



CAMILA AMARO CALDEIRA

**RESVERATROL: MUDANÇA DO PADRÃO DE SINALIZAÇÃO DA SIRT 1 E AMPK  
DURANTE O PROCESSO DE ENVELHECIMENTO**

Belo Horizonte,  
Minas Gerais-Brasil  
Março-2019

CAMILA AMARO CALDEIRA

**RESVERATROL: MUDANÇA DO PADRÃO DE SINALIZAÇÃO DA SIRT 1 E AMPK  
DURANTE O PROCESSO DE ENVELHECIMENTO**

Orientador: Profa. Dra. Miriam Chaves Schultz

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

Universidade Federal de Minas Gerais,  
Belo Horizonte  
Março-2019



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



**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE CAMILA AMARO CALDEIRA.** Aos vinte e sete dias do mês de março de 2019 às 10:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado ""Resveratrol: mudança do padrão de sinalização da SIRT 1 e AMPK durante o processo de envelhecimento"", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Miriam Chaves Schultz, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Maria Lucia Pedrosa (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Erich Birelli Tahara (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Miriam Chaves Schultz - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA  
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 27 de março de 2019.

Dra. Maria Lucia Pedrosa (UFMG)

Dr. Erich Birelli Tahara (UFMG)

Dr. Miriam Chaves Schultz - Orientadora (UFMG)

Prof.<sup>a</sup> Leda Quércia Vieira  
 Coordenadora do Curso de Pós Graduação  
 em Bioquímica e Imunologia  
 ICB - UFMG

*Aos meus avôs Chiquita, Marli e Mauro  
que já se foram, mas as experiências e o  
carinho compartilhados permanecem.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ser meu companheiro constante nessa jornada. Muito obrigada por me confortar nos momentos desafiadores e me fornecer a clareza que os desafios só existem para meu amadurecimento e evolução. Obrigada por me iluminar e abençoar com momentos especiais e com pessoas incríveis.

Aos meus pais, Jaqueline e Aldegyo, e meu irmão, Bernardo. Vocês são meus tesouros nessa vida. Meus exemplos de valores e condutas. Muito obrigada por tudo que me ofereceram, pelo apoio, respeito e principalmente pelo amor compartilhado.

À minha orientadora Miriam por ter me oferecido essa oportunidade de crescimento profissional e pessoal. Por me orientar, ter confiança na minha capacidade, pelos ensinamentos e pelo apoio em todos os momentos.

Às minhas amigas do Laboratório de Bioquímica do Envelhecimento e Doenças Correlacionadas, Milena, Glaucy, Raquel, Luciana, Alessandra, Taísa e Gláucia. Não consigo imaginar minha caminhada pelo Mestrado sem a presença de vocês. Sou muito grata e sortuda por ter pessoas tão maravilhosas que cruzaram minha vida e que me ensinaram tanto. Milena, minha companheira por esses 2 anos. Você alegrou meus dias. Obrigada por me ensinar a ver a vida com mais leveza e alegria. Por me ouvir sem nenhum julgamento e me acolher. Obrigada pela amizade linda. Você é uma força da natureza que tem o mundo como destino. Glaucy, nem tenho palavras para o quanto você se tornou especial na minha vida. Sou tão grata por ter te conhecido. Além de ser uma profissional excepcional (uma honra ter conhecido alguém tão apaixonada, talentosa, esforçada e correta), é uma pessoa incrível (carinhosa, engraçada e de uma sensibilidade linda). Você vai longe nessa vida profissional e te desejo só felicidade e amor em todos os âmbitos da sua vida. Uma das pessoas mais altruístas que já conheci, é uma inspiração. Raquel, sou tão grata pelo seu carinho, pela sua ajuda nos momentos cruciais e pelos conselhos. Seu amor com sua família é lindo e emocionante. Sou muito feliz de ter cruzado seu caminho e ser uma das pessoas que recebe sua amizade. Te desejo muito sucesso e muito, muito amor. Luciana, uma inspiração de ser humano. Com uma espiritualidade tão elevada. De uma resiliência incrível e de uma delicadeza e carinho tocantes. Muito obrigada pelo seu apoio, por me ouvir e me acolher nos momentos difíceis. Obrigada por me mostrar que com fé somos capazes de tudo.

Você é incrível e um exemplo. Continue com essa essência pura, boa, forte e altruísta. E sempre vendo os desafios como forma de evolução. Alessandra, que pessoa mais carismática e alegre. Nesses poucos meses que nos conhecemos, você se tornou uma pessoa muito querida para mim e pela qual me identifiquei muito. Com uma jovialidade admirável. E uma guerreira. Persista que você vai longe. Obrigada pelos conselhos e ensinamentos. Taísa, uma das pessoas mais esforçadas que conheço e de uma doçura ímpar. Obrigada pelos momentos compartilhados e ensinamentos oferecidos. Gláucia, desde que te conheci senti uma conexão especial. Que pessoa maravilhosa que você é. Sou muito grata por toda a ajuda e ensinamentos que compartilhou comigo, tanto no âmbito profissional, quanto no pessoal. Transborda sabedoria e integridade. Muito obrigada por redespertar minha espiritualidade.

À professora Eliane pelas conversas, gentileza e respeito.

Ao Paulo, pelas risadas e ajuda essencial. À Mari e ao Marcelo pela ajuda, paciência e boa vontade.

E às melhores amigas que alguém pode ter: Thaís e Jéssica. Não acredito que já fazem quase sete anos que nos conhecemos. E quem diria que aquelas pessoas seriam tão especiais na minha vida. Muito obrigada pelo apoio, conselhos, carinho, respeito, confiança e lealdade. Mesmo não estando perto, vocês são uma presença constante na minha vida e espero que continuem sendo por muito tempo.

**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, CAPES, CNPq, PRPq-UFMG e IVC testes em saúde humana.



*“Viva como se fosse morrer amanhã.  
Aprenda como se fosse viver para sempre”.*

*(Mahatma Gandhi).*

## RESUMO

O envelhecimento é causado primariamente pelo dano gerado pelos Radicais livres (RL). A teoria dos RL do envelhecimento postula que reações com essas espécies estão envolvidas com desordens relacionadas à idade, como o estresse metabólico celular. O Resveratrol (RSV), um composto polifenólico tem mostrado funcionar como antioxidante, antiinflamatório, anti câncer e anti diabético. No presente estudo, o objetivo é verificamos em um ambiente de estresse oxidativo (EO) em células Mononucleares Humanas de doadores de Meia idade e Idosos, a existência de mudança do padrão de sinalização da SIRT1 e AMPK pelo RSV. No ensaio de Quimioluminescência dependente de Luminol, nas duas faixas etárias houve redução significativa das espécies reativas de oxigênio (ERO) nas células estimuladas com o RSV. Observou-se que no grupo dos Idosos, há uma maior produção de ERO e que a redução proveniente do RSV foi menor comparando com o outro grupo. Resultados similares aos encontrados no Ensaio Qualitativo de Microscopia de Fluorescência. No ensaio de produção de Óxido Nítrico (NO), não foi observada alteração da quantidade deste em células expostas ao peróxido ( $H_2O_2$ ) e/ou estimuladas com o RSV no grupo de Meia idade. Já nos Idosos, observou-se uma diminuição (não significativa) da quantidade de NO nas células expostas ao  $H_2O_2$  que foi restaurada pelo estímulo com o RSV. Não foi observada alteração da atividade da Catalase nas células das duas faixas etárias expostas ao  $H_2O_2$  e/ou estimuladas com o RSV. Resultado semelhante ao observado para a atividade da Superóxido dismutase para a Meia idade. Para os Idosos, houve tendência de aumento da atividade dessa enzima em células expostas ao RSV. Pelo ensaio de Quimioluminescência dependente de Luminol na ausência ou presença dos inibidores Sirtinol (para SIRT1) e Compound C (para AMPK), observou-se que, para o grupo de Meia idade, as duas vias tem caráter antioxidante e o RSV age pela via da SIRT1. Nos Idosos, a via da SIRT1 continua sendo antioxidante, porém o caráter antioxidante da via de AMPK é silenciado. O RSV cessa sua atuação pela via da SIRT1. Observamos nesse estudo que o RSV tem uma função antioxidante nas PMBC das duas faixas etárias, também observamos que no envelhecimento há uma mudança no contexto celular caracterizada pelo silenciamento do caráter antioxidante da via AMPK e há alteração da atuação do RSV, já que sua influência na via da SIRT1 é cessada.

Palavras chave: Resveratrol. Envelhecimento. Estresse Oxidativo. SIRT1. AMPK.

## ABSTRACT

Aging is primarily caused by the damage generated by free radicals (FR). The FR theory of aging postulates that reactions with these species are involved with age-related disorders, such as cellular metabolic stress. Resveratrol (RSV), a polyphenolic compound has been shown to function as an antioxidant, anti-inflammatory, anti-cancer, anti-diabetic. In the present study, the objective is to verify in an environment of oxidative stress (OS) in Human Mononuclear Cells of Middle aged and Elderly donors the existence of a change in the signaling pattern of SIRT1 and AMPK by RSV. In the Luminol-dependent chemiluminescence assay in the two age groups there was a significant reduction of the reactive oxygen species (ROS) in the cells stimulated with RSV. It was observed that in the Elderly group, there is a greater production of ROS and that this reduction from RSV was smaller compared to the other group. Results similar to those found in the Qualitative Fluorescence Microscopy Assay. In the Nitric Oxide (NO) test, there was no change in the amount of Nitric Oxide in peroxide ( $H_2O_2$ )-exposed cells and/or RSV-stimulated cells in the Middle age group. In the Elderly, a decrease (not significant) in the amount of NO was observed in cells exposed to the  $H_2O_2$  that was restored by the stimulus with RSV. No change in Catalase activity was observed in the cells of the two age groups exposed to  $H_2O_2$  and /or stimulated with RSV. A similar result was observed for the activity of Superoxide dismutase for Middle age. For the Elderly, there was an increase (not significant) in this activity in cells exposed to RSV. By the Luminol-dependent chemiluminescence assay in the absence or presence of the inhibitors Sirtinol (for SIRT1) and Compound C (for AMPK), it was observed that for the Middle age group, the two routes have an antioxidant character and RSV acts via the SIRT1. In the Elderly, the SIRT1 pathway remains an antioxidant, but the antioxidant character of the AMPK pathway is silenced. RSV ceases to operate via SIRT1. We observed in this study that in aging there is a change in the cellular context characterized by the silencing of the antioxidant character of the AMPK pathway and there is alteration in the performance of the RSV, since its influence on the pathway of SIRT1 is ceased.

Keywords: Resveratrol. Aging. Oxidative stress. SIRT1. AMPK.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação gráfica da evolução das faixas etárias na população mundial em 2000 e uma projeção para 2035..	19
<b>Figura 2:</b> Comparação entre um RL e uma molécula estável..	22
<b>Figura 3:</b> Exemplos de ERO...	23
<b>Figura 4:</b> Representação da cadeia transportadora de elétrons e seus complexos produtores de $O_2^{\bullet-}$ ..	25
<b>Figura 5:</b> Fatores exógenos responsáveis pela formação de RL.....	26
<b>Figura 6:</b> Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.....	27
<b>Figura 7:</b> Principais antioxidantes enzimáticos. ....	28
<b>Figura 8:</b> Representação da formação do EO .....	30
<b>Figura 9:</b> Consequências do excesso de RL (EO) .....	31
<b>Figura 10:</b> Estrutura química da molécula de RSV .....	32
<b>Figura 11:</b> Alvos da SIRT 1.....	35
<b>Figura 12:</b> Interação entre as vias de SIRT 1 e AMPK. ....	36
<b>Figura 13:</b> Novo mecanismo de interação entre as vias de SIRT1 e AMPK e o RSV .....	37
<b>Figura 14 :</b> Alvos de AMPK. ....	41
<b>Figura 15:</b> Curva Concentração-Resposta de $H_2O_2$ em PBMC da faixa etária de 20-39 anos. ....	58
<b>Figura 16:</b> Avaliação da produção de ERO induzida pelo $H_2O_2$ em PBMC da faixa etária de 20-39 anos. ....	60
<b>Figura 17:</b> Avaliação da produção de NO induzida pelo $H_2O_2$ em PBMC da faixa etária de 20-39 anos.....	61
<b>Figura 18:</b> Curva Concentração-Resposta de RSV em Leucócitos Humanos... ..	62
<b>Figura 19:</b> Avaliação da viabilidade das PBMC expostas ao RSV 5 $\mu$ M e $H_2O_2$ 0,64 % v/v.....	63
<b>Figura 20:</b> Avaliação do efeito do RSV na produção de ERO em PBMC induzidas por $H_2O_2$ .....	65
<b>Figura 21:</b> Representação qualitativa da produção de ERO em PBMC de Meia idade estimuladas com RSV.....	67

<b>Figura 22:</b> Representação qualitativa da produção de ERO em PBMC de Idosos estimuladas com RSV.....	68
<b>Figura 23:</b> Avaliação comparativa do efeito do RSV na produção de NO em PBMC.....	70
<b>Figura 24:</b> Avaliação comparativa do efeito do RSV na atividade da CAT em PBMC .....	71
<b>Figura 25:</b> Avaliação comparativa do efeito do RSV na atividade da SOD em PBMC.....	72
<b>Figura 26:</b> Avaliação comparativa do efeito do RSV sob a via de SIRT1 na produção de ERO em PBMC induzidas por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	74
<b>Figura 27:</b> Avaliação comparativa do efeito do RSV sob a via de AMPK na produção de ERO em PBMC induzidas por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	77
<b>Figura 28:</b> Hipótese da interação entre as vias de SIRT1 e AMPK. ....	93

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Características Demográficas da população .....	48
<b>Tabela 2 :</b> Disposição dos grupos e seus tratamentos no Ensaio de MTT em PBMC .....	51
<b>Tabela 3:</b> Disposição dos grupos e seus tratamentos no Ensaio de Quimioluminescência em PBMC .....	51
<b>Tabela 4:</b> Disposição dos grupos controles sem células no Ensaio de Quimioluminescência em PBMC .....	52
<b>Tabela 5:</b> Disposição dos grupos e seus tratamentos na Análise Qualitativa de ERO por Microscopia de Fluorescência em PBMC .....	53
<b>Tabela 6:</b> Disposição dos grupos e seus tratamentos na Análise de produção de NO em PBMC.....	54
<b>Tabela 7:</b> Disposição dos grupos e seus tratamentos na Avaliação da atividade da CAT em PBMC.....	55
<b>Tabela 8:</b> Disposição dos grupos controles com inibidor sem células e seus tratamentos no Ensaio de Quimioluminescência.....	57
<b>Tabela 9:</b> Disposição dos grupos com inibidor e seus tratamentos no Ensaio de Quimioluminescência em PBMC .....	57
<b>Tabela 10:</b> Controles sem células/com células no Ensaio de Quimioluminescência .....	64
<b>Tabela 11:</b> Análise comparativa entre as duas faixas etárias do efeito do RSV .....	65
<b>Tabela 12:</b> Viabilidade Celular obtida através do teste de Azul de Tripan dos grupos do ensaio de NO.....	69
<b>Tabela 13:</b> Análise comparativa entre as duas faixas etárias do efeito do RSV na atividade da SOD .....	73
<b>Tabela 14:</b> Controles sem células/com células no Ensaio de Quimioluminescência com o Inibidor da via SIRT1 .....	73
<b>Tabela 15:</b> Controles sem células/ com células no Ensaio de Quimioluminescência com o Inibidor da via AMPK .....	76
<b>Tabela 16:</b> Avaliação comparativa do efeito do RSV nas duas faixas etárias em PBMC .....	92

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína cinase ativada por adenosina monofosfato
ARE	Elemento de resposta antioxidante
ATP	Adenosina trifosfato
CAMKK2	Cinase ativada por $Ca^{2+}$ (Cálcio)/calmodulina
cAMP	Adenosina-monofosfato-cíclico
CAT	Catalase
CBP	Proteína de ligação a CREB
CREB	Elemento de resposta a adenosina-monofosfato-cíclico
CRTC2	Coativador 2 de transcrição regulado pela ligação do elemento de resposta a adenosina-monofosfato-cíclico
DMSO	Dimetilsulfoxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EO	Estresse oxidativo
Epac 1	Fator de troca do nucleotídeo guanina dependente de cAMP
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FOXO	Fatores de transcrição Forkhead box
GSH	Glutathiona
GSHPx	Glutathiona peroxidase
GSR	Glutathiona redutase
GST	Glutathiona S-transferase
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HO <sub>2</sub> <sup>·</sup>	Radical hidroperoxil
iNOS	Oxido nítrico sintase induzida
LKB1	Cinase supressor de tumor
Luminol	5-amino-2,3-dihydro-1,4phthalozinedione
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MFF	Fator de fisão mitocondrial



mTOR	Alvo mamífero de rapamicina
mTOR1	Complexo 1 de alvo mamífero de rapamicina
MTT	3-(4,5 dimethylazol-2yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide
NAD <sup>+</sup>	Dinucleotídeo de adenina nicotinamida (oxidado)
NADH	Dinucleotídeo de adenina nicotinamida (reduzido)
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
Nfe2	Fator nuclear eritróide 2
NF-κB	Fator nuclear Kb
NO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Dióxido de nitrogênio
Nrf2	Fator nuclear derivado de eritróide 2
O <sub>2</sub>	Oxigênio
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Ânion superóxido
OH <sup>•</sup>	Radical hidroxil
NO <sup>•</sup>	Óxido nítrico
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
p300	Histona acetiltransferase
P53	Fosfoproteína nuclear de 53 quilo Daltons
PBMC	Células mononucleares humanas de sangue periférico
PBS	Solução tampão fosfato salina sem células e magnésio
PDE	Enzimas fosfodiesterases
PFA	Paraformaldeído
PGC-1a	Coativador de receptor g ativado por proliferador de peroxissomo
PI3K	Cinase fosfoinositol 3
PKA	Proteína Cinase A
Raptor	Proteína regulatória associada a mTOR
RL	Radicais livres
RSV	Resveratrol (3,5,4'-trihidroxi-trans-estilbeno)
SIRT	Proteínas sirtuinas
SOD	Superóxido dismutase
Thr	Tirosina
ULK1	Cinase essencial para a indução da autofagia
VEGF	Fator de crescimento celular endotelial vascular
XO	Xantina oxidase

## SUMÁRIO

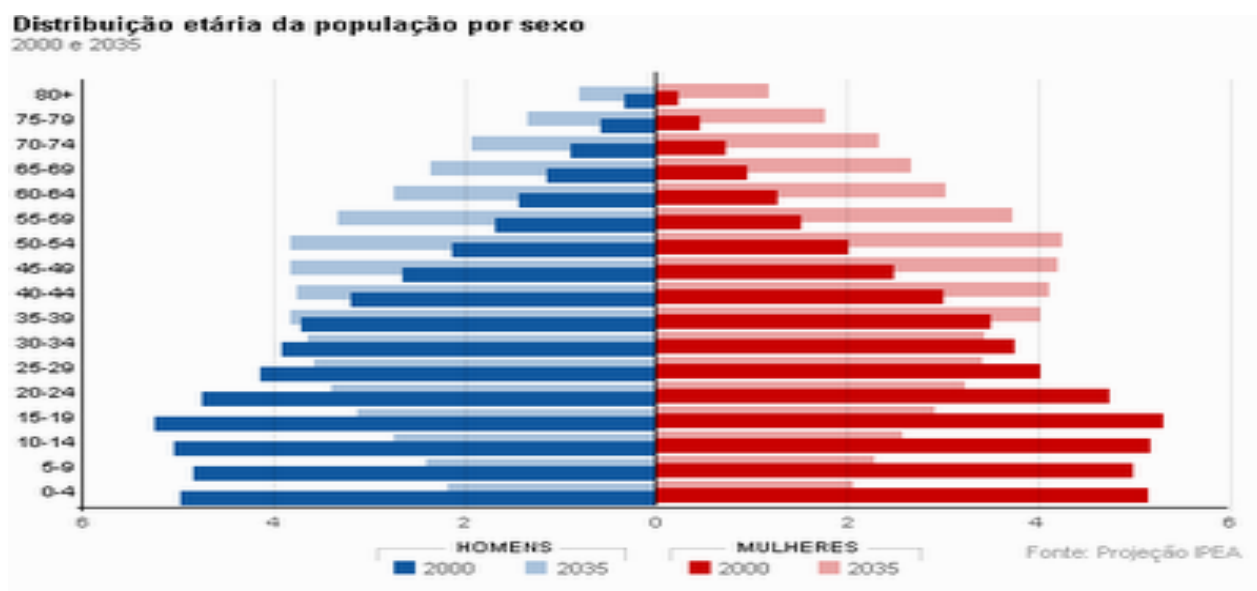
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	43
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	43
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	43
<i>2.2.1 Avaliação dos compartimentos oxidativos e redutores</i> .....	43
<i>2.2.2 Avaliação da atividade da CAT e SOD</i> .....	43
<i>2.2.3 Avaliação de vias de sinalização na liberação de ERO</i> .....	43
<i>2.2.4 Avaliação da Viabilidade Celular através de MTT</i> .....	43
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	44
<b>3.1 Equipamentos</b> .....	44
<b>3.2 Reagentes</b> .....	44
<b>3.3 Kits Comerciais</b> .....	44
<b>3.4 Preparo das soluções</b> .....	45
<b>3.5 Seleção de Doadores</b> .....	47
<b>3.6 Obtenção de PBMC</b> .....	49
<b>3.7 Ensaio para Definição da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizada no estudo</b> .....	49
<b>3.8 Ensaio de Exclusão pelo Azul de Trypan da Viabilidade Celular</b> ....	49
<b>3.9 Ensaio para Definição da concentração de RSV utilizada no estudo</b> .....	50
<b>3.10 Ensaio de MTT</b> .....	50
<b>3.11 Ensaio de Quimioluminescência</b> .....	51
<b>3.12 Análise Qualitativa de ERO por Microscopia de Fluorescência</b> ....	52
<b>3.13 Produção de NO pela “Reação de Griess”</b> .....	53
<b>3.14 Avaliação da atividade da CAT</b> .....	54
<b>3.15 Avaliação da atividade da SOD</b> .....	55

3.16 Quimioluminescência com inibidores da via de SIRT1 (Sirtinol) e de AMPk (Dorsomorphin/Compound C).....	56
3.17 Análise estatística .....	57
4 RESULTADOS .....	58
4.1 Padronização através da Curva Concentração-Resposta da Concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> utilizada em PBMC .....	58
4.2 Padronização através da Curva Concentração-Resposta da Concentração de RSV utilizada em Leucócitos Humanos .....	61
4.3 Viabilidade das PBMC aos tratamentos .....	62
4.4 Avaliação Comparativa por Quimioluminescência dependente de Luminol do efeito do RSV nas faixas etárias de Meia idade e Idosos .....	64
4.5 Avaliação Comparativa qualitativa por Microscopia de Fluorescência do efeito do RSV nas faixas etárias de Meia Idade e Idosos... ..	66
4.6 Avaliação Comparativa pelo método de <i>GRIESS</i> do efeito do RSV nas faixas etárias de Meia Idade e Idosos .....	69
4.7 Avaliação Comparativa do efeito do RSV nas faixas etárias de Meia Idade e Idosos sobre a atividade da CAT .....	70
4.8 Avaliação Comparativa do efeito do RSV nas faixas etárias de Meia Idade e Idosos sobre a atividade da SOD .....	71
4.9 Avaliação Comparativa por Quimioluminescência dependente de Luminol do efeito do RSV nas faixas etárias de Meia idade e Idosos na via da SIRT1 .....	73
4.10 Avaliação Comparativa por Quimioluminescência dependente de Luminol do efeito do RSV nas faixas etárias de Meia idade e Idosos na via de AMPK .....	75
5 DISCUSSÃO .....	79
6 CONCLUSÃO.....	94
REFERÊNCIAS .....	95

## 1 INTRODUÇÃO

A demografia populacional da maioria dos países ocidentais está mudando rapidamente. A proporção de indivíduos mais velhos está aumentando rapidamente, devido a diminuição das taxas de nascimento e o declínio da mortalidade (MARTIN; SHEAFF, 2007). A mortalidade tem sido retardada consideravelmente como resultado não só de avanços revolucionários em atrasar o processo de envelhecimento, mas também devido ao progresso contínuo de melhoria da saúde (VAUPEL, 2010).

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 ( $\geq 60$  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** do Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA) ilustra a situação etária mundial em 2000 e as projeções para 2035 por sexo.



**Figura 1: Representação gráfica da evolução das faixas etárias na população mundial em 2000 e uma projeção para 2035. Fonte: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), 2008.**

---

Com o aumento da idade, o estado da saúde e as demandas médicas mudam de maneira correspondente, enquanto acompanham o desenvolvimento social e econômico, a melhoria na renda e o progresso tecnológico médico; o impacto do envelhecimento populacional nas despesas médicas tem se tornado um desafio enorme para o sistema de saúde (WANG *et al.*, 2017).

Coletivamente, as doenças associadas ao envelhecimento são responsáveis pela maior parte dos gastos na área da saúde em países industrializados já que permanecem mal caracterizadas, mal diagnosticadas e com tratamento inadequado (BULLONE; LAVOIE, 2017).

O envelhecimento é definido amplamente como um processo multifatorial relacionado a um declínio progressivo e dependente do tempo em organismos vivos da função celular e dos órgãos, levando a uma maior vulnerabilidade a doenças crônicas e a morte. Nove candidatos a marcadores de envelhecimento de mamíferos foram recentemente identificados e classificados em três categorias: os marcadores primários (instabilidade genômica, desgaste de telômeros, alterações epigenéticas e perda de proteostasis), os marcadores antagônicos (disfunção mitocondrial, sensor desregulado e senescência celular) e os marcadores integrativos (exaustão das células tronco e comunicação intercelular alterada). Cada marcador deve cumprir idealmente os critérios a seguir: (1) devem se manifestar no envelhecimento normal; (2) seu agravamento experimental deve acelerar o envelhecimento; (3) sua melhoria experimental deve retardar o processo de envelhecimento normal e assim aumentar a longevidade ( LÓPEZ-OTÍN *et al.*, 2013).

Os marcadores primários são a causa principal de dano molecular inerente ao envelhecimento. Os marcadores antagônicos medeiam efeitos benéficos em baixos níveis e protegem o organismo de dano e escassez de nutrientes porém se tornam deletérios em altos níveis. Esse é o caso da senescência, que protege o organismo do câncer mas em excesso pode promover o envelhecimento. Similarmente, as espécies reativas de oxigênio (ERO) medeiam a sinalização celular e a sobrevivência, mas em níveis elevados crônicos podem produzir dano celular. Finalmente, os marcadores integrativos são os responsáveis pelo envelhecimento e surgem quando o dano acumulado não pode ser compensado por mecanismos

---

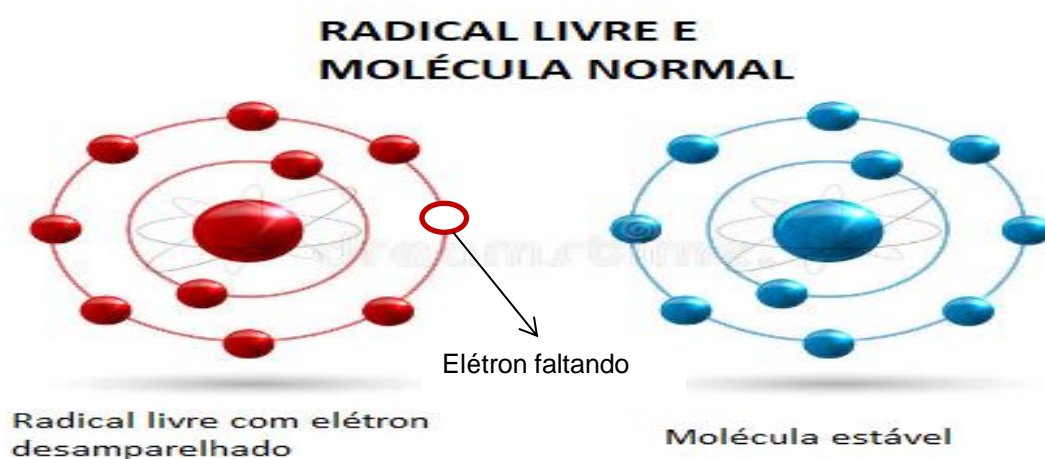
homeostáticos. Os marcadores primários podem ser os gatilhos iniciais cuja as consequências dos danos progressivamente acumulam com o tempo. Os marcadores antagônicos são parcialmente promovidos ou acelerados pelos marcadores primários. Finalmente, os marcadores integrativos surgem quando o dano acumulado causado pelos marcadores primários e antagônicos não pode ser compensado por mecanismos homeostáticos tissulares (LÓPEZ-OTÍN *et al.*, 2016).

A teoria dos Radicais livres (RL) ou a teoria do estresse oxidativo (EO) do envelhecimento foi proposta por Denham Harman em 1956. De acordo com ela os organismos envelhecem porque eles acumulam dano oxidativo. Esse dano é proveniente das ERO, que são metabólitos parcialmente reduzidos do oxigênio molecular gerados como produtos de reações metabólicas ou como subprodutos de vários processos celulares, como a respiração. Baseado nesse conceito, a formação fisiológica de ERO durante o metabolismo celular produz dano oxidativo para a própria célula, e isso com o tempo, resulta em um declínio bioquímico e fisiológico (BULLONE; LAVOIE, 2017; GLADYSHEV, 2014).

A teoria dos RL do envelhecimento é consistente com numerosos estudos, mas muitos outros claramente contradizem essa ideia. Coletivamente, esses estudos argumentam contra o papel universal do dano oxidativo no envelhecimento. Por essa razão, muitos pesquisadores mudaram para um conceito mais amplo que várias formas de dano servem como fatores causais no processo de envelhecimento, com ERO representando uma das principais causas, mas não a única (GLADYSHEV, 2014).

RL é um átomo, uma molécula ou um composto com um ou mais elétrons desemparelhados na sua camada mais externa e altamente reativos (**Figura 2**). Devido a essa reatividade, os RL tentam parear com outras moléculas, átomos, ou até com elétrons individuais para criar um composto estável. Para atingir um estado mais estável, RL podem ``roubar`` um átomo de hidrogênio de outra molécula, se ligar a outra molécula ou interagir através de várias formas com outros RL. Essa configuração instável cria energia que é liberada através de reações com moléculas adjacentes, como proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos. A maioria dos RL que danifica os sistemas biológicos são derivados do oxigênio e referidos

geralmente como ERO. Exemplos são o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ), o radical hidroperoxil ( $HO_2^{\cdot}$ ). Mas também podem ser moléculas não radicalares como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (**Figura 3**). Tem-se também as espécies reativas de nitrogênio (ERN) que podem ser radicalares como o óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) e o dióxido de nitrogênio ( $NO_2^{\cdot}$ ) e espécies não-radicalares como o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). ERO podem ser tóxicas para as células porque elas podem reagir com a maioria das macromoléculas celulares, incluindo proteínas, lipídeos e ácido desoxirribonucleico (DNA) e geram diferentes tipos de radicais secundários como radicais de lipídeo, radicais derivados de açúcar e de base, radicais de aminoácido e radicais de tiol (CHANDRASEKARAN; SOSA; MELENDEZ, 2017; BHATTACHARYA, 2015; REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016; RÓDENAS; MITJAVILA; CARBONELL, 1998).



**Figura 2:** Comparação entre um RL e uma molécula estável. Fonte: Modificado ZAU, 2016.

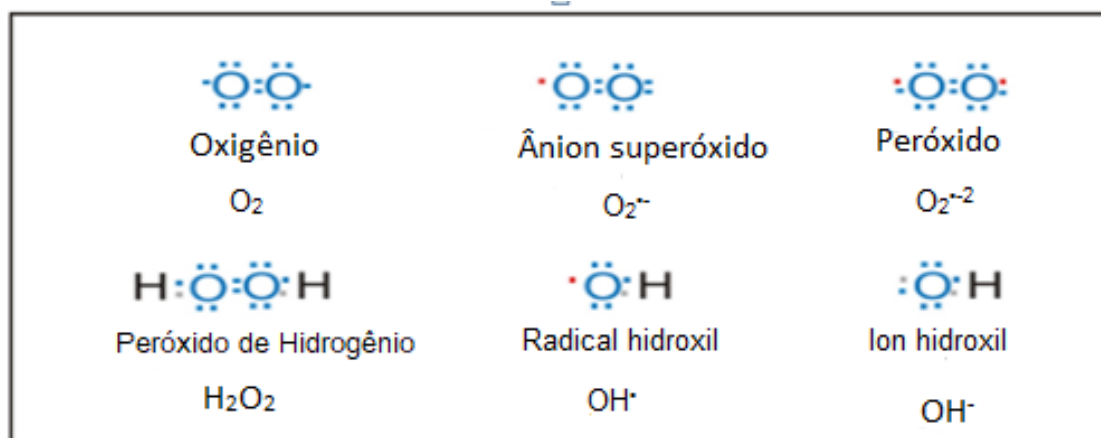


Figura 3: Exemplos de ERO. Fonte: Modificado HELD, 2015.

O NO é um RL, gasoso, inorgânico e incolor. Atua como neurotransmissor, medeia a plasticidade sináptica (capacidade de modulação e adaptação das sinapses para transmissão do impulso nervoso) e facilita a liberação de outros neurotransmissores e hormônios (BARRETO; CORREIA, 2005). Atua também como vasodilatador, como o principal mediador citotóxico de células imunes efectoras ativadas e constitui a mais importante molécula reguladora do sistema imune; além de inibir a agregação plaquetária, regular a pressão sanguínea e possuir ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de microorganismos, parasitas e células tumorais (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

A produção excessiva de NO simultaneamente a um ambiente de intensificação da formação do  $\text{O}_2^-$  na mitocôndria é acompanhada pela geração de quantidades substanciais de  $\text{ONOO}^-$ . O que gera danos nos componentes da cadeia transportadora de elétrons, a despolarização irreversível de organelas e o desenvolvimento da disfunção mitocondrial, o que pode causar apoptose.  $\text{ONOO}^-$  causa dano oxidativo, nitração e S-nitrosilação de biomoléculas (proteínas, lipídeos e DNA) (DANYLOVYCH; BOHACH; DANYLOVYCH, 2018).

Em doses baixas a médias, ERO são consideradas essenciais para a regulação das funções fisiológicas normais envolvidas no desenvolvimento, como a progressão do ciclo celular e proliferação, diferenciação, migração e morte celular (COVARRUBIAS *et al.*, 2008). ERO também tem um importante papel no sistema imune e na manutenção do balanço redox (REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES,



---

2016). ERO tem sido relacionadas com a ativação de várias vias de sinalização celular e com fatores de transcrição incluindo a cinase fosfoinositol 3 (PI3K)/Akt, proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), fator nuclear derivado de eritróide 2 (Nrf2) e fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (ZHANG *et al.*, 2016).

Por outro lado, o excesso dos níveis de ERO pode ser deletério. Produção exacerbada de ERO tem sido associada com o desenvolvimento de várias doenças como câncer, diabetes, aterosclerose e doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson e doença de Alzheimer (REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016; HALLIWELL, 2011).

A produção endógena de ERO ocorre principalmente pelo vazamento de elétrons na cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, que transfere elétrons da dinucleotídeo de adenina nicotinamida reduzida (NADH) e succinato ao longo de um caminho redox controlado que termina na redução do oxigênio ( $O_2$ ) em água ( $H_2O$ ) durante a síntese de adenosina trifosfato (ATP) (DICKINSON; CHANG, 2011). Mais especificamente ocorre nos complexos I e III dessa cadeia transportadora de elétrons a produção de  $O_2^{\cdot-}$  (**Figura 4**). Além disso, flavoenzimas podem ser responsáveis pela liberação de  $H_2O_2$  na mitocôndria. Por exemplo, as enzimas do ciclo de Krebs  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase e glicerofosfato desidrogenase são consideradas fontes relevantes de ERO na mitocôndria encontrada no cérebro, particularmente em condições de alto potencial de membrana mitocondrial. A enzima Acil-Coa desidrogenase que participa da via da beta oxidação de ácidos graxos, também pode ser responsável por altos níveis de  $H_2O_2$  gerados na mitocôndria hepática na presença de palmitato. Outras flavoenzimas que podem contribuir para a formação de ERO mitocondrial são as monoaminas oxidases que catalizam a deaminação oxidativa de aminas biogênicas como serotonina, dopamina e noraepinefrina, e as dihidroorotato desidrogenases que participam da via biosintética de pirimidinas (TAHARA; NAVARETE; KOWALTOWSK, 2009; QUIJANO *et al.*, 2016; HAUPTMANN *et al.*, 1996; LENAZ, 2001; TAHARA, 2007). Outras fontes endógenas de produção de ERO são pelas fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH) oxidases e xantina oxidases (XO) (BAE *et al.*, 2011). Essa produção de ERO pelas NADPH oxidases é chamada de explosão respiratória e é crítica para a ação bactericida de fagócitos (FORMAN; TORRES, 2002).

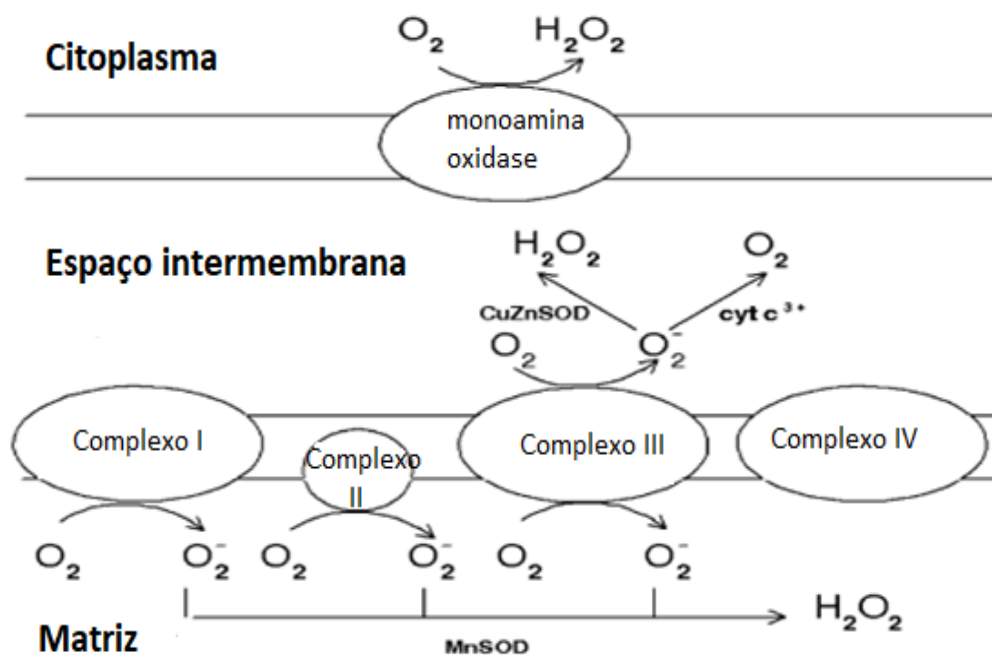
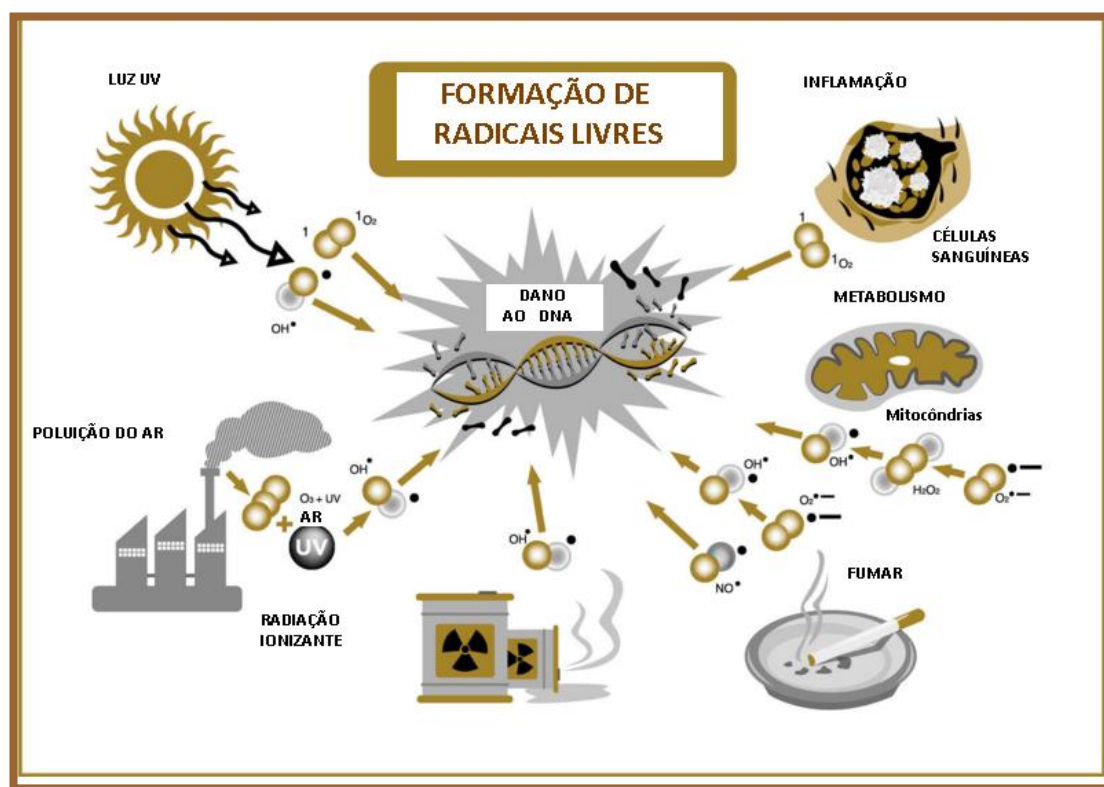


Figura 4: Representação da cadeia transportadora de elétrons e seus complexos produtores de  $O_2^-$ . Fonte: : Modificado TURRENS, 2003.

Em relação a fatores exógenos na produção de ERO tem-se a radiação ultravioleta e a radiação ionizante, compostos quinona, químicos encontrados na fumaça do cigarro, toxinas ambientais e vários agentes farmacêuticos (**Figura 5**) (REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016).



**Figura 5: Fatores exógenos responsáveis pela formação de RL.** Fonte: Modificado PENDYALA; THOMAS; KUMARI, 2008.

Na célula, há um equilíbrio entre as defesas antioxidantes e a geração de ERO. As moléculas antioxidantes que constituem a defesa antioxidante em sistemas vivos agem em níveis diferentes. Esses níveis podem ser a prevenção, captura e reparo do dano gerado pelos RL. Os antioxidantes podem ser categorizados como antioxidantes de primeira linha, de segunda linha, terceira linha e quarta linha de defesa antioxidante. Mesmo as defesas antioxidantes sendo diferentes de espécie para espécie, a presença delas é universal. Essas defesas antioxidantes incluem antioxidantes enzimáticos, como a catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GSHPx), superóxido dismutase (SOD), peroxirredoxinas e sestrinas, como também antioxidantes não enzimáticos, como vitamina C e E, glutathiona (GSH), ácido lipóico, carotenóides, polifenóis (**Figura 6**). Antioxidantes enzimáticos agem quebrando e removendo os RL. Antioxidantes não enzimáticos interrompem a cadeia de reações dos RL (HALLIWELL, 2011; NIMSE; PAL, 2015; IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

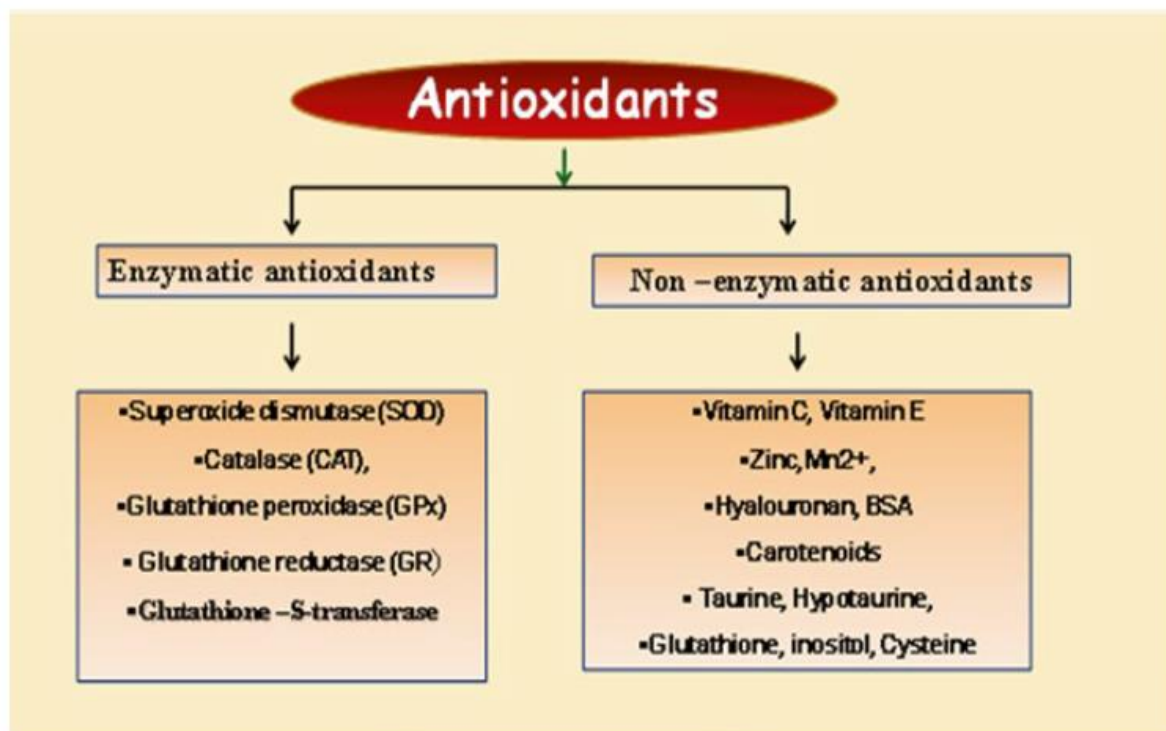
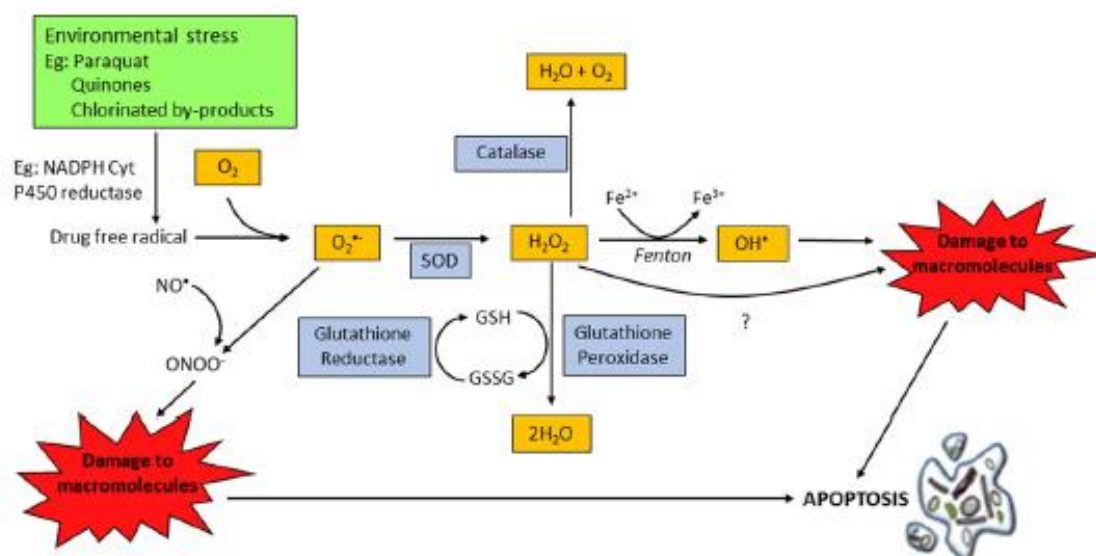


Figura 6: Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Fonte: BANSAL, 2015.

Há uma coleção de antioxidantes caracterizados como de primeira linha de defesa que agem suprimindo ou prevenindo a formação de RL nas células. Eles são muitos rápidos em neutralizar qualquer molécula com o potencial de gerar um RL ou qualquer RL com a habilidade de induzir a produção de outros RL. Três enzimas chaves: SOD, CAT e GSHPx estão no centro dessa primeira linha. A enzima SOD, localizada no citosol e na mitocôndria, converte cataliticamente o  $O_2^{\cdot-}$  em  $O_2$  e  $H_2O_2$  em presença de cofatores metálicos como cobre (Cu), zinco (Zn) ou manganês (Mn) (**Figura 7**). A associação entre a deficiência de SOD e um número de patologias tem sido observado em animais e humanos. Lebovitz *et al.* (1996) notaram que a neurodegeneração, lesão no miocárdio e morte perinatal em camundongos estão relacionadaa com a deficiência na SOD. A enzima CAT presente no peroxissomo converte  $H_2O_2$  em  $O_2$  e  $H_2O$  (**Figura 7**). Zámoch e Koller (1999) associaram dano oxidativo ao DNA e subsequente risco de suscetibilidade ao câncer em indivíduos com polimorfismo genético e alteração na expressão gênica/atividade da CAT. Khan *et al.* (2010) também relacionaram o desenvolvimento de desordens mentais a polimorfismos no gene codificador da CAT. Adicionalmente Góth, Rass e Páy (2004) concluíram que humanos com baixos níveis de CAT estão mais predispostos ao

diabetes mellitus tipo 2. A enzima GSHPx é encontrada tanto no citoplasma quanto extracelularmente em quase todo tecido humano. Converte  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  (**Figura 7**). A enzima peroxirredoxina cataliza a redução de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , hidroperóxidos orgânicos e  $\text{ONOO}^-$  (NIMSE; PAL, 2015; IGHODARO; AKINLOYE, 2018).



**Figura 7: Principais antioxidantes enzimáticos . Fonte: REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016.**

Sirivarasai *et al.* (2015) revelaram que alguns polimorfismos existentes no gene que codifica a enzima CAT em eritrócitos podem ser responsáveis pela alteração da expressão e atividade dessa enzima na pressão sanguínea em uma população tailandesa.

Estudos de Giordano *et al.* (2015) comprovaram que tratamento de células da retina de pacientes diabéticos com uma molécula de CAT que consegue penetrar a célula, corrige a hiperglicemia induzida por EO. Goto *et al.* (2008) também demonstraram que camundongos transgênicos com expressão elevada de MnSOD em células endoteliais reduziu a produção de ERO e assim suprimiu a progressão da retinopatia diabética.

Salminem e Paul (2014) mostraram que em camundongos transgênicos com superexpressão mitocondrial de CAT estão associados a um menor dano oxidativo. Zaghloul *et al.* (2014) comprovaram que a superexpressão de SOD extracelular em

---

camundongos transgênicos protege contra dano cerebral induzido por hipóxia crônica (caracterizada por aumentar a produção de ERO). Experimentos de Ando *et al.* (2008) evidenciaram que células T humanas com genes da enzima CAT transferidos por retrovírus são protegidas eficientemente de EO. Experimentos de Dumont *et al.* (2009) mostraram que a expressão elevada de MnSOD mitocondrial em modelos de camundongos transgênicos com a doença de Alzheimer reduziu o EO, retarda a formação das placas ou acelera sua degradação e atenua seu fenótipo.

Sestrinas são proteínas altamente conservadas cujos genes tem a expressão aumentada em células expostas a uma variedade de estresses provenientes do ambiente, como dano no DNA, EO e hipóxia. Em resposta a esses diversos insultos, as sestrinas ajudam as células a ajustar seu metabolismo para suportar a adaptação celular ao estresse, como por exemplo ao facilitar o reparo ao dano no DNA, ao interromper processos anabólicos e estimulando reações catabólicas. Assim, as sestrinas podem ser vistas como reguladores induzidos por estresse. Além disso, as sestrinas estão envolvidas no controle de acumulação de ERO e proteção contra o EO. Essa inibição de ERO pode ser desencadeada diretamente através da atividade enzimática das sestrinas (peroxirredoxina) ou pela ativação de Nrf2, um regulador chave de vários genes antioxidantes (PASHA *et al.*, 2017; LEE; BUDANOV; KARIN, 2014; BUDANOV, 2011).

A formação e remoção de RL estão balanceadas em uma célula normal. Porém, com uma maior formação de RL (ERO e ERN) ou quando os níveis de antioxidantes estão diminuídos, a célula entra em vários processos deletérios que são nomeados como EO (**Figura 8**) (BHATTACHARYA, 2015; TURRENS, 2003).



**Figura 8: Representação da formação do EO. Fonte: SILVA, 2012.**

Esse fenômeno aumenta com a idade e afeta o funcionamento normal de vários tecidos. Além disso, várias doenças crônicas associadas com uma idade mais avançada, como diabetes e desordens cardiovasculares, renais, pulmonares e musculares também estão associadas com o EO (CABELLO-VERRUGIO *et al.*, 2017). Um papel das ERO no envelhecimento tem sido reforçado por vários estudos demonstrando que os níveis de ERO e do dano oxidativo aumentam com a idade cronológica concomitante com a redução dos níveis e da atividade de muitas enzimas antioxidantes, como a SOD e a CAT (**Figura 9**) (SRIVASTAVA, 2017 ;GIERGIEL *et al.*, 2015).

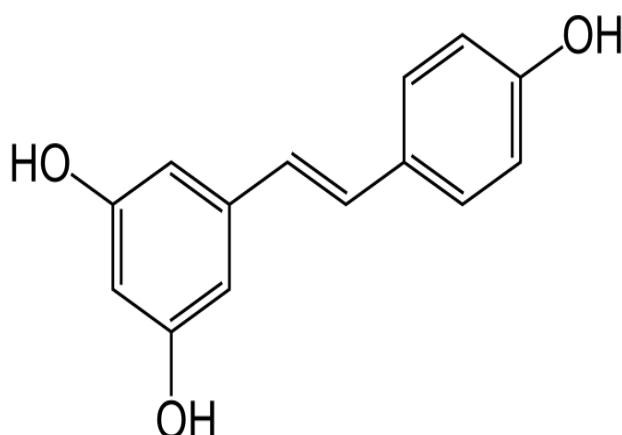


Figura 9: Consequências do excesso de RL (EO). Fonte: ELEUTHERIO, 2012.

Como exemplo tem-se estudos de Wang *et al.* (2014) e Chaves *et al.* (1998/2000) em células sanguíneas periféricas de adultos e idosos saudáveis que demonstraram em granulócitos, componentes da primeira linha de defesa contra infecções bacterianas, um aumento de ERO à 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.

Resveratrol (3,5,4'-trihidroxi-trans-estilbeno, **Figura 10**) (RSV) é um composto estilbenóide e polifenólico. É encontrado naturalmente, especialmente em fontes de plantas como amendoim, uva e algumas amoras (DIAZ-GEREVINI *et al.*, 2016).





**Figura 10: Estrutura química da molécula de RSV. Fonte:** MALAGUTI; ANGELONI; HRELIA, 2013.

RSV é produzido em várias plantas depois de uma infecção por um patógeno. Como uma fitoalexina, protege a planta ao atacar patógenos por sua atividade antimicrobiana e antioxidativa (WEISKIRCHEN, 2017).

Esse polifenol tem recentemente ganhado muita publicidade e interesse como uma nova molécula antioxidante, potencialmente tendo a resposta em relação aos fatores cardioprotetores do vinho tinto. O RSV tem sido utilizado há um longo tempo como um componente da *Veratrum formosanum* na medicina tradicional do Leste da Ásia e na medicina pré colombiana na América do Sul (*Cassia quinquangulata*) (MOHAR; MALIK, 2012).

Os experimentos realizados por La Porte *et al.* (2010), Wong *et al.* (2011) e Almeida *et al.* (2009) de curta duração realizados em humanos, demonstraram que o RSV apresenta baixa toxicidade e é bem tolerado. Ensaio clínico realizado por Patel *et al.* (2011) provaram que o RSV é bem tolerado e seguro farmacologicamente em doses até 5 g/dia.

Ensaio clínico têm demonstrado que a administração do RSV por via oral, apesar de ter uma elevada absorção, apresenta baixa biodisponibilidade (CHACHAY *et al.*, 2011). A baixa biodisponibilidade é devida não só à sua baixa hidrossolubilidade e instabilidade química, mas principalmente, por sofrer um rápido metabolismo e excreção, passando também pelo ciclo entero-hepático onde é conjugado com compostos sulfatados e glicuronilados (SMOLIGA; VANG; BAUR,

---

2012). O RSV livre é encontrado em níveis bem baixos no plasma onde se liga a lipoproteínas e albumina, o que facilita sua entrada nas células (STANEVIČIENĖ *et al.*, 2016). Apesar de a biodisponibilidade do RSV ser baixa, existem teorias de que os seus efeitos podem-se dever ao fato de os seus metabolitos serem bioativos (AHMED *et al.*, 2016) ou ao fato de que conjugados sulfatados do RSV podem ser absorvidos por certos tecidos e nestes podem sofrer um processo que regenera o metabolito a RSV no interior das células (PATEL *et al.*, 2013).

RSV é o polifenol derivado de planta mais bem estudado. Vários estudos relataram seus inúmeros efeitos biológicos e farmacológicos (KIM *et al.*, 2017). Esses efeitos incluem efeitos cardioprotetores, efeitos anticâncer, efeitos antiobesidade, efeitos neuroprotetores, efeitos anti inflamatórios, efeitos antidiabéticos e efeitos antioxidantes (CHANG *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2015; RAJ; ZIEROTH; NETTICADAN, 2015; SU; PU; HU, 2016; SZKUDELSKI; SZKUDELSKA, 2015; YUN *et al.*, 2014). Como antioxidante, o RSV tem um efeito dual: aumenta a atividade de enzimas antioxidantes, como a GSHPx, a glutathione S-transferase (GST) e a glutathione reductase (GSR); e pode agir diretamente com os RL, removendo-os (STANEVIČIENĖ *et al.*, 2016). Inclusive, outros efeitos já descritos do RSV estão relacionados com sua ação em enzimas antioxidantes. Estudos de Mokni *et al.* (2007) comprovaram que o RSV reduz a peroxidação lipídica em cérebros de ratos e aumenta simultaneamente a atividade de SOD e CAT, confirmando o efeito neuroprotetor do RSV. Szkudelski e Skudelska (2011) observaram que tratamentos de ratos diabéticos com RSV melhorou os níveis sanguíneos de açúcar, além de reduzir os níveis de ERO no plasma e tecido pancreático em conjunto com o aumento da atividade de enzimas antioxidantes (SOD, catalase, GSHPx), o que confirma o efeito antidiabético do RSV.

Um estudo promovido por Howitz *et al.* (2003) demonstrou que o RSV pode estender o tempo de vida de organismos inferiores pela ativação da família de proteínas sirtuínas (SIRT) implicada no controle do envelhecimento.

RSV é um ativador da via de sinalização da SIRT 1, uma das formas da família de proteínas sirtuínas em mamíferos. SIRT 1 pertence a uma família de proteínas que consiste em sete membros individuais (SIRT 1-SIRT 7). Elas são

---

deacetilases dependentes do dinucleotídeo de adenina nicotinamida oxidado (NAD<sup>+</sup>) (BERMAN *et al.*, 2017; WEISKIRCHEN, 2017).

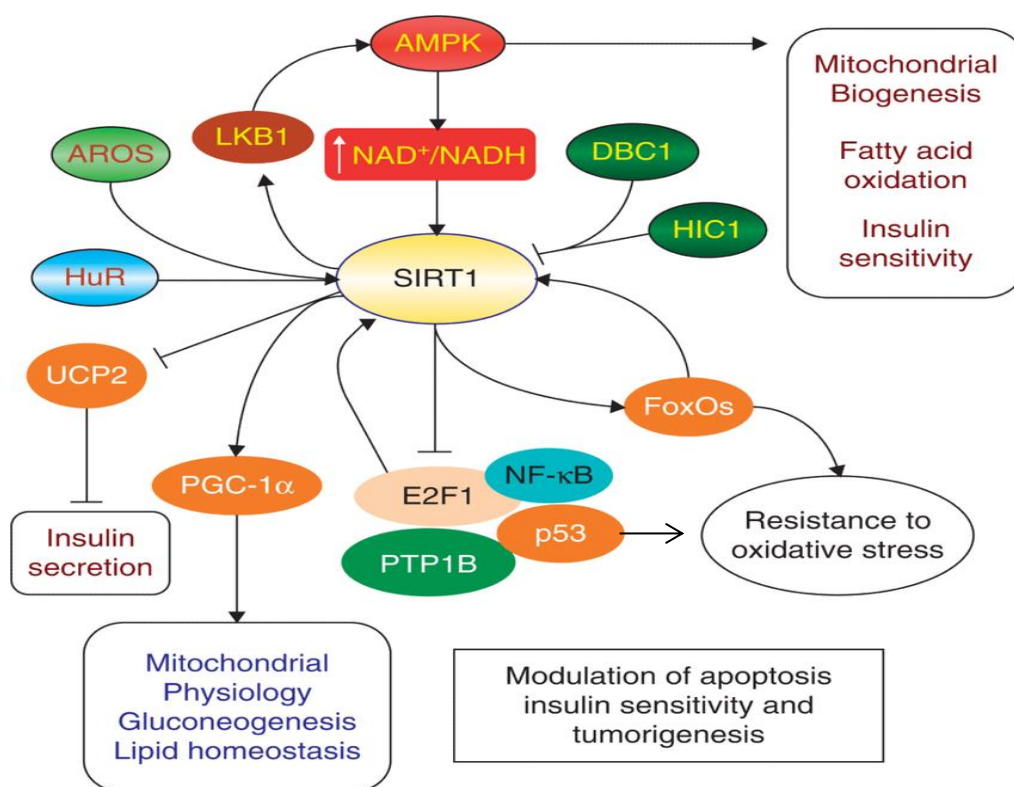
Esses sete membros da família SIRT diferem em sequência (apesar de todos compartilharem um núcleo catalítico conservado), em localizações subcelulares, atividade enzimática e especificidade com o substrato. A isoforma humana mais estudada é a SIRT 1, uma proteína nuclear que regula processos fisiológicos críticos e está associada com doenças inflamatórias crônicas e disfunções metabólicas como diabetes, obesidade, envelhecimento e até o câncer (POTENTE; DIMMELER, 2008).

A via regulada pela SIRT 1 afeta o metabolismo, a resistência ao EO, a sobrevida celular, a senescência celular, a função imuno-inflamatória, funções endoteliais e ritmos circadianos. Como o RSV mostrou que altera a SIRT 1 então é previsto em ter efeitos benéficos em doenças que levam ao controle metabólico anormal, à inflamação e defeitos no ciclo celular (BERMAN *et al.*, 2017).

A expressão da SIRT 1 varia em várias condições fisiológicas, resultando em sua indução em estados de baixa energia e repressão durante estados de alta energia. Por exemplo, em jejum há um aumento da sua expressão enquanto em dietas ricas em gordura, há a redução de sua expressão (HOUTKOOPE; PIRINEN; AUWERX, 2016).

SIRT 1 interage e deacetila o coativador de receptor g ativado por proliferador de peroxissomo (PGC-1a) (**Figura 11**) conseqüentemente aumentando sua atividade. PGC-1a é conhecido por controlar a biogênese mitocondrial (STANEVIČIENĖ *et al.*, 2016).

Similarmente, SIRT 1 controla a acetilação dos fatores de transcrição Forkhead box (FOXO) (**Figura 11**), que são importantes reguladores do metabolismo de glicose e de lipídeos como também a resposta ao EO. Acredita-se que a deacetilação mediada por SIRT 1 simplesmente não ativa ou inibe FOXO, mas seletivamente direciona FOXO para certos alvos, assim conferindo outra camada de especificidade (HOUTKOOPE; PIRINEN; AUWERX, 2016).



**Figura 11: Alvos da SIRT 1. Fonte:** Modificado CHONG *et al.*, 2012.

Vários estudos indicaram que a expressão de SIRT 1 está associada firmemente com a resistência ao EO (MA *et al.*, 2018). Pfluger *et al.* (2008) demonstraram que SIRT 1 induz as proteínas antioxidantes SOD2 e Nrf1 pela estimulação de PGC-1a. A fosfoproteína nuclear de 53 quilo Daltons (p53) que é um supressor de tumor e fator de transcrição identificado como um substrato de SIRT 1, também está envolvida na ativação de genes antioxidantes como SOD 2 e GPx1. FOXO3a que também é deacetilado por SIRT1 induz uma resposta antioxidante pela expressão de SOD2 e CAT (SANTOS; ESCANDE; DENICOLA, 2015).

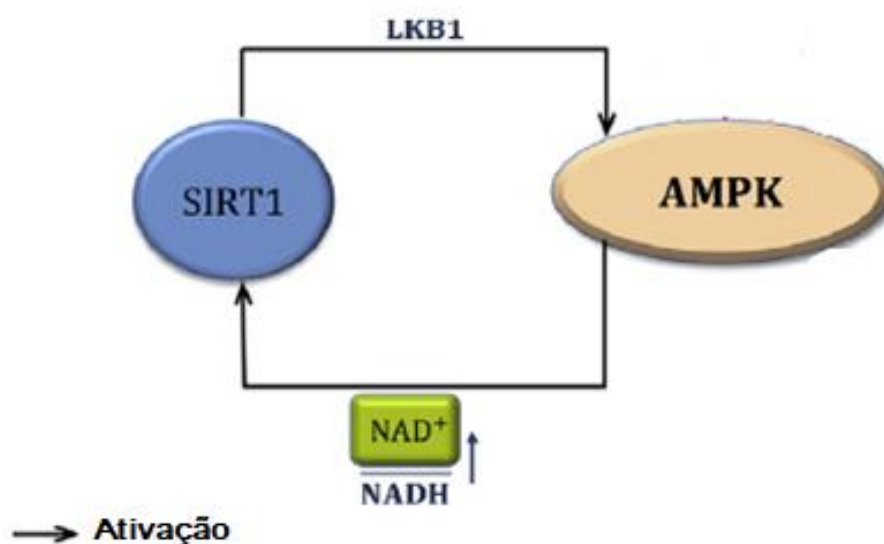
SIRT1 ainda regula vários processos metabólicos que permitem a célula a se adaptar ao estresse nutritivo e tem um papel decisivo em doenças metabólicas relacionadas ao envelhecimento. Em resposta ao jejum, SIRT1 modula a gliconeogênese no fígado através da deacetilação de importantes fatores, como PGC-1a, FOXO1, coativador 2 de transcrição regulado pela ligação do elemento de resposta a adenosina-monofosfato-cíclico (cAMP) (CREB) (CRPC2). A deacetilação

de PGC-1 $\alpha$  por SIRT 1 não controla somente a gliconeogênese, mas também a oxidação de ácidos graxos (NAKAGAWA; GUARENTE, 2011).

É reportado que o RSV promove a retenção de FOXO1 no núcleo via deacetilação mediada por SIRT1, o que pode aumentar sua atividade transcricional (VOLONTE *et al.*, 2015).

SIRT 1 e a proteína cinase ativada por adenosina monofosfato (AMP) (AMPK) tem mostrado participar de muitos papéis similares, incluindo sua habilidade em responder a estados de EO e de estresse de nutrientes, induzir biogênese mitocondrial, regular a homeostase de glicose e controlar a atividade de importantes reguladores transcricionais como PGC-1 $\alpha$  e FOXOs. Assim, claramente há uma interação dinâmica entre essas duas vias (TENNEN; MICHISHITA-KIOI; CHUA, 2012).

Canto *et al.* (2010) demonstraram que AMPK ativa SIRT 1 por um aumento indireto nos níveis de NAD<sup>+</sup> celulares. Enquanto Ivanov *et al.* (2008) e Lan *et al.* (2008) demonstraram que SIRT 1 deacetila a cinase LKB1, levando a um aumento da fosforilação e ativação de AMPK (**Figura 12**).

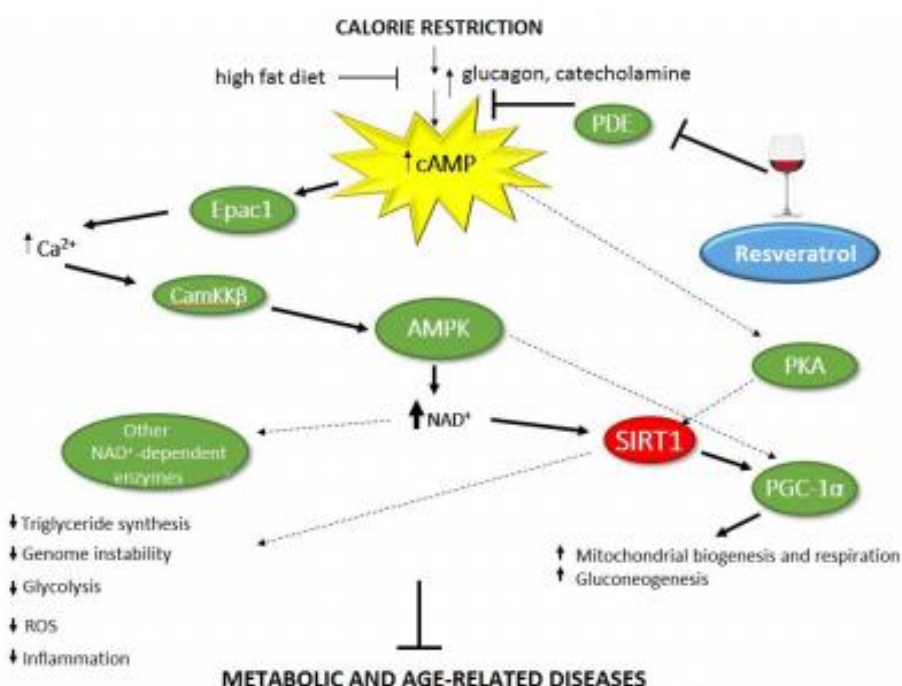


**Figura 12: Interação entre as vias de SIRT 1 e AMPK.** Fonte: Traduzido KHORRAMINEJAD-SHIRAZI *et al.*, 2017.

A ativação de AMPK tinha sido o evento de sinalização mais upstream desencadeado pelo RSV, mas igual SIRT1, AMPK não parecia ser um alvo direto deste (TENNEN; MICHISHITA-KIOI; CHUA, 2012).

Park *et al.* (2012) acharam a conexão entre o RSV e AMPK. Eles demonstraram que o RSV inibe diretamente várias enzimas fosfodiesterases (PDE), o que aumenta os níveis do segundo mensageiro cAMP, a ativação do fator de troca do nucleotídeo guanina dependente de cAMP (Epac 1) e um aumento do cálcio intracelular que ativa a cinase CamKKb, que fosforila e ativa AMPK (**Figura 13**).

Tennen, Michishita-Kioi e Chua (2012) demonstraram que o RSV além de ativar a via cAMP/Epac 1/CamKKb/AMPK, ativa uma via paralela. O aumento dos níveis de cAMP pela inibição direta dos PDE pelo RSV, ativa a proteína cinase A (PKA) que diretamente fosforila e ativa SIRT1 (**Figura 13**).



**Figura 13: Novo mecanismo de interação entre as vias de SIRT1 e AMPK e o RSV. Fonte: GERZON; RODACKA; PUCHALA, 2014.**

A ativação dessa via paralela descoberta por Tennen, Michishita-Kioi e Chua (2012) está de acordo com os estudos de Gerhart-Hines *et al.* (2011) que descobriram que a ativação adrenérgica da cascata cAMP/PKA por estresse agudo

---

resulta na rápida fosforilação e ativação de SIRT1 independentemente da mudança de concentração de AMPK e NAD<sup>+</sup>.

Price *et al.* (2012) demonstraram que a habilidade do tratamento com o RSV em aumentar a fosforilação de AMPK tanto *in vitro* quanto *in vivo* é dependente de SIRT1, mas somente em doses moderadas de RSV. Além disso, tratamento das células com baixas doses de RSV mimetiza a situação *in vivo*. Mas altas doses de RSV (50 mM) resulta em não somente a ativação de AMPK independentemente de SIRT1 mas também em efeitos tóxicos que incluem uma redução drástica no potencial de membrana mitocondrial e níveis de ATP. Os dados dos estudos desses autores demonstram que o tratamento com doses moderadas de RSV resulta em ativação de AMPK, indução de biogênese mitocondrial e melhoraram a função mitocondrial em uma maneira que é dependente da SIRT1. Eles favorecem um modelo que moderada doses de RSV primeiro ativa SIRT1, o que leva a deacetilação de LKB1 e ativação de AMPK. Claramente, SIRT1 e AMPK não funcionam de maneira linear.

Em contraste com esses resultados, Dasgupta e Milbrandt (2007) demonstraram que o RSV estimulava AMPK independentemente de SIRT1 em neurônios. Hou *et al.* (2008) e Shin, Cho e Kim (2009) demonstraram que o RSV ativa AMPK tanto de forma dependente como independente de SIRT1 em células de carcinoma hepatocelular

AMPK é melhor conhecida como um sensor de estado de energia em células de vertebrados. AMPK é um complexo heterotrimérico composto por uma subunidade catalítica  $\alpha$  e duas subunidades regulatórias  $\beta$  e  $\gamma$  (GOWANS *et al.*, 2013). A subunidade  $\alpha$  contém o domínio cinase e um resíduo crítico Tirosina (Thr) 172 que é fosforilado por cinases upstream. Essas cinases são o supressor de tumor (LKB1) e a cinase ativada por Ca<sup>2+</sup>(Cálcio)/calmodulina (CaMKK2). A subunidade  $\beta$  contém um módulo de ligação a carboidrato que permite AMPK em se associar com glicogênio. E a subunidade  $\gamma$  permite a AMPK responder a mudanças na razão ATP para AMP. A ligação de AMP ou até de adenosina difosfato (ADP) (com menos frequência) nessa subunidade estimula a atividade da AMPK (HERZIG; SHAW, 2018).

---

Estudos genéticos de deleção de LKB1 específica para tecidos revelaram que LKB1 medeia a maior parte da ativação de AMPK, embora CaMKK2 parece estar envolvida particularmente na ativação de AMPK em neurônios e células T (LI *et al.*, 2018).

Em contraste com a cinase LKB1, a CaMKK2 pode ativar AMPK em resposta a um aumento de  $Ca^{2+}$  celular sem nenhuma mudança significativa nos níveis de ATP/ADP/AMP (KIM *et al.*, 2016).

Muitos hormônios que atuam via receptores que ativam proteínas G ou tirosinacinasas, causam a liberação do segundo mensageiro, inositol trifosfato, da membrana celular que em seguida libera  $Ca^{2+}$  das regiões de estoque intracelular. Tais hormônios assim ativam AMPK através da via CaMKK2. Esses hormônios incluem trombina, fator de crescimento celular endotelial vascular (VEGF) e grelina (HARDIE; LIN, 2017).

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

Estudos de Gwinn *et al.* (2009) e Inoki, Zhu e Guan (2003) mostraram que a ativação de AMPK causa a inativação do complexo 1 de alvo mamífero de rapamicina (mTOR) (mTOR1) pela fosforilação da proteína regulatória associada a mTOR (Raptor) (**Figura 14**). Sancak *et al.* (2008) mostraram que Raptor é um componente chave de mTOR1, responsável por recrutar esse complexo para o lisossomo.

mTOR é um regulador chave da homeostase metabólica ativado em estados de abundância de nutrientes e promove o crescimento celular e proliferação celular e as mudanças metabólicas associadas, enquanto AMPK é ativado por falta de



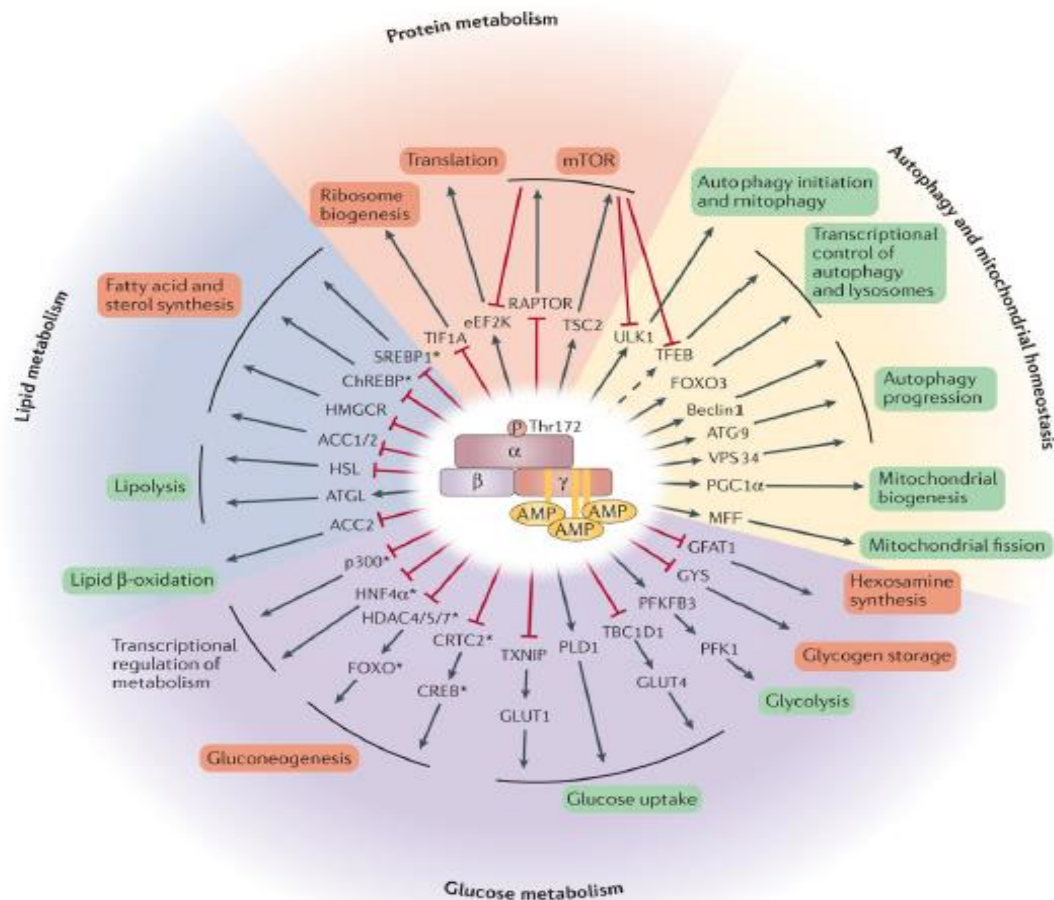
---

nutrientes e energia, inibe o crescimento e proliferação celular e promove o metabolismo oxidativo energético exibido pela maioria das células quiescentes. Em jejum, mTOR é inativado que por sua vez ameniza a fosforilação inibitória na cinase essencial para a indução da autofagia (ULK1) (HARDIE, 2014a; HERZIG; SHAW, 2018).

Outra função de AMPK é aumentar a biogênese mitocondrial e a proteção antioxidante mitocondrial. Vários efetores downstream da AMPK contribuem com a biogênese mitocondrial, cuja maior parte dos genes envolvidos nesse metabolismo mitocondrial parece estar sob o domínio da família PGC-1a (**Figura 14**) (XU *et al.*, 2017).

AMPK ativado por estresse mitocondrial desencadeia fissão mitocondrial pela fosforilação do fator de fissão mitocondrial (MFF) (**Figura 14**). Essa rápida indução de fissão mitocondrial dependente de AMPK pode servir como uma maneira da célula se preparar para iniciar a mitofagia dos fragmentos mitocondriais que sofreram dano extenso. Assim, AMPK surge como o regulador principal da homeostase mitocondrial, unindo fissão com mitofagia e depois de um estresse energético prolongado, sinalizando o núcleo para iniciar a biogênese de novas mitocôndrias para substituir as que sofreram dano (HARDIE, 2007).

AMPK pode regular diretamente FOXO (**Figura 14**). AMPK aumenta sua atividade transcricional ao recrutar a proteína de ligação a CREB (CBP) e a histona acetiltransferase (p300). Os membros da família FOXO conferem proteção contra o EO através da transcrição de genes antioxidantes como SOD2, CAT, peroxiredoxina e membros da família de sestrinas. Há uma conexão direta entre proteínas FOXO e vias do reparo de DNA. Além dessas funções, FOXO induz a expressão de genes relacionados a autofagia (ATG6, ATG7, ATG12, etc) para elevar o fluxo autofágico (HARDIE, 2014b; CHANDRASEKARAN; SOSA; MELENDEZ, 2017; DAITOKU; SAKAMAKI; FUKAMIZU, 2011).



**Figura 14 : Alvos de AMPK. Fonte:** HERZIG; SHAW, 2018 .

AMPK pode suprimir a ativação do sistema do fator nuclear  $\kappa B$  (NF-  $\kappa B$  ), um regulador chave da imunidade inata e da inflamação. A atividade de NF-  $\kappa B$  contribui significativamente para dano neuronal na doença de Alzheimer, isquemia e outras doenças. A supressão dessa via pela AMPK é indireta através dos mediadores downstream, como SIRT1, FOXO e PGC1-a, que subsequentemente podem reprimir a expressão de fatores inflamatórios (JEŠKO; STROSZNAJDER, 2016; XU *et al.*, 2017; SALMINEN; HYTTNEN; KAARNIRANTA, 2011).

O cenário anteriormente apresentado do envelhecimento é caracterizado por uma patogênese celular de distúrbios físicos relacionados ao envelhecimento que 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). E também em relação ao cenário anteriormente apresentado do RSV que apesar de possuir

---

potencial em tratar uma variedade de doenças humanas, o mecanismo exato pelo o qual demonstra esses efeitos ainda tem que ser completamente elucidado já que ensaios em humanos ainda são insuficientes (MOHAR; MALIK, 2012).

Diante disso e do papel do EO já anteriormente reportado no processo de envelhecimento é importante estudar qual a atuação do RSV e este atuando, quais seriam os **mecanismos** pelo o qual age em células humanas no envelhecimento e no estresse basal e no estresse elevado.

---

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Verificar em um ambiente de EO em células Mononucleares Humanas de sangue periférico (PBMC) de doadores de Meia idade e Idosos a existência de mudança do padrão de sinalização da SIRT 1 e AMPK pelo RSV.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Todos os experimentos foram realizados em PBMC, na ausência ou presença de RSV.

#### *2.2.1 Avaliação dos compartimentos oxidativos*

- Avaliar a produção de ERO;
- Avaliar a produção de NO;

#### *2.2.2 Avaliação dos compartimentos redutores*

- Avaliar a atividade da CAT e SOD

#### *2.2.3 Avaliação de vias de sinalização no EO*

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

#### *2.2.4 Avaliação da Viabilidade Celular através de MTT*

- Avaliar a Viabilidade Celular por ensaio de MTT.

---

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Equipamentos

Autoclave vertical (PHOENIX), Banho-Maria a 37°C (HEMOQUÍMICA), Câmara de Neubauer espelhada (OPTIK LABOR), Centrífuga (LS3PLUS-CELM), Estufa (SHEL LAB), Leitor de Microplacas (THERMO PLATE), Microscópio biológico binocular (BIOVAL), Microscópio de Fluorescência (OLYMPUS IX70-SOFTWARE IMAGE PRO PLUS), Centrífuga de lâminas (EXCELSA 3400- FANEM), Centrífuga de eppendorfs (EXCELSA® II MODELO 206-BL-FANEM), Luminômetro (Berthold Lumat LB 9501), Capela (PERMUTION, E.J. Krieger, Cia LTDA), Balança semi analítica (MARTE), pHMETRO (Nalgon), Capela de fluxo laminar (VECO).

#### 3.2 Reagentes

Resveratrol, Ácido Fosfórico 85%, Azul de Trypan, meio RPMI-1640 com L-GLUTAMINA 25MM HEPES ISENTO DE BICARBONATO DE SÓDIO, Dimetilsulfoxido (DMSO), Hidróxido de sódio, Luminol (*5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalozinedione*), MTT 3-(4,5 dimethylazol-2yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide), Paraformaldeído (PFA), Naftiletilenodiamida e Sulfanilamida foram obtidos pela Sigma Aldrich (St Louis,MO). Ácido Clorídrico, Cloreto de sódio, Cloreto de Potássio, Fosfato de sódio bifásico anidro, Fosfato de potássio monobásico anidro, Nitrito de sódio e Peróxido de Hidrogênio 30% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foram obtidos da LabSynth (São Paulo, BR). Solução de Monopaque obtida pela BionR . In solution™ AMPk Inhibitor, Compound C/Dorsomorphin foi obtido pela Calbiochem (Darmstadt, Germany). Finalmente, SIRT1 Inhibitor, Sirtinol foi obtido pela Tocris Bioscience (MN, USA),

#### 3.3 Kits Comerciais

Image-iT™ LIVE Green Reactive Oxygen Species Detection Kit (I36007) foi obtido pela Molecular Probes invitrogen detection technologies. EnzyChrom™ Catalase Assay Kit (ECAT-100) Quantitative Colorimetric/Fluorimetric Catalase Determination e EnzyChrom™ Superoxide Dismutase Assay Kit (ESOD-100) Determination of SOD activity foram obtidos pela BioAssay Systems.

---

### 3.4 Preparo das soluções

#### Monopaque

A solução de Monopaque utilizada para separar as células Mononucleares foi preparada de acordo com as informações do fabricante.

#### Solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 18% v/v

Para solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 18% v/v utilizada para os experimentos, 300 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%v/v foi diluído para um volume final de 500 µL com solução tampão fosfato salina sem células e magnésio (PBS). Posteriormente o conteúdo foi homogeneizado e colocado em eppendorf.

#### Solução de RSV 78.94 µM

Para solução estoque, o conteúdo do frasco (100 mg) foi diluído em 10 mL de DMSO. Esta solução (43810 µM) foi estocada refrigerada. Para uso, faz-se uma solução com volume de 10 mL: pipeta-se 18µL do estoque (43810 µM) e adiciona-se 9982 µL de PBS. Esta solução está a 78.94 µM.

#### Solução de PBS

Para o preparo de PBS, foram misturados os seguintes sais: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,15 g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,20 g), NaCl (8,0 g), KCl (0,20 g), sendo o volume final completado para 1 litro com água MILLI-Q. O potencial hidrogeniônico (pH) da solução (7,3) foi acertado utilizando-se HCl 1N ou NaOH 1N.

#### Solução de Azul de Trypan

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

#### Meio de Cultura RPMI

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

---

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

### **Meio de Cultura HANKS**

Um frasco de HANKS foi diluído em 900 mL de água Mili-Q. Em seguida foram adicionados 0,35 g 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 ( $\text{NaNO}_2$ ) foi dissolvido em 10 mL de PBS; com a obtenção de uma solução padrão a 10 mM.

### **Solução de Sulfanilamida 1%**

Para o preparo da solução, 1,0 g 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, 0,1 g 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 ( $10^{-2}\text{M}$ ) 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 Paraformaldeído (PFA) 4%**

Foram pesados 4 g de PFA que foi diluído em 50 mL de PBS 1X à 60°C sob agitação e acrescentando NaOH 1M até ocorrer a completa diluição. Após a diluição, o pH foi acertado para 6,9 e o volume para 100 mL. A solução foi filtrada em membrana de porosidade de 0,22 microns.

### **3.5 Seleção de Doadores**

Projeto aprovado pelo comitê de ética e pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais - CAAE: 2 45249715.1.0000.5149. Foram selecionados indivíduos de ambos os sexos e de 40 a 80 anos, sendo distribuídos em dois grupos: o de Meia idade, caracterizado por indivíduos de 40 a 59 anos e o grupo dos Idosos, caracterizado por indivíduos de 60 a 80 anos. Aqueles que estiveram aptos à participação, foram submetidos a assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Na tabela 1 estão descritas as características da população estudada.



**Tabela 1: Características Demográficas da população**

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

ns= não significativo pelo teste de Mann-Whitney.

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

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

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

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

n (Meia idade) = 118; 59 mulheres e 59 homens.

n (Idosos) = 86; 43 mulheres e 34 homens.

### 3.6 Obtenção de PBMC

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

### 3.7 Ensaio para Definição da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizada no estudo

As PBMC foram estimuladas com concentrações crescentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1% v/v; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.25% v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.64% v/v; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.61% v/v; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3.90% v/v, por 24 horas, a 37°C e em banho maria. O ensaio de Azul de Tripan foi utilizado para conferir a Viabilidade Celular (item 3.8). Foi realizado teste de Quimioluminescência (item 3.11) e ensaio de dosagem de NO (item 3.13) para as concentrações que apresentaram Viabilidade Celular dentro dos parâmetros aceitáveis.

### 3.8 Ensaio de Exclusão pelo Azul de Trypan da Viabilidade Celular

O teste de exclusão pelo corante é utilizado para determinar o número de células viáveis. É baseado no princípio de que células vivas possuem membranas celulares intactas que excluem certos corantes, como o Azul de Tripan, eosina, enquanto células mortas não excluem (STROBER, 2015). Após as 24 h de incubação a 37°C em banho maria, as células com os tratamentos (descritos nos itens 3.7 e 3.13) foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e utilizado para dosagem do nitrito (no ensaio de dosagem do NO, item 3.13) ou descartado (no ensaio para Definição da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, item 3.7). O *pellet* foi resuspenso em 100  $\mu$ L de PBS e uma gota do corante Azul de Trypan foi adicionada. A contagem da Viabilidade Celular foi feita em camara de Newbauer. O cálculo para obter a porcentagem de células viáveis está descrito abaixo.

---

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

### 3.9 Ensaio para Definição da concentração de RSV utilizada no estudo

A concentração do RSV (5  $\mu\text{M}$ ) escolhida para ser usada em PBMC foi baseada em uma Curva Concentração-Resposta em Leucócitos humanos através do teste de Viabilidade por MTT, padronizado por Lara *et al.* (2018).

### 3.10 Ensaio de MTT

O teste de MTT constitui-se em um modelo para avaliar a Viabilidade Celular 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 pela possível participação de flavoenzimas na liberação de ERO ; 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). A quantidade de cristais formados é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Assim, quanto mais escura a coloração, ao final da reação, maior é Viabilidade Celular e a atividade da cadeia respiratória (MOSMANN, 1983). As células foram colocadas em placas de cultura celular de 96 poços na concentração de  $5 \times 10^3$  células/poço. Foram divididas em quatro grupos (triplicata por grupo) com tratamentos distintos descritos na tabela 2. Foram incubadas em estufa umidificada a  $37^\circ\text{C}$  por 30 minutos. Após esses 30 minutos, acrescentou-se  $20\mu\text{L}$  da solução de MTT aos poços e a placa foi colocada mais uma vez em estufa a  $37^\circ\text{C}$  por 30 minutos protegida da luz. Em seguida, adicionou-se  $100\mu\text{L}$  de DMSO homogeneizando para dissolução dos cristais de formazan gerados. A absorbância foi lida a 570 nm no leitor de microplacas.

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

Placa de 96 poços	PBMC (5X10 <sup>5</sup> )	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 18% v/v	RSV 79.84 µM	RPMI sem soro
Basal	50 µL			130 µL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v	50 µL	7 µL		123 µL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v + RSV 5 µM	50 µL	7 µL	13 µL	110 µL
RSV 5 µM	50 µL		13 µL	117 µL

### 3.11 Ensaio de Quimioluminescência

Esta técnica baseia-se na reação entre Luminol e as espécies reativas geradas na ausência ou presença das diferentes concentrações das substâncias, individualmente. As células produzem uma luminosidade natural definida como Quimioluminescência nativa ou natural. Contudo, esta luminosidade pode ser amplificada, usando-se reagentes químicos que, ao reagirem com as ERO produzidas, passam a emitir a luminescência amplificada.

Um total de 1x10<sup>6</sup> PBMC foram divididas em quatro grupos (1x10<sup>6</sup> células/grupo) com tratamentos diferentes, como descrito na tabela 3. Em tubos específicos para Luminômetro, foram, então, colocados os 500 µL de Luminol 10<sup>-4</sup>M para completar o volume final de 700 µL. Cada tubo foi colocado no Luminômetro e a leitura foi realizada em corridas de 10 minutos. Após o tempo decorrido, retirava-se o tubo e a fita de papel com os valores de Unidades Relativas de Luz/minuto. (RLU/min.) colocando novo tubo para leitura. O processo foi repetido para todos os tubos. Foi feita, então, a média dos minutos de cada tubo.

**Tabela 3: Disposição dos grupos e seus tratamentos no Ensaio de Quimioluminescência em PBMC**

Tubos de Luminômetro	PBMC (1X10 <sup>6</sup> )	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 18% v/v	RSV 79.84 µM	PBS
Basal	100 µL			100 µL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v	100 µL	24,9 µL		75.1 µL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v + RSV 5 µM	100 µL	24,9 µL	43.5 µL	31.6 µL
RSV 5 µM	100 µL		43.5 µL	56.5 µL

Foi realizado dois controles sem células (tratamentos descritos na tabela 4) com o intuito de conferir se o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,64% v/v e o RSV 5 µM precisam da maquinaria celular para atuar ou podem reagir inespecificamente entre si e/ou com o Luminol. Em tubos específicos para Luminômetro, foram, então, colocados os 500 µL de Luminol 10<sup>-4</sup>M para completar o volume final de 700 µL. Cada tubo foi colocado no Luminômetro e a leitura foi realizada em corridas de 10 minutos. Após o tempo decorrido, retirava-se o tubo e a fita de papel com os valores de 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. Para cada controle foram realizadas cinco corridas.

**Tabela 4: Disposição dos grupos controles sem células no Ensaio de Quimioluminescência em PBMC**

Tubos de Luminômetro	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 18% v/v	RSV 79.84 µM	PBS
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v	24.9 µL		175.1 µL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v + RSV 5 µM	24.9 µL	43.5 µL	131.6 µL

### 3.12 Análise Qualitativa de ERO por Microscopia de Fluorescência

Para avaliação da produção de ERO em PBMC 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<sub>2</sub>DCFDA), que quando quebrado por esterases intracelulares não específicas, gera a molécula carboxy-DCFH que reage com as ERO tornando-se fluorescente. Para o ensaio foram utilizadas 1x10<sup>6</sup> PBMC divididas em quatro grupos (1x10<sup>6</sup> células/grupo, tratamentos descritos na tabela 5) incubadas por 30 minutos em banho maria a 37 °C. Após esse tempo, as células foram lavadas com meio Hanks (HBSS) 1X e centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e repetiu-se esse processo. Porém no final adicionou-se o marcador carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA (10 µM) para avaliar a produção de ERO. Estas amostras foram incubadas em estufa a 37°C e umidade durante 25 minutos, sob o abrigo de luz.

Posteriormente, adicionou-se o marcador nuclear Hoechst 33342 na concentração final de 1,0  $\mu\text{M}$ . As amostras foram incubadas por mais 5 minutos em estufa a 37°C e umidade, sob o abrigo de luz. Após esse período, as células foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em HBSS 1X. Esse processo foi repetido com o diferencial que utilizou-se PFA 4% para a ressuspensão das células. Em seguida as lâminas foram preparadas (limpadas com etanol e montadas com papel filtro previamente cortado) para a centrifugação com a adição da solução com as células. Depois da centrifugação, as lâminas foram utilizadas para fazer a aquisição das imagens de fluorescência, utilizando o microscópio (OLYMPUS IX70-SOFTWARE IMAGE PRO PLUS), obtidas para ilustrar a produção de ERO em PBMC.

**Tabela 5: Disposição dos grupos e seus tratamentos na Análise Qualitativa de ERO por Microscopia de Fluorescência em PBMC**

Tubos de vidro	PBMC ( $1 \times 10^6$ )	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 18% v/v	RSV 79.84 $\mu\text{M}$	RPMI sem soro
Basal	100 $\mu\text{L}$			200 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v	100 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$		190 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v + RSV 5 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	18.75 $\mu\text{L}$	171.25 $\mu\text{L}$
RSV 5 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{L}$		18.75 $\mu\text{L}$	181.25 $\mu\text{L}$

### 3.13 Produção de NO pela “Reação de Griess”

Foi avaliada a quantificação de nitrito segundo reação de Griess (GRIESS, 1864) para observar a produção de NO por PBMC na qual segue o seguinte protocolo: quatro grupos de  $1 \times 10^6$  células/grupo (tratamentos descritos na tabela 6) foram incubadas em banho-maria a 37°C por 24 horas. Após estas 24 horas, as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e utilizado para dosagem do nitrito. O *pellet* foi resuspenso em 100  $\mu\text{L}$  de PBS e imediatamente, submetido à análise de Viabilidade Celular pelo Ensaio de Exclusão pelo Azul de Trypan (item 3.8). Para dosagem do nitrito, foi utilizado 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante, que foram dispostos em placas de 96 poços. Aos sobrenadantes, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de solução de Griess, que é formada de sulfanilamina 1% em 2,5% de ácido fosfórico e naitilenodiamina 0,1%

em 2,5% de ácido fosfórico, na proporção 1:1. O conteúdo da placa foi analisado por leitor de microplacas, no comprimento de onda 540 nm. A concentração de nitrito foi calculada por regressão linear, utilizando a curva padrão obtida a partir de uma solução de nitrito de sódio 1 mM e meio de cultura RPMI.

**Tabela 6: Disposição dos grupos e seus tratamentos na Análise de produção de NO em PBMC**

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

### 3.14 Avaliação da atividade da CAT

Em quatro tubos de vidro foram transferidas 1x10<sup>6</sup> células por tubo. Esses tubos foram centrifugados a 1500 rpm por 20 min e o sobrenadante foi retirado. Posteriormente cada tubo recebeu um tratamento específico (descritos na tabela 7). Foram incubados em banho-maria a 37°C por 1 hora . Após esse período, as células foram homogeneizadas em PBS frio e centrifugadas a 1500 rpm por 20 min. O sobrenadante foi coletado e procedeu-se com os procedimentos descritos no Kit específico usado para a dosagem da atividade da CAT (EnzyChrom™ Catalase Assay Kit (ECAT-100) – Bioassay systems). O sistema Bioassay melhora as medidas diretas do ensaio da degradação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela CAT, usando um corante redox. A mudança na intensidade da cor a 570 nm é diretamente proporcional a atividade da CAT na amostra. Foram transferidos 10 µL da amostra (PBMC) e 10 µL do Controle Positivo (CAT) em poços separados da placa de 96 poços. Adicionalmente, para cada corrida do ensaio foi preparado um poço de branco que contem 10 µL do tampão de ensaio. Posteriormente, foi adicionado 90 µL do substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 µM) a esses poços. A placa foi incubada por 30 min em temperatura ambiente. Após a incubação, foi adicionado 100 µL de Reagente de detecção (Reagente Corante) por poço (amostra e Controle Positivo). A placa foi

incubada por 10 min. O conteúdo da placa foi analisado por leitor de microplacas, no comprimento de onda 570 nm.

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

**Tabela 7: Disposição dos grupos e seus tratamentos na Avaliação da atividade da CAT em PBMC**

Tubos de vidro	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 18% v/v	RSV 79.84 µM	RPMI sem soro
Basal			100 µL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v	3.33 µL		96.67 µL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v + RSV 5 µM	3.33 µL	6.25 µL	90.42 µL
RSV 5 µM		6.25 µL	93.75 µL

### 3.15 Avaliação da atividade da SOD

Em quatro tubos de vidro foram transferidas  $1 \times 10^6$  células por tubo. Esses tubos foram centrifugados a 1500 rpm por 20 min e o sobrenadante foi retirado. Posteriormente cada tubo recebeu um tratamento específico (descritos na tabela 7). Foram incubados em banho-maria a 37°C por 1 hora. Após esse período, as células foram centrifugadas a 4200 rpm por 2 min, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em PBS frio. Esse processo foi repetido com o diferencial de que as células foram ressuspensas em tampão de lise frio (proveniente do Kit). As células foram armazenadas por 10 min em gelo e centrifugadas por 20 min a 1500 rpm. O sobrenadante foi coletado e procedeu-se com os procedimentos descritos no Kit específico usado para a dosagem da atividade da SOD (EnzyChrom™ Superoxide dismutase Assay Kit (ESOD-100) – Bioassay systems). Os sistemas Bioassay de ensaio SOD fornecem modos colorimétricos convenientes para a determinação quantitativa da atividade enzimática da SOD em amostras biológicas. No ensaio, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> é fornecido pela reação catalizada pela XO. O<sub>2</sub><sup>•-</sup> reage com um corante WST-1 para formar um produto colorido. SOD sequestra o O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, assim menos O<sub>2</sub><sup>•-</sup> está disponível para a reação cromogênica. A intensidade da cor (440 nm) é utilizada para determinar a atividade da SOD na amostra. Foram transferidos 20 µL da amostra (PBMC) em poços da placa de 96 poços. Posteriormente, foi adicionado 160 µL de Reagente de Trabalho



---

(tampão+xantina+corante WST-1) e 20 µL da enzima XO diluída (1:20 em diluente) para cada poço. Imediatamente, o conteúdo da placa foi analisado por leitor de microplacas, no comprimento de onda 440 nm. A placa foi incubada por 60 min em temperatura ambiente no escuro. Novamente, o conteúdo da placa foi analisado por leitor de microplacas, no comprimento de onda 440 nm.

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

### **3.16 Quimioluminescência com inibidores da via de SIRT1 (Sirtinol) e de AMPk (Dorsomorphin/Compound C)**

A concentração dos inibidores Sirtinol e Dorsomorphin baseada nos experimentos realizados por Kozako *et al.* (2012) e por Buldak *et al.* (2014) respectivamente.

Dois tipos de controles foram realizados nesse experimento. Controle sem células (tratamentos descritos na tabela 8) com o intuito de conferir se os inibidores precisam da maquinaria celular para atuar ou podem reagir inespecificamente com o RSV e/ou o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para cada controle (sem células) foram realizadas três corridas. E controle com células (tratamentos descritos na tabela 2) com a finalidade de comparar com os grupos com o inibidor para inferir sobre sua atuação.

Além dos grupos controles, foi realizado o experimento com os grupos com os inibidores. 100 µL das células a  $1 \times 10^6$  foram incubadas com 100 µL do inibidor (Sirtinol a 10 µM ou Compound C a 20 µM) em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Ressaltando que os inibidores foram adicionados nos seus respectivos grupos separadamente em relação ao outro inibidor. Posteriormente, esses grupos foram centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos, o pellet foi descartado e os tratamentos (descritos na tabela 9) foram adicionados.

Em tubos específicos para Luminômetro, foram, então, colocados os 500 µL de Luminol  $10^{-4}$ M para completar o volume final de 700 µL. Cada tubo foi colocado no Luminômetro e a leitura foi realizada em corridas de 10 minutos. Após o tempo decorrido, retirava-se o tubo e a fita de papel com os valores de RLU/min colocando novo tubo para leitura. O processo foi repetido para todos os tubos. Foi feita, então, a média dos minutos de cada tubo.

**Tabela 8: Disposição dos grupos controles com inibidor sem células e seus tratamentos no Ensaio de Quimioluminescência**

Tubos de Luminômetro	Inibidor	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 18% v/v	RSV 79.84 µM	PBS
Inibidor + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v	100 µL	24.9 µL		75.1 µL
Inibidor + RSV 5 µM	100 µL		44 µL	56 µL

**Tabela 9: Disposição dos grupos com inibidor e seus tratamentos no Ensaio de Quimioluminescência em PBMC**

Tubos de Luminômetro	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 18% v/v	RSV 79.84 µM	PBS
Basal			200 µL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v	24.9 µL		175.1 µL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v + RSV 5 µM	24.9 µL	44 µL	131.1 µL
RSV 5 µM		44 µL	156 µL

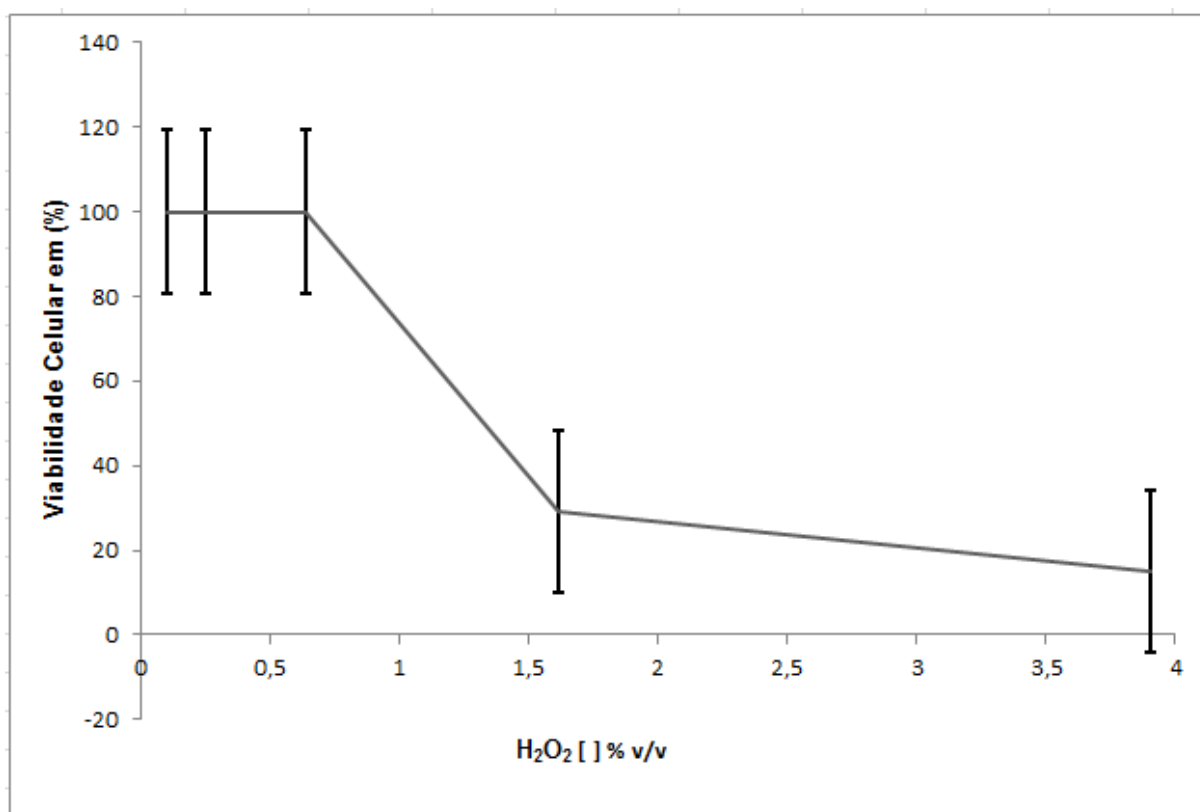
### 3.17 Análise estatística

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  $p < 0,05$ . O valor de  $p$  na faixa entre 0,06 e 0,09 é uma tendência estatística de significância. Todas as análises foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism* versão 5.0 para Windows (San Diego, California, USA).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Padronização através da Curva Concentração-Resposta da Concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizada em PBMC

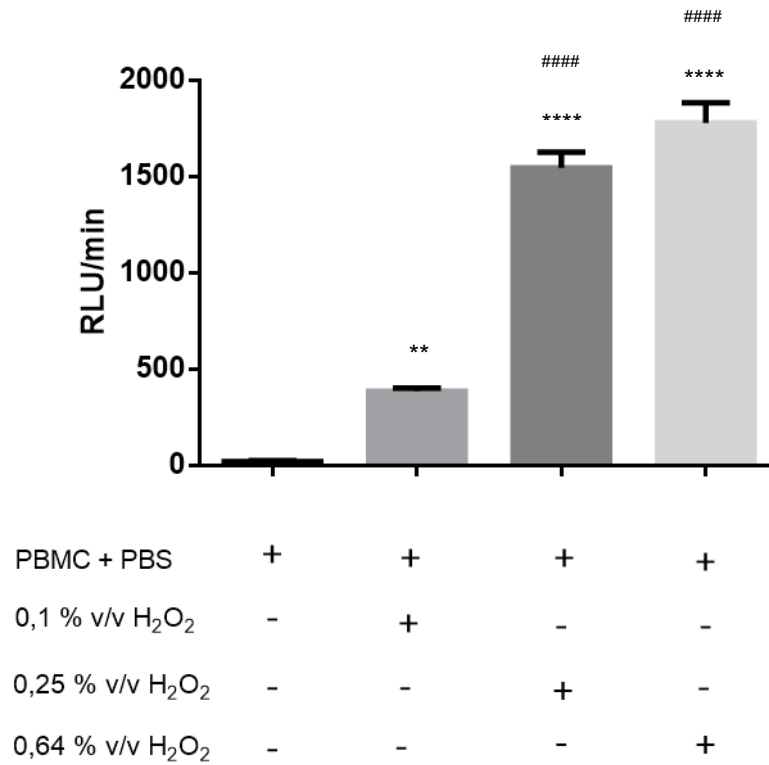
O tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é utilizado com a finalidade de mimetizar um ambiente de EO (ao adicionar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> externamente e estimular a produção intracelular de ERO) nas PBMC. Como já foi elucidado anteriormente em um ambiente de EO, há vários processos deletérios e pode levar a morte celular. Então, foi necessário testar concentrações crescentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas PBMC da faixa etária de 20-39 anos (metabolismo oxidativo não está alterado). para encontrar uma concentração ou uma faixa de concentrações capazes de gerar um EO mas que não matassem as células. Os resultados obtidos estão apresentados na **Figura 15**.



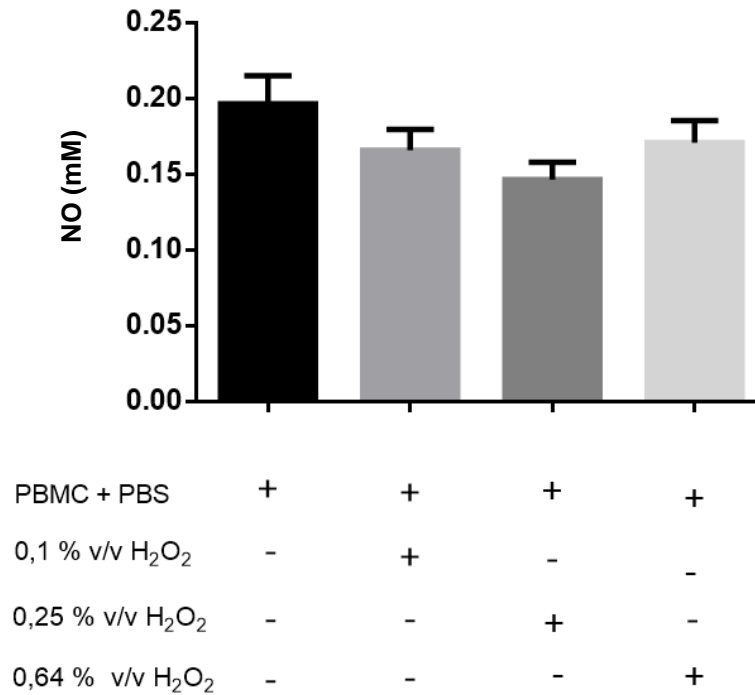
**Figura 15: Curva Concentração-Resposta de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em PBMC da faixa etária de 20-39 anos.** As PBMC foram estimuladas por concentrações crescentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.1% v/v; 0.25% v/v ; 0.64% v/v; 1.61% v/v; 3.9% v/v); e a viabilidade das mesmas foi testada através do teste de Azul de Tripán. n = 9.

---

Pela análise da **Figura 15** acima, torna-se claro que a partir da concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  1.61% v/v e as subsequentes, as PBMC não se mantiveram dentro do limite aceitável de viabilidade para procedência de ensaios celulares. As concentrações de 0.1% v/v, 0,25% v/v e 0,64% v/v geraram um estímulo significativo de produção de ERO em relação ao grupo basal (PBMC da faixa etária de 20 a 29 anos + PBS) nos ensaios de Quimioluminescência (**Figura 16**). Porém, a produção de ERO da concentração de 0.1% v/v foi menor (significativo) em relação as concentrações de 0,25% v/v e 0,64% v/v (melhor estímulo) que não tiveram diferença estatística entre si. Portanto, essas duas maiores concentrações apresentaram um limite máximo de produção de ERO que ultrapassado causaria a morte celular (**Figura 15**). Já no ensaio de NO (**Figura 17**) as três concentrações não diferiram estatisticamente entre si e com o basal (PBMC da faixa etária de 20 a 29 anos + PBS). Portanto a concentração de 0,64% v/v foi escolhida para os ensaios desenvolvidos nas PBMC da faixa etária de Meia Idade e Idosos.



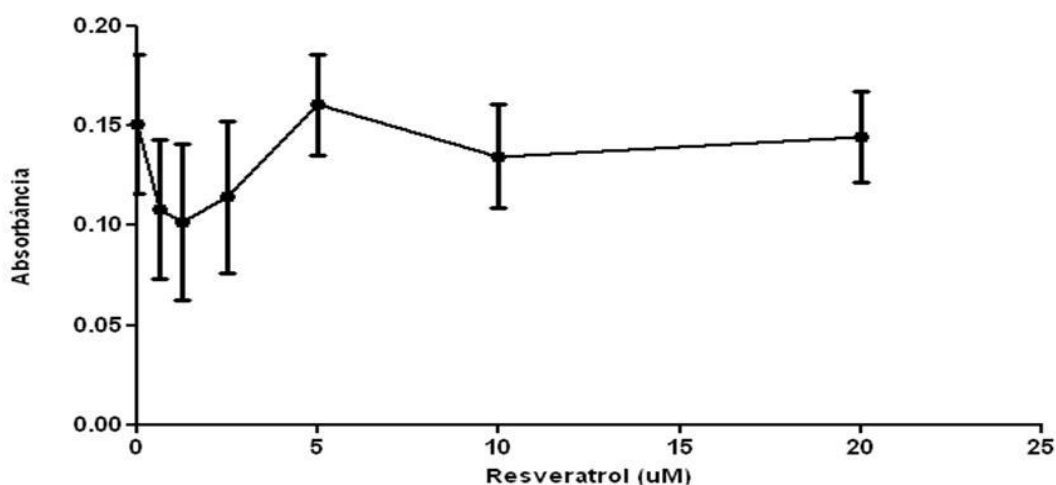
**Figura 16: Avaliação da produção de ERO induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em PBMC da faixa etária de 20-39 anos.** A geração de ERO foi expressa em RLU/min durante 10 minutos; \*\* = p < 0,005; \*\*\*\* e #### = p < 0,0001; resultado significativo pela análise de ANOVA pós-teste Bonferroni \*\* e \*\*\*\* em relação ao grupo PBMC + PBS . #### em relação ao grupo estimulado com 0,1% v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. n=10.



**Figura 17: Avaliação da produção de NO induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em PBMC da faixa etária de 20-39 anos.** A geração de NO foi expressa em mM. Não há diferença significativa entre os grupos pelo ANOVA teste, pós-teste de Bonferroni's Multiple Comparasion. n=10.

#### 4.2 Padronização através da Curva Concentração-Resposta da Concentração de RSV utilizada em Leucócitos Humanos

Os Leucócitos Humanos foram estimulados com concentrações crescentes de RSV. Os resultados realizados por Lara *et al.* (2018) estão expostos na **Figura 18**.

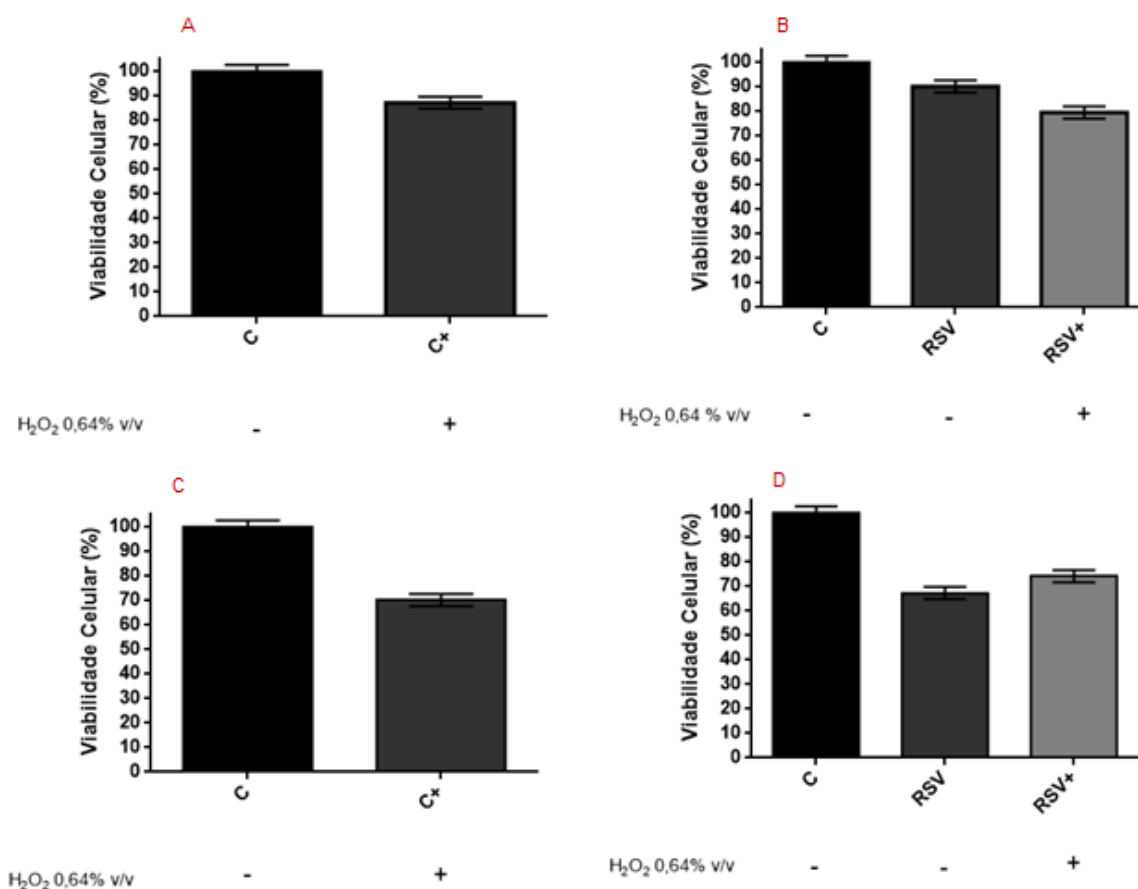


**Figura 18: Curva Concentração-Resposta de RSV em Leucócitos Humanos.** Leucócitos Humanos foram estimulados por concentrações crescentes de RSV (0,63 µM; 1,25 µM; 2,5 µM; 5 µM; 10 µM e 20 µM ) e a absorbância, a fim de se verificar o estímulo do RSV nas células foi medida por mudança da intensidade da coloração à 570 nm em Leitor de microplacas através do Teste de MTT. A concentração escolhida foi 5 µM que apresentou um pico de absorvância ( $p < 0,05$ ) e corresponde a dosagem fisiológica. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada concentração.  $n=9$ .

A **Figura 18** mostra resultados da curva Concentração-Resposta do RSV, obtida através do teste de metabolização de MTT. A concentração de 5 µM foi a que apresentou maior ( $p < 0,05$ ) capacidade de metabolização de MTT com uma percentagem de Viabilidade Celular maior que 95%. Sendo esta, a concentração de escolha para os ensaios desenvolvidos nas PBMC.

### 4.3 Viabilidade das PBMC aos tratamentos

A fim de mensurar a Viabilidade das PBMC dos grupos de Meia idade e de Idosos frente aos estímulos padronizados: RSV 5 µM e  $H_2O_2$  0.64% v/v, procedemos com o ensaio do MTT. Para as duas faixas etárias, o ensaio do MTT foi realizado com quatro grupos: grupo basal (avaliar a viabilidade da célula), grupo com  $H_2O_2$  0.64% v/v, grupo com RSV 5 µM e grupo com RSV 5 µM +  $H_2O_2$  0.64% v/v. A representação gráfica foi dividida em quatro painéis para destacar em relação ao grupo basal a atuação do  $H_2O_2$  0.64% v/v que é um ativador do EO (Painel A= Meia idade; Painel C= Idosos) e a atuação do RSV 5 µM que é um inibidor do EO (Painel B= Meia idade; Painel D= Idosos). Os resultados obtidos são apresentados na **Figura 19** abaixo.



**Figura 19: Avaliação da viabilidade das PBMC expostas ao RSV 5 $\mu$ M e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,64 % v/v.** Painel A e B= Grupo de Meia idade e Painel C e D=grupo de Idosos. A viabilidade celular foi expressa em % de células vivas. Não há diferença significativa entre os grupos pelo ANOVA teste, pós-teste de Bonferroni's Multiple Comparasion. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada grupo. n (Meia idade) = 6; n (Idosos) = 6.

O teste de Viabilidade Celular pelo método colorimétrico de MTT provou que nas duas faixas etárias: Meia idade (Painel A e B) e Idosos (Painel C e D), as PBMC mantiveram-se dentro dos parâmetros exigidos de Viabilidade Celular. Ou seja, permaneceram em valores acima de 70% de células viáveis para todos os grupos avaliados, já que a redução da Viabilidade Celular em mais de 30% (viabilidade menor que 70%) é considerada um efeito citotóxico (ISO, 2009). Comparando as duas faixas etárias, percebe-se que nos grupos tratados, a Viabilidade Celular das células provenientes de indivíduos Idosos reduziu cerca de 20% em relação aos indivíduos de Meia idade.



#### 4.4 Avaliação Comparativa por Quimioluminescência dependente de Luminol do efeito do RSV nas faixas etárias de Meia idade e Idosos

Diante da certificação de que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.64% v/v promove um EO nas PBMC mantendo a viabilidade das mesmas, e de que o RSV 5µM seria nossa concentração de escolha; verificamos se H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.64% v/v e o RSV 5 µM reagem inespecificamente entre si e/ou com o Luminol através da realização dos experimentos descritos na tabela 4. Os resultados são vistos na tabela 10.

**Tabela 10: Controles sem células/com células no Ensaio de Quimioluminescência**

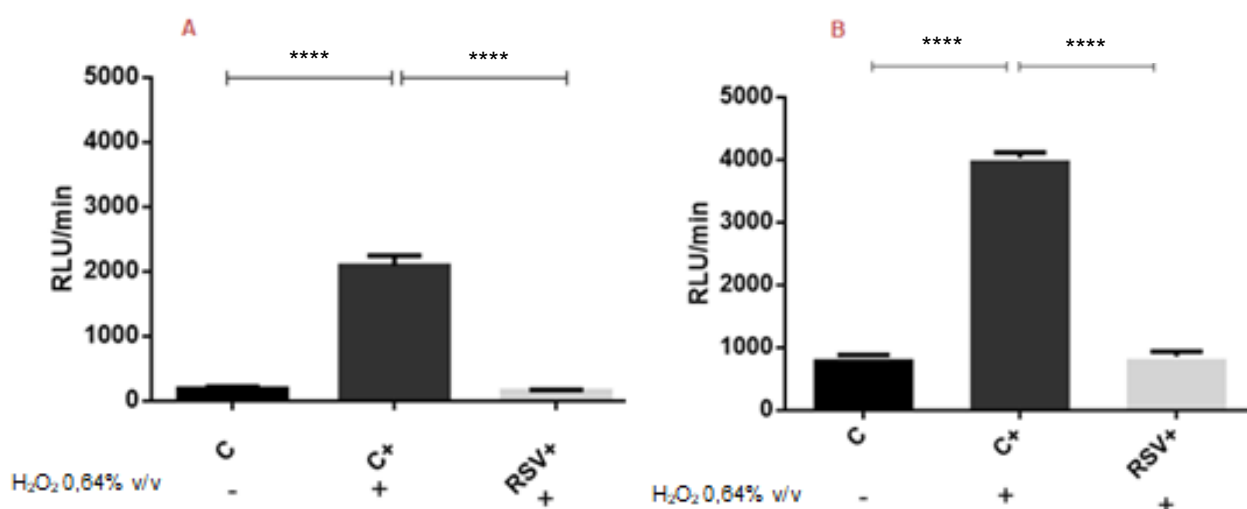
Tratamentos	RLU/min
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v	58.54 ± 5.78
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v + RSV 5 µM	14.34 ± 2.21
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v + PBMC Meia idade	2083,65 ± 161,60****
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v + PBMC Idosos	4027,2 ± 85,49****
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v + RSV 5 µM + PBMC Meia idade	153,35 ± 15,86
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v + RSV 5 µM + PBMC Idosos	855,36 ± 80,91####

\*\*\*\* Diferença estatística (p<0,0001) em relação ao grupo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,64% v/v por ANOVA one way, pós-teste Bonferroni.

#### Diferença estatística (p<0,0001) em relação ao grupo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,64% v/v + RSV 5 µM por ANOVA one way, pós-teste Bonferroni.  
n (Meia idade) = 34; n (Idosos) = 16.  
Os controles sem células foram realizados em quintuplicata.

De acordo com os resultados da tabela 10, confirma-se que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,64% v/v e o RSV 5 µM precisam da maquinaria celular para atuar.

Realizamos então os tratamentos nas PBMC de duas faixas etárias (Meia idade e Idosos) e comparamos os dois grupos. Seguem abaixo os resultados obtidos na **Figura 20** e na tabela 11.



**Figura 20: Avaliação do efeito do RSV na produção de ERO em PBMC induzidas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Painel A= Meia idade e Painel B = Idosos. A geração de ERO foi expressa em RLU/min. \*\*\*\*=p<0,0001; resultado significativo por ANOVA one way, pós-teste Bonferroni. n (Meia idade) = 34; n (Idosos) = 16.

Quando as PBMC do grupo de Meia-idade (Painel A) são expostas isoladamente ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.64% v/v, há um aumento de aproximadamente 1100% na produção de ERO em relação ao grupo sem nenhum estímulo. Com a adição de RSV 5 μM, a geração de ERO reduziu abaixo dos níveis basais.

Quando as PBMC do grupo dos Idosos (Painel B) são expostas isoladamente ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.64% v/v, há um aumento de aproximadamente 400% na produção de ERO em relação ao grupo sem nenhum estímulo. Com a adição de RSV 5 μM, a geração de ERO reduziu aos níveis basais.

**Tabela 11: Análise comparativa entre as duas faixas etárias do efeito do RSV**

Tratamentos	Meia-idade (RLU/min)	Idosos (RLU/min)
Basal	183,60 ± 36,96	852,34 ± 28,39****
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v	2083,65 ± 161,60	4027,20 ± 85,49****
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v + RSV 5 μM	153,35 ± 15,86	855,36 ± 80,91****

\*\*\*\* Diferença estatística (p<0,0001) em relação ao respectivo grupo de 40-59 anos.

RSV 5 μM + PBMC meia-idade: 21.23 ± 0.87 RLU/min

RSV 5 μM + PBMC idosos: 747,4 ± 199.1 RLU/min

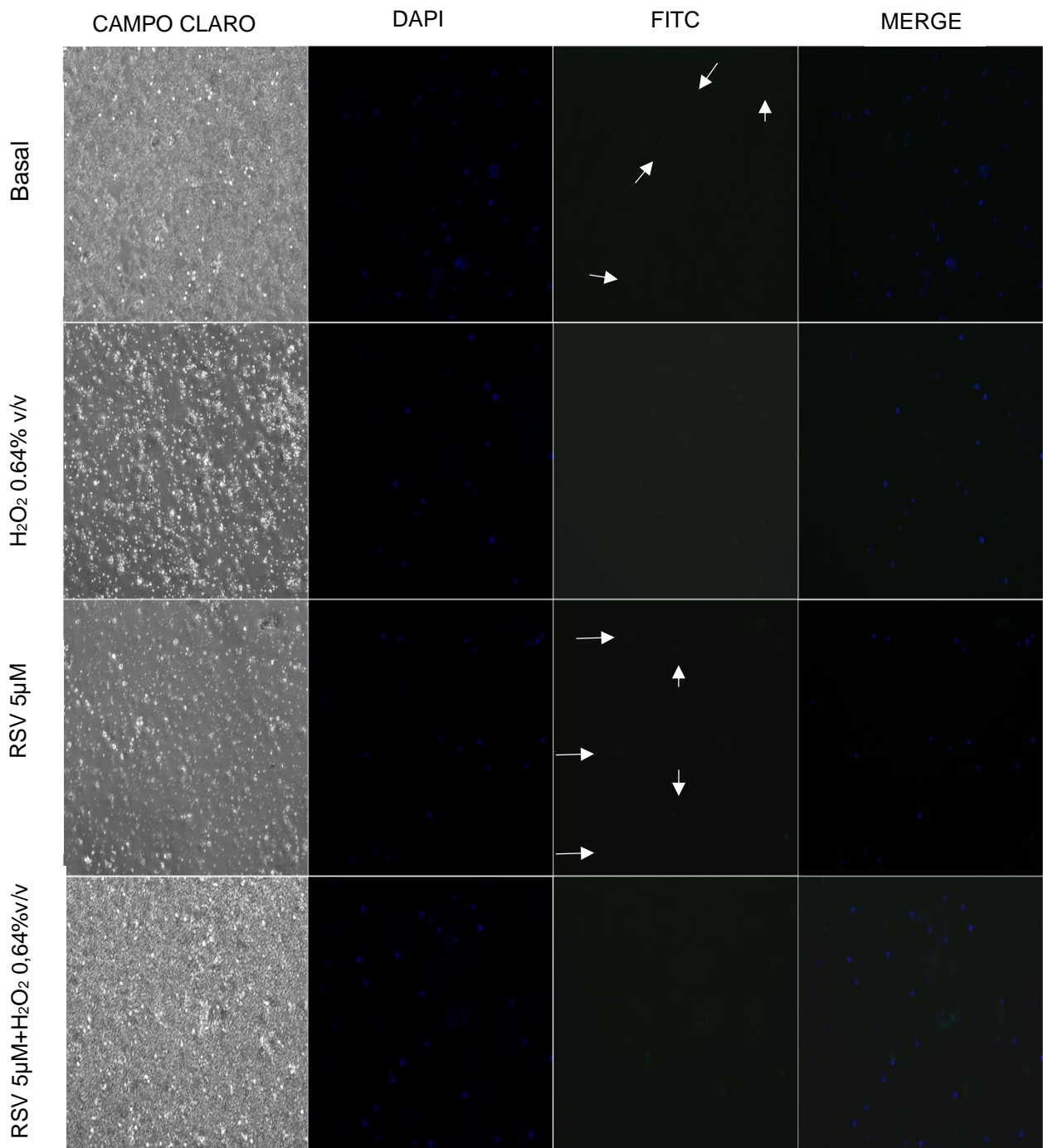
n (Meia idade) = 34; n (Idosos) = 16.

---

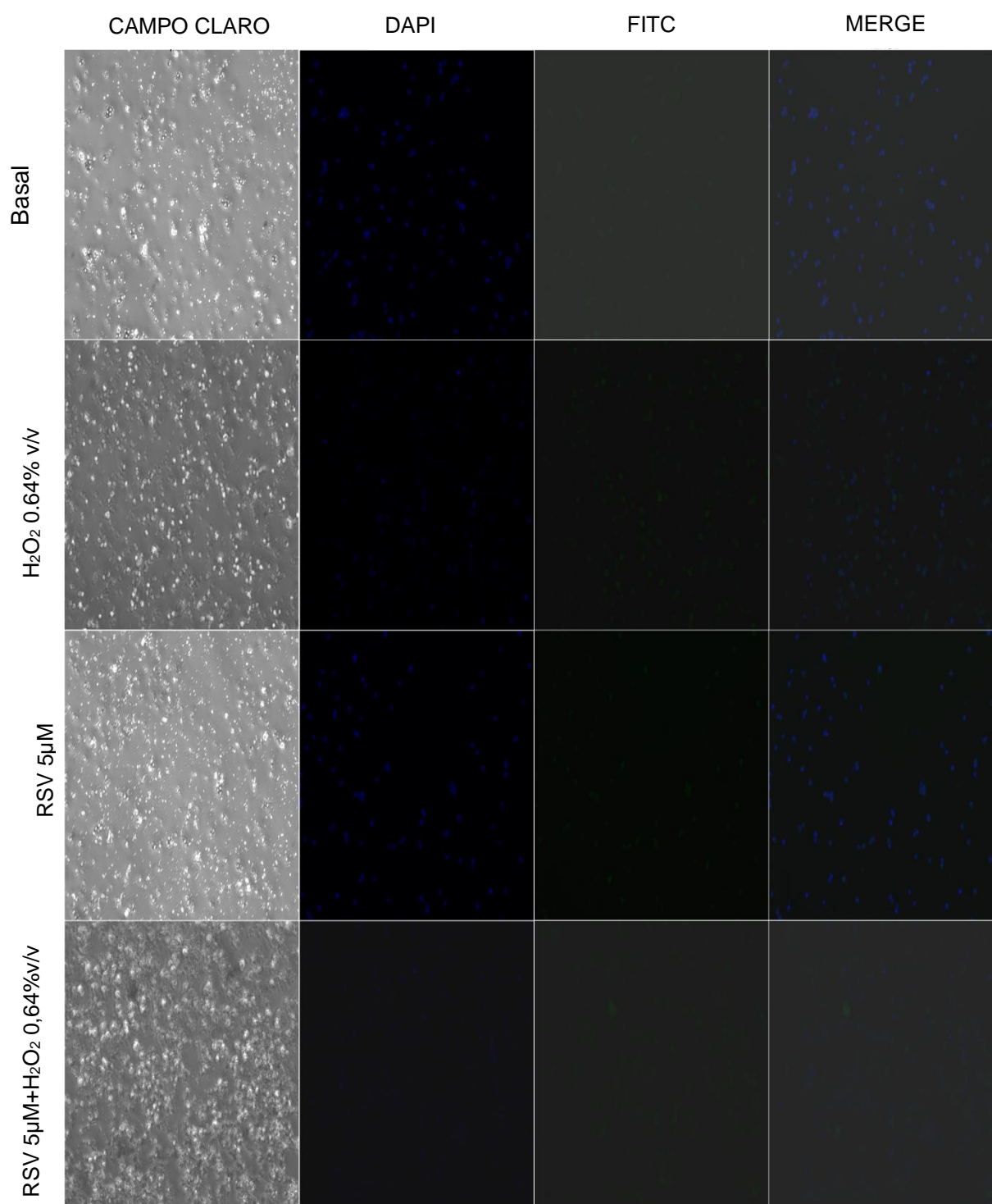
Comparando as duas faixas etárias pela tabela 10, percebe-se que o grupo basal dos Idosos tem quase 800% mais produção de ERO que a faixa de Meia-idade. Em relação ao grupo exposto somente ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.64% v/v dos Idosos tem quase 200% da produção de ERO em relação a faixa de Meia-idade. O grupo que teve adição do RSV 5 µM dos Idosos tem quase 800% mais produção de ERO que a faixa de Meia-idade.

#### **4.5 Avaliação Comparativa qualitativa por Microscopia de Fluorescência do efeito do RSV nas faixas etárias de Meia Idade e Idosos**

Com o intuito de qualificar e visualizar a produção de ERO pelas PBMC estimulamos as células com os tratamentos descritos na tabela 5. Os resultados estão expostos nas **Figura 21 e Figura 22**.



**Figura 21: Representação qualitativa da produção de ERO em PBMC de Meia idade estimuladas com RSV. As amostras foram marcadas com Carboxi- H<sub>2</sub>DCFDA e visualizadas através de Microscopia de Fluorescência. n = 6.**



**Figura 22: Representação qualitativa da produção de ERO em PBMC de Idosos estimuladas com RSV.** As amostras foram marcadas com Carboxi- H<sub>2</sub>DCFDA e visualizadas através de Microscopia de Fluorescência. n = 6.

A análise das **Figuras 21 e 22** ilustram os resultados da Quimioluminescência apresentados na **Figura 20**. O DAPI é um fluorocromo para marcação nuclear do DNA celular. Na faixa etária dos Idosos (**Figura 22**), no grupo basal há maior produção de ERO em relação a faixa etária de Meia-idade (**Figura 21**). Essa produção é exacerbada quando as células são expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.64% v/v e o grupo dos Idosos (**Figura 22**), continua apresentando maior produção de ERO em relação ao grupo de Meia idade (**Figura 21**). Nas duas faixas etárias (**Figura 21 e Figura 22**), o RSV 5 µM consegue reduzir a produção de ERO a níveis aproximadamente basais.

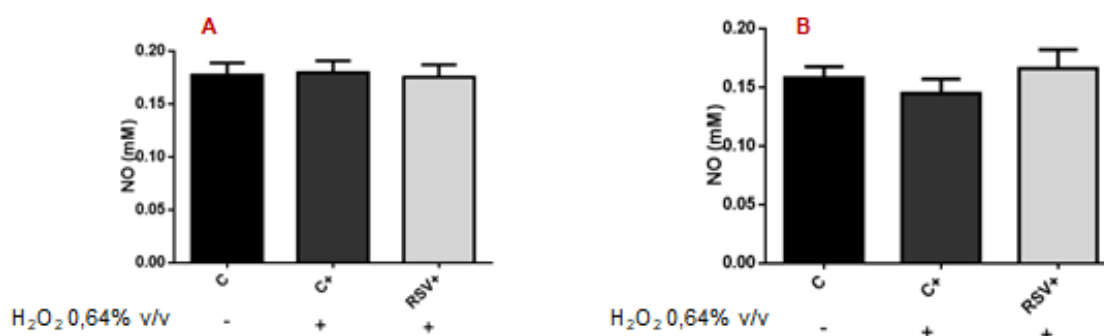
#### 4.6 Avaliação Comparativa pelo método de *GRIESS* do efeito do RSV nas faixas etárias de Meia Idade e Idosos

Com o objetivo de quantificar a produção de NO, um importante componente do EO e assim do envelhecimento juntamente com as ERO, estimulamos as PBMC de acordo com os tratamentos expostos na tabela 6. Os resultados estão expostos na **Figura 23** e os resultados de Viabilidade Celular pelo Ensaio de Exclusão pelo Azul de Trypan estão exposto na tabela 12.

**Tabela 12: Viabilidade Celular obtida através do teste de Azul de Tripán dos grupos do ensaio de NO**

Tratamentos	Viabilidade Celular (%)	
	Grupo de Meia idade	Grupo de Idosos
Basal	99	99
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v	97	96
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v + RSV 5 µM	98	96
RSV 5 µM	99	100

Não há diferença significativa entre os grupos pelo ANOVA teste, pós-teste de Bonferroni's Multiple Comparasion. Viabilidade encontrada pelo cálculo de média aritmética dos valores individuais. n (Meia idade) = 21; n (Idosos) = 16.



**Figura 23: Avaliação comparativa do efeito do RSV na produção de NO em PBMC.** Painel A = Meia idade e Painel B = Idosos. A geração de NO foi expressa em mM. Não há diferença significativa entre os grupos pelo ANOVA teste, pós-teste de Bonferroni's Multiple Comparasion. Resultados controle faixa etária 20-39 anos: basal (C) =  $0,16 \pm 0,05$  mM; C + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,64% v/v) =  $0,09 \pm 0,002$  mM; C + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,64% v/v) + RVS 5  $\mu$ M =  $0,31 \pm 0,09$  mM ( $p < 0,05$ ).

Painel A: Grupo RSV 5  $\mu$ M ( sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):  $0,19 \pm 0,05$  mM

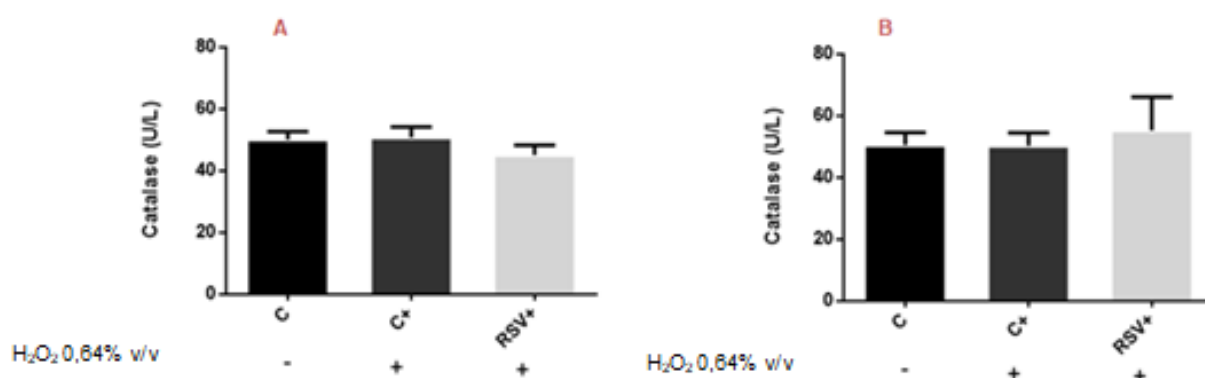
Painel B: Grupo RSV 5  $\mu$ M ( sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):  $0,18 \pm 0,07$  mM

n (Meia idade) = 21; n (Idosos) = 16.

Analisando o Painel A, grupo de Meia idade, percebe-se que não houve um aumento da quantidade de NO nas PBMC estimuladas com RSV 5  $\mu$ M, se comparadas às mesmas sem nenhum estímulo ou expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,64 % v/v. O mesmo perfil é observado quando avaliamos as PBMC expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,64 % v/v em relação as células sem estímulo. Já na análise do painel B, grupo dos Idosos, percebe-se que não houve um aumento da quantidade de NO nas PBMC estimuladas com RSV 5  $\mu$ M, se comparadas às mesmas sem nenhum estímulo, porém houve um aumento (não significativo) em relação as células expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,64 % v/v. O mesmo perfil é observado quando avaliamos as PBMC sem estímulo em relação as expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,64 % v/v.

#### 4.7 Avaliação Comparativa do efeito do RSV nas faixas etárias de Meia Idade e Idosos sobre a atividade da CAT

Para avaliar a interferência do RSV sobre a atividade da CAT em PBMC, estimulamo-las com os tratamentos descritos na tabela 7. Os resultados foram expressos na **Figura 24**.



**Figura 24: Avaliação comparativa do efeito do RSV na atividade da CAT em PBMC .** Painel A = Meia idade e Painel B = Idosos. A atividade foi medida em U/L (Unidade de massa atômica/litro) . Não há diferença significativa entre os grupos pelo ANOVA teste, pós-teste de Bonferroni's Multiple Comparasion.

Resultados controle faixa etária 20-39 anos: basal (C) =  $42,64 \pm 3,64$  U/L; C + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,64% v/v) =  $15,69 \pm 2,34$  U/L; C + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,64% v/v) + RVS 5  $\mu$ M =  $63,87 \pm 5,42$  U/L ( $p < 0,05$ ).

Painel A: Grupo RSV 5  $\mu$ M ( sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):  $47.67 \pm 2.51$  U/L

Painel B: Grupo RSV 5  $\mu$ M ( sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):  $50.11 \pm 8.56$  U/L

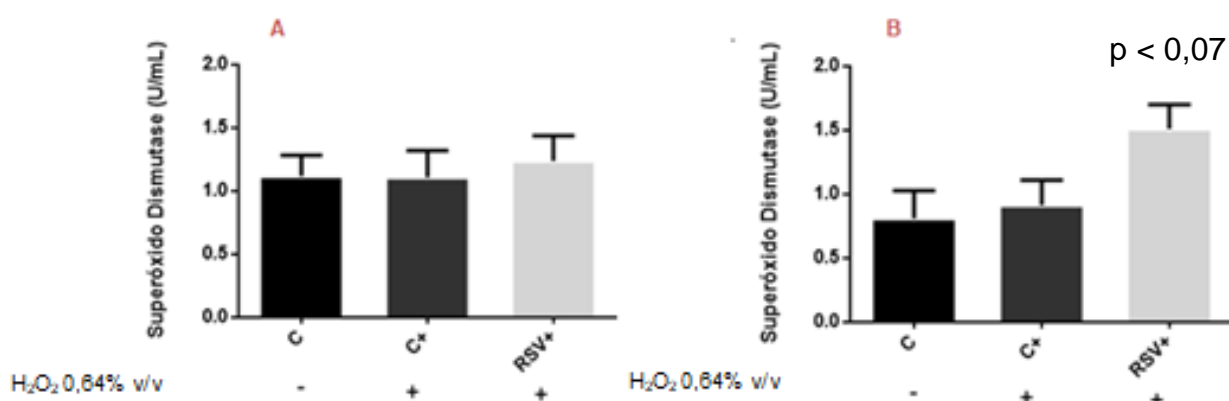
n (Meia idade) = 15; n (Idosos) = 9.

Analisando o Painel A, grupo de Meia idade, e o Painel B, grupo dos Idosos, percebe-se que não houve um aumento da atividade da CAT nas PBMC estimuladas com RSV 5  $\mu$ M, se comparadas às mesmas sem nenhum estímulo ou expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,64% v/v. O mesmo perfil é observado quando avaliamos as PBMC expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,64% v/v em relação as células sem estímulo.

#### 4.8 Avaliação Comparativa do efeito do RSV nas faixas etárias de Meia Idade e Idosos sobre a atividade da SOD

Para avaliar a interferência do RSV sobre a atividade da SOD em PBMC, estimulamo-las com os tratamentos descritos na tabela 7. Os resultados foram expressos na **Figura 25**.





**Figura 25: Avaliação comparativa do efeito do RSV na atividade da SOD em PBMC .** Painei A = Meia idade e Painei B = Idosos. A atividade foi medida em U/mL (Unidade de massa atômica/mililitro). Não há diferença significativa entre os grupos pelo ANOVA teste, pós-teste de Bonferroni's Multiple Comparasion. Na faixa etária dos idosos, ao comparar o grupo de células estimuladas com o RSV em relação aos demais grupos (sem estímulo e células somente expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), como valor de  $p < 0,07$  está na faixa entre 0,06 e 0,09 é uma tendência estatística de significância. Resultados controle faixa etária 20-39 anos: basal (C) =  $1,5 \pm 0,01$  U/mL; C + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,64% v/v) =  $0,23 \pm 0,003$  U/mL; C + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,64% v/v) + RVS 5 μM =  $3,6 \pm 0,12$  U/mL ( $p < 0,05$ ).

Painei A: Grupo RSV 5 μM ( sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):  $1.52 \pm 0.28$  U/L

Painei B: Grupo RSV 5 μM ( sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):  $1.33 \pm 0.33$  U/L

n (Meia idade) = 13; n (Idosos) = 9.

Analisando o Painei A, grupo de Meia idade, percebe-se que não houve um aumento na atividade da SOD nas PBMC estimuladas com RSV 5 μM, se comparadas às mesmas sem nenhum estímulo ou expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,64% v/v. O mesmo perfil é observado quando avaliamos as PBMC expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,64% v/v em relação as células sem estímulo. Já na análise do painei B, grupo dos Idosos, percebe-se que houve uma tendência (permitido estatisticamente se o valor de p estiver entre 0,06 e 0,08, o encontrado no experimento foi 0,07) de aumento na atividade da SOD nas PBMC estimuladas com RSV 5 μM, se comparadas às mesmas sem nenhum estímulo ou expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,64% v/v. Já quando avaliamos as PBMC sem estímulo em relação as expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,64% v/v percebe-se não houve um aumento na atividade da SOD. Ao comparar as duas faixas etárias (tabela 13), percebe-se que as PBMC sem estímulo e expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,64% v/v provenientes de indivíduos Idosos tem uma menor atividade (não

significativa) de SOD em relação as células provenientes de indivíduos de Meia idade que é restaurada quando estimuladas com o RSV 5  $\mu$ M.

**Tabela 13; Análise comparativa entre as duas faixas etárias do efeito do RSV na atividade da SOD**

Tratamentos	Meia-idade (U/mL)	Idosos (U/mL)
Basal	1,12 $\pm$ 0,16	0,81 $\pm$ 0,21
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v	1,11 $\pm$ 0,21	0,91 $\pm$ 0,19
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v + RSV 5 $\mu$ M	1,24 $\pm$ 0,20	1,51 $\pm$ 0,19

Não há diferença significativa entre os grupos pelo ANOVA teste, pós-teste de Bonferroni's Multiple Comparasion.

n (Meia idade) = 13; n (Idosos) = 9.

#### 4.9 Avaliação Comparativa por Quimioluminescência dependente de Luminol do efeito do RSV nas faixas etárias de Meia idade e Idosos na via da SIRT1

Para verificar se o Sirtinol necessita da maquinaria celular ou se reage inespecificamente com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,64% v/v e com o RSV 5  $\mu$ M, foi realizado experimentos como descritos na tabela 8. Os resultados são vistos na tabela 14.

**Tabela 14: Controles sem células/com células no Ensaio de Quimioluminescência com o Inibidor da via SIRT1**

Tratamentos	RLU/min
Sirtinol + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v	81.33 $\pm$ 9.81
Sirtinol + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v + RSV 5 $\mu$ M	61.63 $\pm$ 0.24
Sirtinol + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v + PBMC Meia idade	24697 $\pm$ 1667****
Sirtinol + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v + RSV 5 $\mu$ M + PBMC Meia idade	4761 $\pm$ 177,8####
Sirtinol + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v + PBMC Idosos	20415 $\pm$ 1792****
Sirtinol + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v + RSV 5 $\mu$ M + PBMC Idosos	1990 $\pm$ 293.8####

\*\*\*\* Diferença estatística ( $p < 0,0001$ ) em relação ao grupo de Sirtinol + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,64% v/v por ANOVA one way, pós-teste Bonferroni.

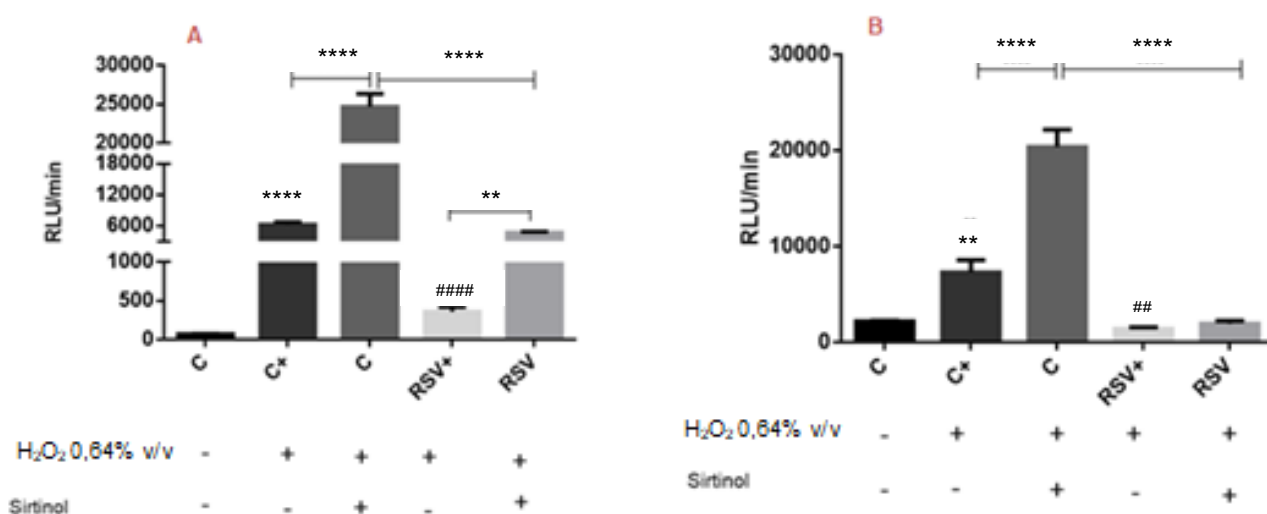
#### Diferença estatística ( $p < 0,0001$ ) em relação ao grupo de Sirtinol + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,64% v/v + RSV 5  $\mu$ M por ANOVA one way, pós-teste Bonferroni.

n (Meia idade) = 10; n (Idosos) = 13.

Os controles sem células foram realizados em triplicata.

De acordo com os resultados da tabela 14 confirma-se que o inibidor da SIRT 1 precisa da maquinaria celular para atuar.

As PBMC foram incubadas com o Inibidor de SIRT1 Sirtinol, a fim de avaliar o papel do RSV sobre essa via de sinalização. Posteriormente, receberam os tratamentos padrão (tabela 9). Seguem abaixo os resultados obtidos na **Figura 26**.



**Figura 26: Avaliação comparativa do efeito do RSV sobre a via de SIRT1 na produção de ERO em PBMC induzidas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Painel A= Meia idade e Painel B = Idosos. A geração de ERO foi expressa em RLU/min. \*\* e ## < 0,005; \*\*\*\* e #### p < 0,0001 significativo por ANOVA one way, pós-teste Bonferroni.

\*\*\*\* e \*\*: em relação ao grupo C

#### e ##: em relação ao grupo C+

Painel A: grupo RSV<sup>-</sup> (sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e sem sirtinol): 21.50 ± 0.97 RLU/min; grupo C (com Sirtinol): 17.99 ± 3.10 RLU/min; grupo RSV<sup>+</sup> (sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e com sirtinol): 17.53 ± 1.02 RLU/min.

Painel B: grupo RSV<sup>-</sup> (sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e sem sirtinol): 1076. ± 152.1 RLU/min; grupo C (com Sirtinol): 25.16 ± 11.92 RLU/min; grupo RSV<sup>+</sup> (sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e com sirtinol): 22.24 ± 4.61 RLU/min.

n (Meia idade) = 10; n (Idosos) = 13.

Observando a **Figura 26** acima, verificamos perfis diferentes de resposta do RSV sob a via de sinalização SIRT1 nas duas faixas etárias, **Meia-idade** (Painel A) e **Idosos** (Painel B). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,64 % v/v isoladamente, assim como em acréscimo com Sirtinol, inibidor de SIRT 1, aumentaram em grande escala a produção de ERO nas

---

duas faixas etárias em relação ao grupo basal e ao grupo só exposto ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,64 % v/v respectivamente; este último sugerindo dessa maneira que a SIRT1 apresenta atividade antioxidante em PBMC em situações de EO, tanto em indivíduos de Meia-idade como em Idosos. As células que tiveram adição do RSV 5 µM ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,64 % v/v diminuíram a geração de ERO comparando-se ao estímulo único com o oxidante nas duas faixas etárias, o que era esperado. Já as incubadas com a tríade (RSV, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Sirtinol) apresentaram um comportamento diferenciado de uma faixa etária para a outra: nas células pertencentes aos indivíduos de Meia idade, houve diferença em relação ao grupo apenas sem o inibidor; já nas células pertencentes aos indivíduos Idosos não houve diferença em referência ao grupo apenas sem inibidor, atingindo valores similares aos das células em estado basal. Esses resultados, sinalizam que o RSV 5 µM tem uma modificação de seu mecanismo de acordo com a idade: em indivíduos de Meia idade, o RSV 5 µM atua pela SIRT1 (e possivelmente por outras vias antioxidantes também, já que a inibição não foi completa em relação ao grupo exposto ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Sirtinol) e em indivíduos Idosos, o RSV 5 µM não atua por essa via.

#### **4.10 Avaliação Comparativa por Quimioluminescência dependente de Luminol do efeito do RSV nas faixas etárias de Meia idade e Idosos na via de AMPK**

Para verificar se o Compound C necessita da maquinaria celular ou se reage inespecificamente com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,64% v/v e com o RSV 5 µM, foi realizado experimentos como descritos na tabela 8. Os resultados são vistos na tabela 15.

**Tabela 15: Controles sem células/ com células no Ensaio de Quimioluminescência com o Inibidor da via AMPK**

Tratamentos	RLU/min
Compound C + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v	142.30 ± 17.11
Compound C + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v + RSV 5 µM	120.93 ± 0.26
Compound C + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v + PBMC Meia idade	4319 ± 573.8****
Compound C + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v + RSV 5 µM + PBMC Meia idade	542.5 ± 144.6 <sup>#</sup>
Compound C + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v + PBMC Idosos	4659 ± 776.2****
Compound C + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,64% v/v + RSV 5 µM + PBMC Idosos	503.5 ± 115.2 <sup>#</sup>

\*\*\*\* Diferença estatística ( $p < 0,0001$ ) em relação ao grupo de Compound C + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,64% v/v por ANOVA one way, pós-teste Bonferroni.

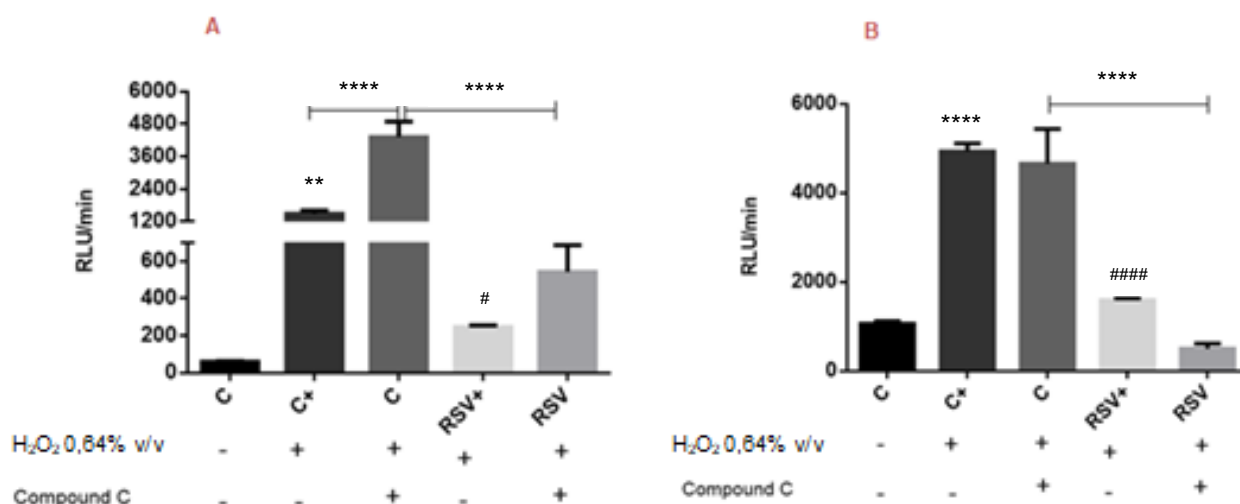
<sup>#</sup> Diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo de Compound C + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,64% v/v + RSV 5 µM por ANOVA one way, pós-teste Bonferroni.

n (Meia idade) = 13; n (Idosos) = 11.

Os controles sem células foram realizados em triplicata.

De acordo com os resultados da tabela 15, confirma-se que o inibidor da AMPK precisa da maquinaria celular para atuar.

As PBMC foram também incubadas com o Inibidor de AMPK Compound C, a fim de avaliar o papel do RSV sobre essa via de sinalização. Posteriormente, receberam os tratamentos padrão (tabela 9). Seguem abaixo os resultados obtidos na **Figura 27**.



**Figura 27: Avaliação comparativa do efeito do RSV sobre a via de AMPK na produção de ERO em PBMC induzidas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Paineis A= Meia idade e Painel B = Idosos. A geração de ERO foi expressa em RLU/min. #p < 0,05; \*\* p < 0,005; \*\*\*\* e ##### p < 0,0001 significativo por ANOVA one way, pós-teste Bonferroni.

\*\* e \*\*\*\*: em relação ao grupo C

# e #####: em relação ao grupo C<sup>+</sup>

Painel A: grupo RSV<sup>-</sup> (sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e sem sirtinol): 20.96 ± 0.72 RLU/min; grupo C (com Sirtinol): 16.75 ± 1.91 RLU/min; grupo RSV<sup>+</sup> (sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e com sirtinol): 15.88 ± 1.54 RLU/min.

Painel B: grupo RSV<sup>-</sup> (sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e sem sirtinol): 419.1 ± 55.84 RLU/min; grupo C (com Sirtinol): 32.97 ± 1.86 RLU/min; grupo RSV<sup>+</sup> (sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e com sirtinol): 17.77 ± 1.70 RLU/min.

n (Meia idade) = 13; n (Idosos) = 11.

Observando a **Figura 27** acima, verificamos perfis diferentes de atuação da via de sinalização AMPK nas duas faixas etárias, **Meia-idade** (Painel A) e **Idosos** (Painel B). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,64 % v/v isoladamente aumentou a produção de ERO em aproximadamente 2400% na faixa etária de Meia idade e de aproximadamente 300% na faixa etária dos Idosos em relação ao grupo basal. Já com o acréscimo do Compound C, inibidor de AMPK, houve diferença entre as duas faixas etárias: nos indivíduos pertencentes ao grupo de Meia idade, houve um aumento em aproximadamente 200% da produção de ERO em relação ao grupo sem o inibidor, sugerindo dessa maneira que a AMPK é uma via com atividade antioxidante em PBMC em situações de EO em indivíduos de Meia-idade. Já nos indivíduos

---

pertencentes ao grupo dos Idosos, não houve diferença na produção de ERO comparando o grupo exposto ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,64 % v/v com adição do inibidor e o grupo somente com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,64 % v/v. O que sugere que nas PBMC dos Idosos, a via de AMPK não tem atividade antioxidante em situações de EO. Esses resultados, sinalizam que a via de AMPK tem seu caráter antioxidante silenciado no envelhecimento. As células que tiveram adição do RSV 5 µM ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,64 % v/v diminuíram a geração de ERO comparando-se ao estímulo único com o oxidante nas duas faixas etárias, o que era esperado. As incubadas com a tríade (RSV, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Compound C) apresentaram comportamentos diferentes de uma faixa etária para a outra: na faixa etária de Meia idade houve aumento (não significativo) da produção de ERO em referência ao grupo apenas sem inibidor, o que infere-se uma atuação do RSV nessa via em indivíduos de Meia idade; na faixa etária dos Idosos houve diminuição (não significativa) da produção de ERO em referência ao grupo apenas sem inibidor, o que infere-se que o RSV não atua nessa via em indivíduos Idosos, já que o RSV consegue reduzir as ERO (exerce função antioxidante) quando a via da AMPK está inibida.

---

## 5 DISCUSSÃO

O envelhecimento é um processo (multifatorial) complexo, definido como um conjunto de mudanças estruturais e funcionais (perda progressiva da integridade fisiológica que leva a uma função prejudicada e uma maior vulnerabilidade a morte) cumulativas, progressivas, intrínsecas e deletérias que usualmente começam a se manifestar na maturidade reprodutiva e terminam na morte. Essa deterioração é o fator de risco primário para a maioria das patologias humanas como o câncer, diabetes, desordens cardiovasculares e doenças neurodegenerativas (SGARBIERI; TERESA; PACHECO, 2017).

Esse contexto de uma maior vulnerabilidade e deterioração do organismo no processo de envelhecimento é verificado na **Figura 19**. Comparando as faixas etárias de Meia idade e dos Idosos, percebe-se que a Viabilidade Celular destes é reduzida a aproximadamente 20% em relação a Viabilidade Celular da faixa etária de Meia idade nos grupos tratados.

A teoria dos RL do envelhecimento, mais tarde nomeada como a teoria do EO do envelhecimento é baseada na hipótese do dano estrutural que diz que as perdas funcionais associadas com o envelhecimento são devidas ao acúmulo do dano oxidativo às macromoléculas (lipídeos, DNA, proteínas) pelas ERO/ERN. Os termos ERO e ERN se referem a derivados não radicalares e radicalares do oxigênio e nitrogênio, respectivamente (LIGUORI *et al.*, 2018).

Com o estabelecimento da relação do EO com o envelhecimento, o interesse por estudar compostos antioxidantes aumentou e dentre esses compostos, o RSV se destacou. Um número vasto de estudos sobre este composto já foi publicado. O RSV foi escolhido para ser analisado devido a sua variedade de efeitos biológicos, incluindo dentre outras propriedades a de antioxidante e anticâncer (STANEVIČIENĖ *et al.*, 2016).

Os resultados apresentados na **Figura 20** e na tabela 10 corroboram a relação do EO com o envelhecimento e a propriedade antioxidante do RSV. Ao comparar o grupo basal das duas faixas etárias, percebe-se que a produção de ERO nas PBMC provenientes dos Idosos é quase 800% maior que a produção das células dos indivíduos de Meia idade. No grupo exposto somente ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, os Idosos



---

tem aproximadamente 200% da produção de ERO em relação a faixa de Meia idade. A discrepância não foi tão relevante como no grupo basal das duas faixas etárias, porque como o grupo basal dos Idosos já tinha um EO elevado, ao expor as células ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a produção de ERO não foi tão elevada porque atingiu um limiar que ultrapassado poderia causar a morte celular. Então assim percebe-se que na faixa etária dos Idosos há um aumento de somente 400% na produção de ERO em relação ao grupo sem estímulo (basal), opondo ao aumento de quase 2000% na produção de ERO das células da faixa etária de Meia idade expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em relação ao grupo sem nenhum estímulo (basal). Com a adição de RSV 5 µM, nas duas faixas etárias houve redução da produção de ERO aos níveis basais, o que confirma a propriedade antioxidante do RSV. Porém, como o grupo basal dos Idosos tem uma produção bem mais exacerbada de ERO em relação ao grupo basal de Meia idade, infere-se uma ação mais eficaz desse composto no grupo de Meia-idade em relação ao dos Idosos. Ou seja, o RSV tem uma atuação mais preventiva do que terapêutica no quadro de EO e do envelhecimento, já que este é caracterizado por um quadro exacerbado de EO. No intuito de confirmarmos esses resultados e analisarmos de forma qualitativa a distribuição destas ERO nas PBMC realizamos o ensaio de Microscopia de Fluorescência pelo uso do marcador de Carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA (**Figura 21 e Figura 22**). Os resultados aqui encontrados corroboram os achados do teste de Quimioluminescência confirmando o perfil diferenciado da produção de ERO nas duas faixas etárias estudadas.

Esse caráter preventivo do RSV já foi verificado por Lara (2018), cujo o estudo foi realizado na linhagem celular Neuro-2A, as quais tiveram a redução da produção de ERO ao serem estimuladas por RSV 5 µM, quando este foi usado na perspectiva de Pré-estímulo. Lin *et al.* (2014) também mostraram que o pré-tratamento de astrócitos com RSV 5 µM foi capaz de suprimir a geração de ERO, além de reduzir a taxa de morte celular, que haviam sido induzidas por glutamato. Bobermin *et al.* (2012) também demonstraram a diminuição da produção de ERO induzida por amônia das células SH-SY5Y (linhagem de neuroblastoma humano) pré-incubadas com RSV.

Como já foi dito anteriormente por Liguori *et al.* (2018), os danos oxidativos gerados pelas ERO e ERN estão relacionados com o envelhecimento, assim,

---

verificamos a atuação do RSV nos níveis de Oxido Nítrico nas duas faixas etárias, além de verificarmos os níveis de NO em estresse elevado e em condições basais.

NO é um RL gasoso de vida curta secretado pelo endotélio. O NO age como um mensageiro intracelular pleiotrópico, exercendo uma variedade de ações biológicas em condições fisiológicas e patológicas. Enquanto baixas concentrações de NO são benéficas para várias funções fisiológicas e celulares, manter o tônus muscular, a coagulação e inflamação bem balanceadas; altas concentrações de NO podem causar efeitos prejudiciais (ASSMANN *et al.*, 2016).

Apesar do NO ter muitos potenciais efeitos tóxicos descritos, a maioria deles são mais prováveis de serem mediados por seus produtos oxidados do que o próprio NO. Evidências recentes indicam que a maior parte da citotoxicidade atribuída ao NO é proveniente do ONOO<sup>-</sup> produzido pela reação controlada de difusão entre o NO e outro RL, o O<sub>2</sub><sup>-</sup>. ONOO<sup>-</sup> interage com lipídeos, DNA e proteínas via reações oxidativas diretas ou via mecanismos indiretos mediados por radicais. Essas reações desencadeiam respostas celulares variando de modulações sutis na sinalização celular a dano oxidativo intenso, levando células a necrose ou apoptose (PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007).

Portanto, EO elevado tem duas consequências principais na biodisponibilidade de NO. Uma maior inativação de NO pelo O<sub>2</sub><sup>-</sup> ou uma menor produção de NO (XIA; FÖRSTERMANN, LI, 2017).

De acordo com essa relação de EO e níveis de NO, Gruber *et al.* (2008) reportaram baixas concentrações de NO em crianças obesas que reflete uma diminuição da biodisponibilidade de NO em relação a crianças não obesas. Ben Anes *et al.* (2014) também observaram que no plasma de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica, há um aumento do EO e uma baixa concentração de NO em relação aos controles.

Em contrapartida, estudos de Correia-Costa *et al.* (2016) evidenciaram um aumento do estado oxidante (leva a um maior risco cardiometabólico) e de NO (impacto negativo na função renal) em crianças com sobrepeso e obesas. Corradi *et*

---

*al.* (1999) também encontraram que o NO exalado está aumentado em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica.

Já Soydinç *et al.* (2007) observaram que em pacientes com doença arterial coronária, há um maior EO em relação ao grupo controle, porém os níveis de NO permaneceram similares. Maziak *et al.* (1998) também observaram que os níveis de NO não eram diferentes entre pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica e controles saudáveis.

Como já foi dito anteriormente, o envelhecimento é caracterizado por um aumento no EO de acordo com a teoria do EO no envelhecimento. Além disso, um alto EO tem por consequência uma menor produção de NO. Portanto, provavelmente no envelhecimento há uma redução nos níveis de NO.

De acordo com essa relação entre envelhecimento e NO, Shin, Berkowitz e Ryoo (2012) demonstraram que a arginase II é super regulada em vasos aórticos de camundongos idosos e contribui para uma menor geração de NO e uma maior produção de ERO. Estudos de Sheth *et al.* (2017) confirmaram que a disponibilidade de NO é prejudicada em indivíduos saudáveis de idade avançada. Venturelli *et al.* (2018) também evidenciaram que em humanos a depleção da disponibilidade de NO está correlacionada com a redução do fluxo sanguíneo cortical, extracranial e periférico durante o envelhecimento e em paralelo com a severidade da doença de Alzheimer. Já Chaves *et al.* (2000) mostrou que em granulócitos humanos ocorre um aumento da produção de NO em função da idade.

O RSV melhora a função endotelial, exerce efeitos antihipertensivos, anti-ateroscleróticos e antihiperlipidêmicos e aumenta a sensibilidade a insulina. Parte dos efeitos protetores do RSV são atribuídos ao NO. O RSV melhora a disponibilidade do NO ao estimular sua produção e por prevenir sua inativação mediada pelo  $O_2^{\cdot-}$  (XIA; FÖRSTERMANN; LI, 2014).

Confirmando a função do RSV nos níveis de NO, resultados de Lara (2018) demonstraram que o RSV atua como protetor neural quando elevou a geração de NO nas células N2-A na forma de Pré-estímulo; e como neuro-regenerador quando

---

o fez no Pós-estímulo. Gonzalez-Vicente, Cabral e Garvin (2014) comprovaram que o RSV aumenta a produção de NO em membros ascendentes de ratos saudáveis.

Em contrapartida, Kimbrough *et al.* (2015) comprovaram que o RSV diminui a produção de NO, os níveis de RNAm e a expressão protéica da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em hepatócitos de ratos induzidos por citocinas. Hoshino *et al.* (2010) demonstraram que sulfatos de RSV podem inibir a produção de NO em células RAW 264.7.

Já Takahashi, Uchiyama e Toda (2009) observaram que a produção de NO não mudou (em relação ao grupo controle) em células endoteliais F-2 incubadas com RSV em concentrações até 20 mM. Porém, em concentrações de 50 e 100 mM, a produção de NO foi aumentada.

Os resultados apresentados na **Figura 23** revelam que no grupo de Meia idade não houve um aumento da quantidade de NO nas PBMC estimuladas com RSV, se comparadas às mesmas sem nenhum estímulo ou expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esse resultado está de acordo com o resultado apresentado por Takahashi, Uchiyama e Toda (2009) que mostraram que a produção de NO não mudou (em relação ao grupo controle) em células endoteliais F-2 incubadas com RSV em concentrações até 20 mM. O mesmo perfil é observado quando avaliamos as PBMC expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em relação as células sem estímulo. Perfil semelhante ao proposto por Soyding *et al.* (2007) que observaram que em pacientes com doença arterial coronária, há um maior EO em relação ao grupo controle, porém os níveis de NO permaneceram similares; e Maziak *et al.* (1998) que também observaram que os níveis de NO não eram diferentes entre pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica e controles saudáveis. Já no grupo dos Idosos, percebe-se que não houve um aumento da quantidade de NO nas PBMC estimuladas com RSV, se comparadas às mesmas sem nenhum estímulo (perfil semelhante ao observado por Takahashi, Uchiyama e Toda (2009)), porém houve um aumento (não significativo) em relação as células expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O mesmo perfil é observado quando avaliamos as PBMC sem estímulo em relação as expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Portanto, o RSV conseguiu restaurar a quantidade de NO das células expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (que estava reduzida) a níveis basais. Esses resultados estão de acordo com os relatados por Lara (2018) e

---

Gonzalez-Vicente, Cabral e Garvin (2014) em relação a atividade do RSV e também estão de acordo com os apresentados por Gruber *et al.* (2008) e Ben Anes *et al.* (2014) em relação a interação entre níveis reduzidos de NO e EO.

Portanto, infere-se que nos Idosos que já apresentam um nível basal de EO maior que o apresentado pelo grupo de Meia idade; ao expor as PBMC ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cria-se um ambiente de EO elevado que interfere nos níveis de NO (reduzidos) e que o RSV consegue atuar, restaurando-os aos níveis basais. Essa atuação do RSV em relação aos níveis de NO provavelmente ocorre devido a sua ação antioxidante (**Figura 20** e tabela 10) nas PBMC de Idosos.

A mudança no balanço entre oxidantes/antioxidantes em favor dos oxidantes é nomeada EO. Antioxidantes podem ser definidos como uma substância que quando presente em baixas concentrações inibem ou retardam a oxidação de uma molécula principalmente devido a sua capacidade em sequestrar ERO. Organismos aeróbicos tem sistemas antioxidantes integrados, que incluem antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que geralmente são efetivos em bloquear os efeitos deletérios das ERO (BIRBEN *et al.*, 2012; LOBO *et al.*, 2010; JEEVA *et al.*, 2015).

SOD, GPX e CAT são as enzimas antioxidantes chaves desse sistema de defesa pelo qual as ERO produzidas durante as reações metabólicas são removidas (JEEVA *et al.*, 2015).

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

Além de analisarmos a atuação do RSV no EO (através da produção de ERO), analisamos também a atuação desse composto na atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT nas PBMC de indivíduos de Meia idade e de Idosos.

CAT de mamíferos é uma homotetrâmero que é conhecida por sua habilidade em converter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub> (atividade catalítica) e por sua atividade em oxidar álcoois de baixo peso molecular na presença de baixas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

---

(atividade peroxidática). Essa enzima é uma das enzimas antioxidantes mais bem caracterizadas (JEEVA *et al.*, 2015).

SOD é a primeira enzima detoxificante e o antioxidante mais poderoso na célula. Cataliza a dismutação de duas moléculas do  $O_2^-$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$ . SOD é uma metaloenzima e portanto, requer um cofator metálico para sua atividade. Os íons metálicos que normalmente se ligam a SOD são ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu) e manganês (Mn) (IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

Emamgholipour, Hossein-Nezhad e Ansari (2016) demonstraram que a expressão do RNAm e a atividade da CAT aumentaram em PBMC expostas ao EO induzido por  $H_2O_2$  em comparação com células não tratadas. Já em relação a MnSOD a expressão do seu RNAm foi reduzida (redução não significativa) e sua atividade foi reduzida em 25% em PBMC expostas ao EO induzido por  $H_2O_2$  em relação a células não tratadas.

Concomitante com os resultados presentes na literatura relacionando a atividade da CAT e da SOD com o EO, há também estudos relacionando a atividade dessas enzimas com o envelhecimento (caracterizado por um aumento do EO). Como por exemplo, estudos de Giergiel *et al.* (2015) evidenciaram um aumento da atividade da CAT durante o envelhecimento no coração e diafragma bovinos, porém no músculo esquelético não foi observada uma mudança na atividade dessa enzima. Por outro lado, Vasilaki *et al.* (2006) observaram um aumento da atividade da CAT e SOD em músculos esqueléticos de camundongos idosos em comparação com camundongos adultos. Em contraste, Fujimoto, Kobayashi e Ohno (2010) explicitaram uma redução da atividade da MnSOD mitocondrial em leucócitos humanos com a idade.

Truong, Jun e Jeong (2018) demonstraram que 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. Kavas, Ayrar e Elhan (2013) também observaram um aumento da atividade da CAT e SOD em eritrócitos do grupo de ratos winstar que foi administrado RSV.

---

Já Lara (2018) comprovou que o RSV não foi capaz de exercer efeitos sobre a atividade da CAT em células da linhagem neural N2-A na forma de Pré-estímulo e diminui a atividade dela, quando usado sob a perspectiva de Pós-estímulo junto com o  $H_2O_2$ . Por outro lado, observou que o RSV é mais eficiente em ativar a SOD no formato de Pré-estímulo do que na condição de Pós-estímulo. Kim *et al.* (2015) também observou que o tratamento com o RSV em fibroblastos orbitais de indivíduos com orbitopatia de Graves reduziu os níveis de Cu/Zn SOD, CAT e Trx, enquanto aumentou os níveis de Mn-SOD.

Os resultados apresentados na **Figura 24** revelam que nas duas faixas etárias estudadas, não houve aumento da atividade da CAT nas PBMC expostas ao  $H_2O_2$  (ambiente de EO que é exacerbado no envelhecimento) em relação as células sem estímulo. Esses resultados estão de acordo com os resultados apresentados por Giergiel *et al.* (2015) em músculo esquelético bovino. Também não houve um aumento da atividade da CAT nas PBMC estimuladas com RSV, se comparadas às mesmas sem nenhum estímulo ou expostas ao  $H_2O_2$ . Esses resultados estão de acordo com os resultados apresentados por Lara (2018) no efeito do RSV na forma de Pré-estímulo em células N2-A. Comparando as duas faixas etárias, observa-se que não houve diferença da atividade da CAT no envelhecimento em PBMC, o que contradiz estudos presentes na literatura que relacionam o envelhecimento com uma mudança na atividade dessa enzima em outros modelos estudados.

Os resultados apresentados na **Figura 25** revelam que nas duas faixas etárias estudadas, não houve aumento da atividade da SOD nas PBMC expostas ao  $H_2O_2$  (ambiente de EO) em relação as células sem estímulo. No grupo de Meia idade não houve um aumento da atividade da SOD nas PBMC estimuladas com RSV, se comparadas às mesmas sem nenhum estímulo ou expostas ao  $H_2O_2$ . Esses resultados estão de acordo com os resultados apresentados por Truong, Jun e Jeong (2018) no efeito do RSV em segmentos aórticos de ratos. Já no grupo dos Idosos percebe-se que houve uma tendência de aumento na atividade da SOD nas PBMC estimuladas com RSV, se comparadas às mesmas sem nenhum estímulo ou expostas ao  $H_2O_2$ . Esses resultados estão de acordo com muitos resultados presentes na literatura, como os apresentados por Kavas, Ayril e Elhan (2013), Lara (2018) e Kim *et al.* (2015) em relação ao aumento da atividade de SOD por células

---

estimuladas pelo RSV. Ao comparar as duas faixas etárias (tabela 13), percebe-se que as PBMC sem estímulo e expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provenientes de indivíduos Idosos tem uma menor atividade de SOD em relação as células provenientes de indivíduos de Meia idade que é restaurada quando estimuladas com o RSV. Esse resultado está de acordo com os resultados apresentados por Fujimoto, Kobayashi e Ohno (2009) em relação a redução da atividade da SOD no envelhecimento.

O compilado de resultados apresentados na **Figura 24** e na **Figura 25** se assemelham a alguns resultados presentes na literatura, mas contradizem outros. De acordo com Emamgholipour, Hossein-Nezhad e Ansari (2016) as células respondem ao desafio oxidativo com indução seletiva de enzimas antioxidantes. E também afirmam que não há um consenso dentre a literatura sobre o padrão de enzimas antioxidantes em resposta ao EO. Provavelmente está relacionado com o tipo do modelo celular utilizado, o tipo e a concentração do agente oxidante utilizado e o tempo de incubação.

Portanto, o caráter antioxidante do RSV nas PBMC confirmado pelos resultados apresentados na **Figura 20** e tabela 10 não estão relacionados com a indução da CAT(nas duas faixas etárias) e SOD (na faixa etária de Meia idade). Já nos Idosos, possivelmente podemos inferir que a atividade antioxidante do RSV pode ser atribuída ao aumento da atividade da SOD.

Além de verificarmos a atuação do RSV no EO e no envelhecimento, verificamos também por quais mecanismos, mais especificamente por quais vias de sinalização o RSV age em PBMC no envelhecimento no estresse basal e no estresse elevado. As vias de sinalização escolhidas para o estudo foram as vias de AMPK e da SIRT1 por ser relatado na literatura o envolvimento da atuação do RSV por estas duas vias.

O RSV é um ativador da via de sinalização da SIRT1, uma das formas nos mamíferos da família de proteínas sirtuínas. SIRT1 deacetila proteínas histonas e não histonas, incluindo fatores de transcrição. As vias reguladas por SIRT1 afetam o metabolismo, resistência ao EO, sobrevivência celular, senescência celular, funções imuno-inflamatórias, ritmos circadianos, biogênese mitocondrial e estabilidade genômica (STANEVIČIENĖ *et al.*, 2016; YE *et al.*, 2017).



---

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

Os resultados apresentados na **Figura 26** em relação as PBMC, demonstram que a via da SIRT 1 tem o mesmo caráter antioxidante nas duas faixas etárias (Meia idade e Idosos), porém o RSV tem uma modificação na sua atuação em relação a essa via de acordo com o envelhecimento (RSV atua nessa via na faixa etária de Meia idade e na faixa etária dos Idosos o RSV não atua pela via da SIRT1).

Pelos resultados apresentados na **Figura 27** em relação as PBMC, infere-se que o RSV tem uma modificação na sua atuação em relação a via de AMPK de acordo com o envelhecimento (infere-se que o RSV atua nessa via na faixa etária de Meia idade e na faixa etária dos Idosos infere-se que o RSV não atua pela via de AMPK) e que o caráter antioxidante dessa via é alterado com o envelhecimento, mais especificamente é silenciado.

Esses dois resultados direcionam a hipótese que as vias de SIRT1 e AMPK conversam entre si em PBMC de indivíduos de Meia idade. Assim, corroborando o modelo criado por Canto *et al.* (2010) que demonstraram que AMPK ativa SIRT 1 por um aumento indireto nos níveis de NAD<sup>+</sup> celulares; e corroborando o modelo criado por Ivanov *et al.* (2008) e Lan *et al.* (2008) que demonstraram que SIRT 1 deacetila a quinase LKB1, levando a um aumento da fosforilação e ativação de AMPK. Além disso, hipotetiza-se que essas vias também conversam entre si sob a atuação do RSV, o que corrobora os resultados apresentados por Price *et al.* (2012) que demonstraram que a habilidade do tratamento com o RSV em aumentar a fosforilação de AMPK tanto *in vitro* quanto *in vivo* é dependente de SIRT1, mas

---

somente em doses moderadas de RSV (menores que 50 Mm); e corrobora também o modelo criado por Tennen; Michishita-Kioi; Chua (2012) que demonstraram que o RSV além de ativar a via cAMP/Epac 1/CamKKb/AMPK, ativa uma via paralela relacionada ao aumento dos níveis de cAMP pela inibição direta dos PDE pelo RSV, ativa a proteína cinase A (PKA) que diretamente fosforila e ativa SIRT1. Já em PBMC de indivíduos Idosos, o cenário é alterado. Infere-se que as vias de SIRT1 e AMPK deixam de conversar entre si o que corrobora os resultados apresentados por Gerhart-Hines *et al.* (2012) que descobriram que a ativação adrenérgica da cascata cAMP/PKA por estresse agudo resulta na rápida fosforilação e ativação de SIRT1 independentemente da mudança de concentração de AMPK e NAD<sup>+</sup>. Além disso, os resultados apresentados na **Figura 26** e na **Figura 27** complementam com uma visão de sinalização celular a atuação do RSV mais de prevenção do que de tratamento do EO e portanto do envelhecimento (elevado EO). Já que em indivíduos Idosos a atuação do RSV é cessada (em relação a indivíduos de Meia idade) em relação a via da SIRT1 e hipotetiza-se também em relação a via de AMPK, cujos papéis na resistência ao EO são relevantes. Por último, os resultados citados anteriormente fornecem uma explicação de um fragmento do processo complexo do envelhecimento: o silenciamento de uma via de caráter antioxidante provavelmente é uma das contribuintes para um maior EO descrito no envelhecimento.

Assim, os resultados do presente estudo nos fornecem fortes evidências que nas diferentes faixas etárias avaliadas há mudanças na sinalização celular e da atuação do RSV. Na faixa etária de Meia idade, as duas vias com caráter antioxidante SIRT 1 e AMPK estão ativas. O RSV exerce sua atividade antioxidante pela via da SIRT 1 e possivelmente pela via da AMPK. Estas tem como alvos as enzimas CAT e SOD que na faixa etária estudada não estão atuando. Portanto, hipotetiza-se que como possíveis alvos da SIRT 1 e da AMPK estão as sestrinas e tioredoxinas. Porém, mais estudos são necessários para a confirmação dessa hipótese.

As sestrinas constituem uma família de proteínas responsivas ao estresse. São alvos dos fatores de transcrição p53 e FOXO que por sua vez são alvos da SIRT1 e da AMPK. As sestrinas são capazes de prevenir a acumulação de ERO pela inibição de mTORC1 (complexo que tem como função aumentar o metabolismo

---

anabólico e suprimir a autofagia, apresentando função oxidante), pela estimulação da via Nrf2 e pela regeneração de peroxirredoxinas (enzimas envolvidas na decomposição de  $H_2O_2$ ) (RHEE; BAE, 2015; SABLINA *et al.*, 2005). As tiorredoxinas também são alvos dos fatores de transcrição FOXO. Atuam protegendo as células da toxicidade induzida pelas ERO ao reduzir proteínas pela troca cisteína-tiol-dissulfeto (LI *et al.*, 2009).

Já nas Idosos, o contexto de sinalização é alterado. O caráter antioxidante da via AMPK é silenciado, o que possivelmente contribui para o maior EO presente no envelhecimento. Esse maior EO característico do grupo dos Idosos é amplificado pela adição de  $H_2O_2$  as PBMC. Com isso, provavelmente há maior produção de  $O_2^{\cdot-}$  que ao reagir com NO produz  $ONOO^-$ , reduzindo a disponibilidade de NO nesse contexto que é restaurado devido a atividade antioxidante do RSV. O RSV também tem sua atuação alterada. Seu caráter antioxidante deixa de ser através da SIRT1 e possivelmente da AMPK (RSV reduz as ERO quando esta via está inibida) o que contribui para o entendimento do RSV atuar de forma mais efetiva na prevenção do que no tratamento (já que reduz as ERO a níveis basais que já são bem elevados nos Idosos). Porém, mesmo não sendo tão efetivo, o RSV tem caráter antioxidante nessa faixa etária que pelo presente estudo, infere-se ser através da enzima SOD. Hipotetiza-se que a possível via ativada pelo RSV e cujo alvo é a SOD, é a via Nrf2. Porém, mais estudos são necessários para a confirmação dessa hipótese.

Tamaki *et al.* (2014) comprovaram que a ativação de genes da defesa antioxidante é através da ativação da via Nrf2 pelo RSV em ratos com periodontite induzida. A família de fatores de transcrição Nfe2 (fator nuclear eritróide 2) é composta pelas proteínas Nrf1, Nrf2 e Nrf3. A proteína Nrf2 é o membro mais estudado dessa família. As proteínas Nrf se ligam a uma sequência de DNA específica chamada de elemento de resposta antioxidante (ARE), encontrada na região promotora de vários genes quimioprotetores e de enzimas detoxificadoras que estão envolvidos na resposta ao EO. As enzimas incluem a SOD, GST, tiorredoxina redutase, GSR, NAD(P)H quinona oxidoreduases, entre outras (SANT *et al.*, 2017; VENUGOPAL; JAISWAL, 1998; MA, 2013).

---

Portanto, sintetizando as observações do presente estudo, há fortes evidências provenientes dos resultados que nas diferentes faixas etárias avaliadas em PBMC há mudanças na sinalização celular e da atuação do RSV. Na faixa etária de Meia idade, as duas vias com caráter antioxidante SIRT 1 e AMPK estão ativas. O RSV exerce sua atividade antioxidante pela via da SIRT 1. Como alvos dessas vias, as enzimas CAT e SOD não estão atuando na faixa etária estudada. Nos Idosos, o caráter antioxidante da via AMPK é silenciado, o que possivelmente contribui para o maior EO presente no envelhecimento. O RSV também tem sua atuação alterada. Seu caráter antioxidante deixa de ser através da SIRT1 o que contribui para o entendimento do RSV atuar de forma mais efetiva na prevenção do que no tratamento (já que reduz as ERO a níveis basais que já são bem elevados nos idosos). Porém, mesmo não sendo tão efetivo, o RSV tem caráter antioxidante nessa faixa etária. Infere-se que na faixa etária de Meia idade, as duas vias conversam entre si e também interagem sob ação do RSV (RSV possivelmente atua na via AMPK). Hipotetiza-se que a ação antioxidante deste composto é através das sestrinas e tioredoxinas. Infere-se que nos Idosos, as duas vias são independentes e que a atuação antioxidante do RSV (RSV possivelmente não atua na via AMPK) é através da enzima SOD. Hipotetiza-se que a via em que o RSV atua e que tem como alvo a SOD é a Nrf2.

O sumário dos efeitos do RSV nas duas faixas etárias está apresentado na tabela 16 e o esquema da nossa hipótese das interações entre as vias e o RSV está na **Figura 28**.

**Tabela 16: Avaliação comparativa do efeito do RSV nas duas faixas etárias em PBMC**

	Meia idade	Idosos
Produção de ERO	↓↓	↓
Geração de NO	---	↑
Atividade da CAT	---	---
Atividade da SOD	---	↑
Atuação sob a via de AMPk	+	-
Atuação sob a via de SIRT1	+	-

↑ : aumento; ↓ : diminuição; ↑̇ : aumento não significativo; ↓̇ : diminuição não significativa; --- : ausência de efeito; + : atuação; - : não-atuação. n (Meia idade) = 118; n (Idosos) = 86. O RSV gerou uma tendência de aumento de SOD nos idosos porque o valor de p na comparação dos grupos de células estimuladas com o RSV em relação aos demais grupos (sem estímulo e células somente expostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi de p < 0,07 que está na faixa entre 0,06 e 0,09, portanto sendo uma tendência estatística de significância.



---

## 6 CONCLUSÃO

Observamos nesse estudo que o RSV tem uma função antioxidante nas PMBC das duas faixas etárias, também observamos que no envelhecimento há uma mudança no contexto celular caracterizada pelo silenciamento do caráter antioxidante da via AMPK e há alteração da atuação do RSV, já que sua influência na via da SIRT1 é cessada.

---

## REFERÊNCIAS

- AHMED, T. *et al.* Resveratrol and Alzheimer's disease: mechanistic insights. **Molecular neurobiology**, v. 54, p. 2622-2635, 2016.
- ALMEIDA, L. *et al.* Pharmacokinetic and safety profile of trans-resveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers. **Molecular nutrition & food research**, v. 53, p. S7-S15, 2009.
- ANDO, T. *et al.* Transduction with the antioxidant enzyme catalase protects human T cells against oxidative stress. **The Journal of Immunology**, v. 181, p. 8382-8390, 2008.
- ASSMANN, T. S. *et al.* Nitric oxide levels in patients with diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. **Nitric Oxide**, v. 61, p. 1-9, 2016.
- BAE, Y. S. *et al.* Regulation of Reactive Oxygen Species Generation in Cell Signaling. **Molecules and Cells**, v. 32, p. 491-509, 2011.
- BANSAL, A. K. Antioxidants and Other Potent Strategies to Reduce Oxidative Stress in Semen. In: **Free Radicals in Human Health and Disease**. Springer, New Delhi, 2015. p. 381-395.
- BARRETO, R. L.; CORREIA, C. R. D. Óxido Nítrico: Propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química Nova**, v. 28, p. 1046-1054, 2005.
- BEN ANES, A. *et al.* Increased oxidative stress and altered levels of nitric oxide and peroxynitrite in Tunisian patients with chronic obstructive pulmonary disease: correlation with disease severity and airflow obstruction. **Biological trace element research**, v. 161, p. 20-31, 2014.
- BERMAN, A. Y. *et al.* The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. **NPJ precision oncology**, v. 1, p. 35-43, 2017.
- BHATTACHARYA, S. Reactive oxygen species and cellular defense system. In: **Free radicals in human health and disease**. Springer, New Delhi, 2015. p. 17-29.
- BIRBEN, E. *et al.* Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, p. 9-19, 2012.
- BOBERMIN, L. D. *et al.* Resveratrol prevents ammonia toxicity in astroglial cells. **PLoS One**, v. 7, p. e52164- e52176, 2012.
- BUDANOV, A. V. Stress-responsive sestrins link p53 with redox regulation and mammalian target of rapamycin signaling. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, p. 1679-1690, 2011.
- BUŁDAK, Ł. *et al.* Metformin affects macrophages' phenotype and improves the



---

activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase and decreases malondialdehyde concentration in a partially AMPK-independent manner in LPS-stimulated human monocytes/macrophages. **Pharmacological Reports**, v. 66, p. 418-429, 2014.

BULLONE, M.; LAVOIE, J. P. The Contribution of Oxidative Stress and Inflamm-Aging in Human and Equine Asthma. **International journal of molecular sciences**, v. 18, p. 2612-2635, 2017.

CABELLO-VERRUGIO, C. *et al.* Oxidative stress in disease and aging: mechanisms and therapies 2016. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, p. 4310469, 2016.

CANTÓ, C. *et al.* Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. **Cell metabolism**, v. 11, p. 213-219, 2010.

CHACHAY, V. S. *et al.* Resveratrol—pills to replace a healthy diet?. **British journal of clinical pharmacology**, v. 72, p. 27-38, 2011.

CHANDRASEKARAN, A.; SOSA, P.; MELENDEZ, J. A. Redox Biology Redox control of senescence and age-related disease. **Redox Biology**, v. 11, p. 91–102, 2017.

CHANG, C. *et al.* Resveratrol exerts anti-obesity effects in high-fat diet obese mice and displays differential dosage effects on cytotoxicity , differentiation , and lipolysis in 3T3-L1 cells. **Endocrine journal**, v. 63, p. 169–178, 2016.

CHAVES, M. M. *et al.* Host defenses in the aged: evaluation of the balance between oxidizing species generation and reducing power in phagocytosing human granulocytes. **Mechanisms of ageing and development**, v. 104, p. 103-109, 1998.

CHAVES, M. M. *et al.* Increase of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species generated by phagocytosing granulocytes related to age. **Mech Ageing Dev**, v. 119, p. 1-8, 2000.

CHONG, Z. Z. *et al.* SIRT1: new avenues of discovery for disorders of oxidative stress. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 16, p. 167-178, 2012.

CORRADI, M. *et al.* Increased exhaled nitric oxide in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. **Thorax**, v. 54, p. 572-575, 1999.

CORREIA-COSTA, L. *et al.* Oxidative stress and nitric oxide are increased in obese children and correlate with cardiometabolic risk and renal function. **British Journal of Nutrition**, v. 116, p. 805-815, 2016.

COVARRUBIAS, L. *et al.* Function of reactive oxygen species during animal development : Passive or active ?. **Developmental biology**, v. 320, p. 1–11, 2008.

DAITOKU, H.; SAKAMAKI, J.; FUKAMIZU, A. Regulation of FoxO transcription factors by acetylation and protein-protein interactions. **Biochimica et Biophysica**

---

**Acta - Molecular Cell Research**, v. 1813, p. 1954–1960, 2011.

DANYLOVYCH, G. V.; BOHACH, T. V.; DANYLOVYCH, Y. V. The biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. Nitric oxide formation features and its functional role in mitochondria. **Ukrainian Biochemical Journal**, v. 90, p. 3–24, 2018.

DASGUPTA, B.; MILBRANDT, J. Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 7217-7222, 2007.

DE LA LASTRA, C. A.; VILLEGAS, I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. **Biochemical Society Transactions** v. 35, p. 1156–1160, 2007.

DIAZ-GEREVINI, G. T. *et al.* Beneficial action of resveratrol: how and why?. **Nutrition**, v. 32, p. 174-178, 2016.

DICKINSON, B. C.; CHANG, C. J. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. **Nature Chemical Biology**, v. 7, p. 504–511, 2011.

DUMONT, M. *et al.* Reduction of oxidative stress, amyloid deposition, and memory deficit by manganese superoxide dismutase overexpression in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **The FASEB Journal**, v. 23, p. 2459-2466, 2009.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, p. 343-350, 2003.

ELEUTHERIO, E. **Estresse Oxidativo e Atividade Física**. 2012. 22 slides. Disponível em: <<https://www.slideserve.com/timothy/estresse-oxidativo-e-atividade-fisica>>. Acesso em: 18 dez. 2018.

EMAMGHOLIPOUR, S.; HOSSEIN-NEZHAD, A.; ANSARI, M. Can melatonin act as an antioxidant in hydrogen peroxide-induced oxidative stress model in human peripheral blood mononuclear cells?. **Biochemistry research international**, v. 2016, p. 1-8, 2016.

FORMAN, H. J.; TORRES, M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 166, p. S4-S8, 2002.

FUJIMOTO, H.; KOBAYASHI, H.; OHNO, M. Age-Induced Reduction in Mitochondrial Manganese Superoxide Dismutase Activity and Tolerance of Macrophages Against Apoptosis Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein. **Circulation Journal**, v. 74, p. 353-360, 2010.

GARCIA, D.; SHAW, R. J. AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. **Molecular Cell**, v. 66, p. 789–800, 2017.

GERHART-HINES, Z. *et al.* The cAMP/PKA pathway rapidly activates SIRT1 to

---

promote fatty acid oxidation independently of changes in NAD<sup>+</sup>. **Molecular cell**, v. 44, p. 851-863, 2011.

GERSZON, J.; RODACKA, A.; PUCHAŁA, M. Antioxidant properties of resveratrol and its protective effects in neurodegenerative diseases. **Advances in Cell Biology**, v. 4, n. 2, p. 97-117, 2014.

GIERGIEL, M. *et al.* Age-related Changes in Activity of Catalase in Selected Bovine Muscles. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 43, p. 1-7, 2015.

GIORDANO, C. R. *et al.* Catalase therapy corrects oxidative stress-induced pathophysiology in incipient diabetic retinopathy. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 56, p. 3095-3102, 2015.

GLADYSHEV, V. N. The Free Radical Theory of Aging Is Dead . Long Live the Damage Theory!. **Antioxidants & redox signaling**, v. 20, p. 727-731, 2014.

GONZALEZ-VICENTE, A.; CABRAL, P. D.; GARVIN, J. L. Resveratrol increases nitric oxide production in the rat thick ascending limb via Ca<sup>2+</sup>/calmodulin. **PLoS one**, v. 9, p. e110487-e110495, 2014.

GÓTH, L.; RASS, P.; PÁY, A. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. **Molecular Diagnosis**, v. 8, p. 141-149, 2004.

GOTO, H. *et al.* Endothelial MnSOD overexpression prevents retinal VEGF expression in diabetic mice. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 366, p. 814-820, 2008.

GOWANS, G. J. *et al.* AMP Is a True Physiological Regulator of AMP-Activated Protein Kinase by Both Allosteric Activation and Enhancing Net Phosphorylation. **Cell Metabolism**, v. 18, p. 556–566, 2013.

GRIESS, J. P. On a new series of bodies in which nitrogen substituted for hydrogen. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 154, p. 667-731, 1864.

GRUBER, H. J. *et al.* Obesity reduces the bioavailability of nitric oxide in juveniles. **International Journal of Obesity**, v. 32, p. 826-831, 2008.

GWINN, D. M. *et al.* AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. **Molecular cell**, v. 30, p. 214-226, 2008.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – quo vadis? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, p. 125–130, 2011.

HARDIE, D. G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 8, p. 774-786, 2007.

HARDIE, D. G. AMP-activated protein kinase: maintaining energy homeostasis at the

---

cellular and whole-body levels. **Annual review of nutrition**, v. 34, p. 31-55, 2014a.

HARDIE, D. G. AMPK — Sensing Energy while Talking to Other Signaling Pathways. **Cell Metabolism**, v. 20, p. 939–952, 2014b.

HARDIE, D. G. Keeping the home fires burning: AMP-activated protein kinase. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 15, p. 1-23, 2018.

HARDIE, D. G.; LIN, S. C. AMP-activated protein kinase—not just an energy sensor. **F1000Research**, v. 6, p. 1-11, 2017.

HAUPTMANN, N. *et al.* The metabolism of tyramine by monoamine oxidase A/B causes oxidative damage to mitochondrial DNA. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 335, p. 295-304, 1996.

HELD, P. An introduction to reactive oxygen species measurement of ROS in cells. **BioTek Instruments Inc., Application Guide**, v. 802, p. 1-17, 2015.

HERZIG, S.; SHAW, R. J. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 19, p. 121-135, 2018.

HOSHINO, J. *et al.* Selective synthesis and biological evaluation of sulfate-conjugated resveratrol metabolites. **Journal of medicinal chemistry**, v. 53, p. 5033-5043, 2010.

HOU, X. *et al.* SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 20015-20026, 2008.

HOUTKOOPER, R. H.; PIRINEN, E.; AUWERX, J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 13, p. 225-238, 2016.

HOWITZ, K. T. *et al.* Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. **Nature**, v. 425, p. 191-196, 2003.

IGHODARO, O. M; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase ( SOD ), catalase ( CAT ) and glutathione peroxidase ( GPX ): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, p. 287–293, 2018.

INOKI, K.; ZHU, T.; GUAN, K. L. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. **Cell**, v. 115, p. 577-590, 2003.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-5: Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests For In Vitro Cytotoxicity. 2009.

IPEA – INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA. **Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios**: Primeiras análises Demografia Gênero. Brasília: Ipea,

---

2008.

IVANOV, V. N. *et al.* Resveratrol sensitizes melanomas to TRAIL through modulation of antiapoptotic gene expression. **Experimental cell research**, v. 314, p. 1163-1176, 2008.

JEEVA, J. S. *et al.* Enzymatic antioxidants and its role in oral diseases. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, v. 7, p. S331-S333, 2015.

JĘŚKO, H.; STROSZNAJDER, R. P. Sirtuins and their interactions with transcription factors and poly (ADP-ribose) polymerases. **Folia neuropathologica**, v. 54, p. 212-233, 2016.

KAVAS, G. O.; AYRAL, P. A.; ELHAN, A. H. The effects of resveratrol on oxidant/antioxidant systems and their cofactors in rats. **Adv Clin Exp Med**, v. 22, p. 151-155, 2013.

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

KHORRAMINEJAD-SHIRAZI, M. *et al.* Aging and stem cell therapy: AMPK as an applicable pharmacological target for rejuvenation of aged stem cells and achieving higher efficacy in stem cell therapy. **Hematology/oncology and stem cell therapy**, v. 11, p. 189-194, 2017.

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

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

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

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

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

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

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

---

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

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

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

LEE, J. H.; BUDANOV, A. V.; KARIN, M. Sestrins orchestrate cellular metabolism to attenuate aging. **Cell metabolism**, v. 18, p. 792-801, 2013.

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

LENAZ, G. The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. **IUBMB life**, v. 52, p. 159-164, 2001.

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

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

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

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

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

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

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

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

---

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

MALAGUTI, M.; ANGELONI, C.; HRELIA, S. Polyphenols in exercise performance and prevention of exercise-induced muscle damage. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

MARTIN, J. E.; SHEAFF, M. T. The pathology of ageing : concepts and mechanisms. **The Journal of Pathology**, v. 211, p. 111–113, 2007.

MAZIAK, W. *et al.* Exhaled nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 157, p. 998-1002, 1998.

MOHAR, D. S.; MALIK, S. The sirtuin system: the holy grail of resveratrol?. **Journal of clinical & experimental cardiology**, v. 3, p. 216-219, 2012.

MOKNI, M. *et al.* Effect of resveratrol on antioxidant enzyme activities in the brain of healthy rat. **Neurochemical research**, v. 32, p. 981-987, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NAKAGAWA, T.; GUARENTE, L. Sirtuins at a glance. **J Cell Sci**, v. 124, p. 833-838, 2011.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **Rsc Advances**, v. 5, p. 27986-28006, 2015.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological reviews**, v. 87, p. 315-424, 2007.

PARK, S. *et al.* Resveratrol Ameliorates Aging-Related Metabolic Phenotypes by Inhibiting cAMP Phosphodiesterases. **Cell**, v. 148, p. 421–433, 2012.

PASHA, M. *et al.* Sestrin2 as a Novel Biomarker and Therapeutic Target for Various Diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–10, 2017.

PATEL, K. R. *et al.* Clinical trials of resveratrol. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, p. 161-169, 2011.

PATEL, K. R. *et al.* Sulfate metabolites provide an intracellular pool for resveratrol generation and induce autophagy with senescence. **Science translational medicine**, v. 5, p. 205ra133-205ra133, 2013.

PENDYALA, G.; THOMAS, B.; KUMARI, S. The challenge of antioxidants to free radicals in periodontitis. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 12, p. 79-

---

83, 2008.

PFLUGER, P. T. *et al.* Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 105, p. 9793-9798, 2008.

POTENTE, M.; DIMMELER, S. NO Targets SIRT1 A Novel Signaling Network in Endothelial Senescence. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.28, p. 1577-1579, 2008.

PRICE, N. L. *et al.* Article SIRT1 Is Required for AMPK Activation and the Beneficial Effects of Resveratrol on Mitochondrial Function. **Cell Metabolism**, v. 15, p. 675–690, 2012.

QUIJANO, C. *et al.* Interplay between oxidant species and energy metabolism. **Redox biology**, v. 8, p. 28-42, 2016.

RAJ, P.; ZIEROTH, S.; NETTICADAN, T. An overview of the efficacy of resveratrol in the management of ischemic heart disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1348, p. 55-67, 2015.

REDZA-DUTORDOIR, M.; AVERILL-BATES, D. A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1863, p. 2977–2992, 2016.

RHEE, S. G.; BAE, S. H. The antioxidant function of sestrins is mediated by promotion of autophagic degradation of Keap1 and Nrf2 activation and by inhibition of mTORC1. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 88, p. 205-211, 2015.

RÓDENAS, J.; MITJAVILA, M. T.; CARBONELL, T. Nitric oxide inhibits superoxide production by inflammatory polymorphonuclear leukocytes. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 274, p. C827-C830, 1998.

SABLINA, A. A. *et al.* The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. **Nature medicine**, v. 11, p. 1306-1313, 2005.

SALMINEN, A.; HYTTINEN, J. M. T.; KAARNIRANTA, K. AMP-activated protein kinase inhibits NF- $\kappa$ B signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. **Journal of molecular medicine**, v. 89, p. 667-676, 2011.

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

SANCAK, Y. *et al.* The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. **Science**, v. 320, p. 1496-1501, 2008.

SANT, K. E. *et al.* The role of Nrf1 and Nrf2 in the regulation of glutathione and redox dynamics in the developing zebrafish embryo. **Redox biology**, v. 13, p. 207-218,



---

2017.

SANTOS, L.; ESCANDE, C.; DENICOLA, A. Potential modulation of sirtuins by oxidative stress. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, p. 1-13, 2016.

SGARBIERI, V. C.; PACHECO, M. T. B. Healthy human aging: intrinsic and environmental factors. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, p. 23-30, 2017.

SHETH, R. *et al.* Age and sex related serum changes in nitric oxide and its correlation with plasma lipid profile and lipid peroxidation in healthy ageing individuals. **International Journal of Advances in Medicine** v. 4, p. 1031–1035, 2017.

SHIN, S. M.; CHO, H. J.; KIM, S. G. Resveratrol protects mitochondria against oxidative stress through AMP-activated protein kinase-mediated glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibition downstream of poly (ADP-ribose) polymerase-LKB1 pathway. **Molecular pharmacology**, v. 76, p. 884-895, 2009.

SHIN, W.; BERKOWITZ, D. E.; RYOO, S. Increased arginase II activity contributes to endothelial dysfunction through endothelial nitric oxide synthase uncoupling in aged mice. **Experimental & molecular medicine**, v. 44, p. 594, 2012.

SILVA, F. B. **Estresse Oxidativo e Doenças Cardiovasculares**. 2012. 33 slides. Disponível em: <<https://www.slideshare.net/Fabricio76/estresse-oxidativo-e-doencas-cardiovasculares>>. Acesso em: 20 dez. 2018.

SIRIVARASAI, J. *et al.* Environmental lead exposure, catalase gene, and markers of antioxidant and oxidative stress relation to hypertension: an analysis based on the EGAT study. **BioMed research international**, v. 2015, p. 1-9, 2015.

SMOLIGA, J. M.; VANG, O.; BAUR, J. A. Challenges of translating basic research into therapeutics: resveratrol as an example. **Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences**, v. 67, p. 158-167, 2012.

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

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

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

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

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

---

60-68, 2016.

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

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

TAHARA, E. B. *et al.* Dihydrolipoyl dehydrogenase as a source of reactive oxygen species inhibited by caloric restriction and involved in *Saccharomyces cerevisiae* aging. **The FASEB Journal**, v. 21, p. 274-283, 2007.

TAHARA, E. B.; NAVARETE, F. D.T.; KOWALTOWSKI, A. J. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, p. 1283-1297, 2009.

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

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

TENNEN, R. I.; MICHISHITA-KIOI, E.; CHUA, K. F. Finding a Target for Resveratrol. **Cell**, v. 148, p. 387-389, 2012.

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

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

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

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

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

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

---

1998.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

---

ZAU, J. F. T. **Avaliação do estresse oxidativo em pacientes coronariopatas revascularizados submetidos à reabilitação cardíaca.** 2016. Dissertação (Mestrado em Medicina) - Programa de Pós Graduação em Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

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