents in granulocytes from diabetic patients: na Akt/PKB-dependent phenomenon. *Diabetes & Metabolism*, v. 32, 331-335, 2006.

OLAS, B.; WACHOWICZ, B.; NOVACK, P.; BALD, E. 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.24,331–340, 2008.

OLIVEIRA, B. F.; NOGUEIRA-MACHADO, J. A.; CHAVES, M. M. The role of oxidative stress in the aging process. *The Scientific World Journal*, v. 10, 1121-1128, 2010.

PATEL, M.I.; GUPTA, A.; DEY, C.S. Potentiation of neuronal insulin signaling and glucose uptake by resveratrol: the involvement of AMPK. *Pharmacological reports*, v.63, 1162-1168, 2011.

PATEL, M. et al. Potentiation of neuronal insulin signaling and glucose uptake by resveratrol: the involvement of AMPK. *Pharmacological Reports*.v.63,1162-1168,2011.

PATTERSON, S. Immune dysregulation and cognitive vulnerability in the aging brain: Interactions of microglia, IL-1b, BDNF and synaptic plasticity. *Neuropharmacology*, v. 96. 11-18, 2015.

PENG, C.; WANG, X.; CHEN, J. JIAO, R. et al. Biology of Ageing and Role of Dietary Antioxidants. *BioMed Research International*, 2014.

PEREIRA, A. et al. Envelhecimento, estresse e sociedade: uma visão psiconeuroendócrinológica. *Ciências e Cognição*. V.1, 34-53, 2004.

RASHTBARI, S.; DEHGHAN, G.; YEKTA, R.,; JOUYBAN, A.; IRANSHAHI, M. Effects of Resveratrol on the Structure and Catalytic Function of Bovine Liver catalase (BLC): Spectroscopic and Theoretical Studies. *Adv Pharm Bull*, v. 7, 349-357, 2017.

REN, X. et al. Quantitative Nuclear Proteomics Identifies that miR-137-mediated EZH2 Reduction Regulate Resveratrol-induced Apoptosis of Neuroblastoma Cells. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2015.

RIZZO, A, M. et al. Endogenous antioxidants and radical scavengers. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. v. 698, 52-67, 2011.

ROZAS, E. E.; FREITAS, J. C. Intracellular Increase of Glutamate in Neuroblastoma Cells Induced by Polar Substances of *Galaxaura Arginata* (Rhodophyta, Nemaliales). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 18, 53-62, 2008.

SADOWSKA-BARTOSZ, I.; BARTOSZ, G. Effect of Antioxidants Supplementation on Aging and Longevity. *BioMed Research International*, 2014.

SALMINEN, L.E.; PAUL, R.H.. Oxidative stress and genetic markers of suboptimal antioxidant defense in the aging brain: a theoretical review. *Rev. Neurosci*. v. 25, 805-819, 2014.

- SAMMER,S. et al. The molecular targets of resveratrol. *Biochim. Biophys. Acta*, 2014.
- SARUBBO, F.; STEBAN, F. MIRALLES,A.; MORANTE, D. Effects of Resveratrol and other Polyphenols on Sirt1: Relevance to BrainFunction During Aging. *Current Neuropharmacology*, 16, 126-136, 2018.
- SAS, K.; SZABÓ, E.; VÉCSEI, L. SCHAFFER, T.K.; WOHLNBERG, MF.; MEDEIROS, N.; MARTINS, J.B.; AGOSTINI, F.; et al. Mitochondria, Oxidative Stress and the Kynurenine Evaluation of antioxidant activity of grapevine leaves extracts (*Vitis labrusca*) in liver of Wistar rats. *An Acad Bras Cienc*,v. 88, 187-196, 2016.
- SELVARATNAM, J.; ROBAIRE,B. Effects of Aging and Oxidative Stress on Spermatozoa of Superoxide-Dismutase 1- and Catalase-Null Mice. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* V.95, 1–13, 2016.
- SENEGAS, A.; GAUTHERON, J.; COURTOIS, G. IKK-related genetic diseases: probing NF- κ B functions in humans and other matters. [*Cellular and Molecular Life Sciences*](#), v.72, 1275–1287, 2015.
- SILVA, A.M. et.al. Resveratrol as a Natural Anti-Tumor Necrosis Factor- α Molecule: Implications to Dendritic Cells and Their Crosstalk with Mesenchymal Stromal Cells. *Biochem Biophys Res Commun*,.v. 369, 471-477, 2014.
- SIMÃO, F.; PAGNUSSAT, A.S.; SEO, .JH.; NAVARATNA, D.; LEUNG, W. ET AL. Pro-angiogenic effects of resveratrol in brain endothelial cells: nitric oxide-mediated regulation of vascular endothelial growth factor and metalloproteinases. *J Cereb Blood Flow Metab* v.32, 884-895, 2012.
- SKRAJNOWSKA,D.; BOBROWSKA-KORCZAK, B.; TOKARZ, A.; BIALEK, S.; JEZIERSKA, E.; MAKOWSKA, J. Copper and Resveratrol Attenuates Serum Catalase, Glutathione Peroxidase, and Element Values in Rats with DMBA-Induced Mammary Carcinogenesis. *Biol Trace Elem Res*, v.156, 271–278, 2013.
- SONG, J., CHEON, S.Y., JUNG, W., LEE, W.T., LEE, J.E. Resveratrol induces the expression of interleukin-10 and brain-derived neurotrophic factor in BV2 microglia under hypoxia. *Int J Mol Sci*. v.15,15512-29, 2014.
- SOUSA,M.S.B.; HOLANDA, I.M.S.; MONTEIRO, H.M.C.;SANTOS, A.A.S. Antioxidant extract counteracts the effects of aging on cortical spreading depression and oxidative stress in the brain cortex. *Acta Cir Bras*,.v.33,472-482, 2018.
- SUN, QI. et.al. Antiperoxynitrite Treatment Ameliorates Vasorelaxation of Resistance Arteries in Aging Rats: Involvement With Protection of Circulating Endothelial Progenitor Cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, v.68, Number 5, November 2016.
- THATCHER, G.R.; BENNETT, B.M. REYNOLDS, J.N .NO chimeras as therapeutic agents in Alzheimer’s disease. *Curr Alzheimer Res*,v. 3, 237-245, 2006.

THATCHER, G.R.; BENNETT, B.M.; REYNOLDS, J.N. NO chimeras as therapeutic agents in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, v.3: 237-245, 2006.

TOTH, P. et al. Resveratrol treatment rescues neurovascular coupling in aged mice: role of TRUONG, V-L.; JUN, M.; JEONG, W-S. Role of resveratrol in regulation of cellular defense systems against oxidative stress. *BioFactors*, 2018.

TUNG, B.T. et al. Organ and tissue-dependent effect of resveratrol and exercise on antioxidant defenses of old mice. *Aging Clin Exp Res*, v. 27, 775–783, 2015.

TUNG, B.T.; BIES, E.R.; TALERO, E.; GAMERO-ESTEVEZ, E. LÓPEZ-LLUCH, G. Anti-inflammatory effect of resveratrol in old mice liver. *Experimental Gerontology*, v. 64, 1–7, 2015.

TURRENS, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, v. 552, 335-344, 2003.

VALEZ, V. et al. Peroxynitrite formation in nitric oxide-exposed submitochondrial particles: Detection, oxidative damage and catalytic removal by Mn-porphyrins. *Arch Biochem Biophys*, v. 529, 45–54, 2013.

VEZZANNI, A.; VIVIANI, B. Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. *Neuropharmacology*, v. 96. 70-82, 2015.

VITALE, G.; SALVIOLI, S.; FRANCESCHI, C. Oxidative stress and the ageing endocrine system. *Nat Rev Endocrinol*, v. 9:, 228-40, 2013.

WANG, D. et al. Forced but not free-choice nicotine during lactation Alters maternal behavior and noradrenergic system of pups: impact on social behavior of adolescent isolated male rats. *Neuroscience*, 2017.

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

WENDLING, D.; ABBAS, W.; VALNET, M-G.; GUILLOT, X.; KHAN, K.A.; CEDOZ, J.P.; BAUDI, L.; PRATI, C. HERBEIN, G. Resveratrol, a sirtuin 1 activator, increases IL-6 production by peripheral blood mononuclear cells of patients with knee osteoarthritis. *Clinical Epigenetics*, 2013.

WILHELM, I. et al. Role of pattern recognition receptors of the neurovascular unit in inflamm-aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* v.313, 1000–1012, 2017.

WU, J. et al. Resveratrol inhibition of TNF- α and IL-1 for treatment of rheumatoid arthritis: from In-Silico to In-vitro elucidation. *Int J Clin Exp Med*, v.9, 745-752, 2016.

XIA, M.; FORSTERMMAN, U.; LI, H. Resveratrol and endothelial nitric oxide. *Molecules*, 2014.

XU, M.; Pirtskhalava, T.; Farr, J. et.al. Senolytics improve physical function and increase lifespan in old mice. *Nature*, 2018.

ZHONG, M.G.F.; et.al. Inhibitory effect of resveratrol on interleukin 6 release by stimulated peritoneal macrophages of mice. *Phytomedicine*, v.6, 79-84, 1999.

ZHU, J.; YONG,W.; WU, X.; YU, Y.; LV, J.; LIU, C.; MAO, X.; ZHU, Y.; XU, K.; HAN, X.; LIU, C. Anti-inflammatory effect of resveratrol on TNF-alpha-induced MCP-1 expression in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. v.369,471-7,2008.