

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**INFLUÊNCIA FARMACOGENÉTICA DA ENZIMA  
SOD2 NA RESPOSTA *IN VITRO* AO RESVERATROL  
DE CÉLULAS MONONUCLEARES**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Dianni de Menezes Capeleto**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2014**

**INFLUÊNCIA FARMACOGENÉTICA DA ENZIMA SOD2 NA  
RESPOSTA *IN VITRO* AO RESVERATROL DE CÉLULAS  
MONONUCLEARES**

**Dianni de Menezes Capeleto**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia dos Processos Oxidativos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Farmacologia**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ivana Beatrice Mânica da Cruz**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2014**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Caapeleto, Dianni de Menezes  
Influência farmacogenética da enzima SOD2 na resposta  
in vitro ao resveratrol de células mononucleares /  
Dianni de Menezes Caapeleto.-2014.  
73 p.; 30cm

Orientador: Ivana Beatrice Mânica da Cruz  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia, RS, 2014

1. Polimorfismo Ala16Val-SOD2 2. Resveratrol 3.  
Sirtuína 1 4. Estresse oxidativo I. Cruz, Ivana Beatrice  
Mânica da II. Título.

---

© 2014

Todos os direitos autorais reservados a Dianni de Menezes Caapeleto. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: dicapeleto@gmail.com

---

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**INFLUÊNCIA FARMACOGENÉTICA DA ENZIMA SOD2 NA  
RESPOSTA *IN VITRO* AO RESVERATROL DE CÉLULAS  
MONONUCLEARES**

elaborada por  
**Dianni de Menezes Capeleto**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Farmacologia**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**  
**(Presidente/Orientadora)**

---

**Liliane de Freitas Bauermann, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

---

**Marta Maria Medeiros Frescura Duarte, Dr<sup>a</sup>. (ULBRA)**

Santa Maria, 3 de outubro de 2014.

Dedico esta dissertação à minha querida família, pelo apoio e incentivo em todas as minhas escolhas e decisões.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus e a Nossa Senhora da Conceição, por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos e proteção para me amparar.

Aos meus pais, Tania e Lori, agradeço do fundo do coração, por me fazerem ter coragem para acreditar e força para nunca desistir dos meus sonhos e chegar até aqui. Obrigada pelo amor incondicional, pela confiança, apoio e motivação de sempre. Obrigada por serem pais tão presentes nos momentos em que eu mais preciso. Vocês são o meu orgulho. Esta conquista é nossa. Amo vocês!

A minha irmã, Duanne, pelo carinho e amor de irmã. Obrigada pela amizade, pelos conselhos e incentivo. E por ter nos dado o nosso maior presente, a nossa pequena Valentina, que mesmo sendo ainda tão pequena, em dias difíceis me arrancou os melhores sorrisos. Te amo!

Ao meu grande amor, Diego, meu amigo e companheiro de todas as horas. Obrigada por todo amor, carinho, compreensão, motivação, pelo amparo nas horas difíceis e pela paciência. Te amo!

A minha sogra, Carmen, e sobrinhas, Bruna e Júlia, por me acolherem tão bem, pelo carinho de sempre e por todo apoio durante esta trajetória. Muito obrigada. Amo vocês!

A minha querida orientadora, Profa. Ivana Beatrice Mânica da Cruz, pela confiança e por tudo o que fizeste por mim. É difícil transformar sentimentos em palavras que expressem tamanha gratidão, admiração e carinho por alguém que me recebeu de braços abertos e que me permitiu a realização deste sonho. És um verdadeiro exemplo de profissional, dona de uma sabedoria enorme que inspira a todos. Agradeço pelo universo ter conspirado a meu favor, arquitetando o nosso encontro no momento em que mais precisei. Serei eternamente grata à ti!

Ao amigo, Alencar, que foi imprescindível nesta caminhada. Sem a tua ajuda não estaria fazendo parte da equipe Biogenômica. Obrigada pela dedicação, incentivo e, principalmente, pela amizade. Sempre terá a minha admiração. Muito obrigada de coração!

A amiga, Fernanda Barbisan, que me pegou pela mão e assumiu junto comigo a missão de realizar uma dissertação. Admiro a tua garra e força de vontade. Obrigada por todos ensinamentos, dedicação, paciência e pela amizade que consolidamos. Nossa missão foi cumprida!

Aos amigos, Verônica, Francine e Eduardo, por terem colocado a mão na massa comigo. Obrigada pela ajuda, pelos ensinamentos e por tornarem os meus dias mais leves, alegres e “calmos”. Vocês me fizeram acreditar que tudo daria certo e, realmente, deu certo.

Aos amigos Felipe e Cibele, que foram fundamentais na realização deste trabalho. Mostraram o quanto são esforçados e responsáveis. Muito obrigada, mesmo!

A amiga, Taís Unfer, pela disposição em ajudar em todos os momentos dessa trajetória. Muito obrigada de coração!

A minha amiga, Luzia Cristina Sampaio, pela ajuda, motivação e carinho. De colegas nos tornamos grandes amigas. Não importa a distância, sempre te levarei do lado esquerdo do peito. Muito obrigada por tudo!

Aos demais colegas do Laboratório Biogenômica, que de forma direta ou indireta, contribuíram na minha jornada. Agradeço muito a vocês pelo carinho e afeto com que me receberam, pelos momentos partilhados juntos, pelo respeito e consideração. É o que faz a nossa equipe ser única. Muito obrigada!

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pela oportunidade.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo apoio financeiro concedido através da bolsa de estudos.

Ninguém vence sozinho...

Obrigada à todos!

*“Sempre que houver alternativas, tenha cuidado. Não opte pelo conveniente, pelo confortável, pelo respeitável, pelo socialmente aceitável, pelo honroso. Opte pelo que faz o seu coração vibrar. Opte pelo que gostaria de fazer, apesar de todas as consequências.”*

(Osho)

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria

### INFLUÊNCIA FARMACOGENÉTICA DA ENZIMA SOD2 NA RESPOSTA *IN VITRO* AO RESVERATROL DE CÉLULAS MONONUCLEARES

AUTORA: Dianni de Menezes Capeleto  
ORIENTADORA: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ivana Beatrice Mânica da Cruz  
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 3 de outubro de 2014.

O resveratrol (RES) é uma molécula com propriedades na saúde humana incluindo ações anti-inflamatórias e antioxidantes, e no retardo do envelhecimento celular. Entretanto, não está claro se o estado oxidativo basal da célula tem alguma influência sobre os efeitos desta molécula. Em seres humanos, um polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) está presente na enzima superóxido dismutase dependente de manganês (SOD2), localizada no códon 16 (rs4880), que pode ser tanto uma alanina (A) ou valina (V). Este SNP provoca um desequilíbrio nos níveis celulares de SOD2, onde os genótipos AA e VV resultam em maior ou menor atividade enzimática, respectivamente. Além disso, o genótipo VV tem sido associado com elevados níveis de citocinas inflamatórias. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar a influência do polimorfismo Ala16Val-SOD2 no efeito anti-inflamatório *in vitro* do RES em células mononucleares do sangue periférico (CMSPs), através da análise da viabilidade, proliferação celular, parâmetros oxidativos, inflamatórios e na modulação da expressão do mRNA e proteína da enzima Sirtuína 1 que está relacionado com o retardo da senescência celular. A proliferação celular (em 24 e 72 horas), foi analisada utilizando ensaio de MTT, e alguns biomarcadores oxidativos e citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IFT- $\gamma$  e IL-10) também foram quantificados. Além disso, os efeitos do RES sobre a expressão do gene da SIRT1 foram avaliados por qRT-PCR. Nós observamos que, após 24 horas de exposição ao RES, as CMSP-AA apresentaram uma redução na proliferação celular, enquanto as CMSP-VV apresentaram o contrário disto, embora, depois de 72 horas, a proliferação celular foi semelhante em células homocigóticas quando comparado ao grupo controle. Na concentração de 10  $\mu$ M de RES, houve uma diminuição significativa na produção de citocinas inflamatórias em CMSP-AA. No entanto, as CMSP-VV geralmente apresentam uma redução sutil destas citocinas, exceto para TNF- $\alpha$ , que não foi afetado. Em todos os genótipos SOD2, as células expostas ao RES resultaram em uma regulação positiva dos níveis de SIRT1. Em conjunto, estes resultados sugerem que o efeito do RES na ativação de CMSPs não é universal e é dependente do polimorfismo Ala16Val-SOD2.

**Palavras-chave:** Superóxido dismutase dependente de manganês. Sirtuína 1. Citocinas. Estresse oxidativo. Resveratrol. Inflamação.

## ABSTRACT

Master's Dissertation  
Post-Graduate Program in Pharmacology  
Federal University of Santa Maria

### PHARMACOGENETIC INFLUENCE OF THE SOD2 ENZYME IN THE *IN VITRO* RESPONSE TO RESVERATROL IN MONONUCLEAR CELLS

AUTHOR: Dianni de Menezes Capeleto

ADVISOR: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Date and place of the defense: Santa Maria, 3<sup>rd</sup> october, 2014.

Resveratrol (RES) is an anti-aging molecule that provides both anti-inflammatory and antioxidant properties. However, it is unclear whether the basal oxidative state of the cell has any influence on the effects of this compound. In humans, a single nucleotide polymorphism (SNP) is present in the enzyme manganese superoxide dismutase (SOD2), localized in codon 16 (rs4880), which can either be an alanine (A) or valine (V). This SNP causes an imbalance in the cellular levels of SOD2, where AA- and VV-genotypes result in higher or lower enzymatic activity, respectively. Furthermore, the VV-genotype has been associated with high levels of inflammatory cytokines. Here, we examined the effects of a range of RES concentrations on the *in vitro* activation of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) carrying different Ala16Val-SOD2 genotypes. Cell proliferation (at 24 and 72 h) was analyzed using an MTT assay and several oxidative biomarkers and cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IFT- $\gamma$  and IL-10) were also quantified. In addition, the effects of RES on the expression of the SIRT 1 gene were evaluated by qRT-PCR. We show that after 24 h exposure to RES, A-genotype PBMCs displayed a decrease in cell proliferation, whilst VV-cells contrasted this; although after 72 h, cell proliferation was similar in homozygous cells when compared to control groups. At 10  $\mu$ M RES, there was a significant decrease in the production of inflammatory cytokines in A-allele cells; however, VV-cells generally displayed a subtle decrease in these, except for TNF- $\alpha$ , which was not affected. In all SOD2 genotypes cells exposed to RES resulted in an upregulation of SIRT 1 levels. Together, these results suggest that the effect of RES on human PBMC activation is not universal and is dependent on the Ala16Val-SOD2 SNP.

**Keywords:** Superoxide dismutase manganese-dependent. Sirtuin 1. Cytokines. Oxidative stress. Resveratrol. Inflammation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Estrutura química da molécula do resveratrol.....	23
Figura 2 -	Potencial associação entre o genótipo AA do polimorfismo Ala16Val-SOD2 com a produção de níveis elevados de hidroxila.....	24
Figura 3 -	Potencial associação do genótipo VV com maiores níveis de lipoperoxidação que causam danos as membranas plasmáticas e a organelas .....	27

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	– Alanina alanina
Ala16Val	– Alanina dezesseis valina
A-SOD2	– Alanina - superóxido dismutase dois
AV	– Alanina valina
bp	– Par de base
CAT	– Catalase
cDNA	– DNA complementar
CMSPs	– Células mononucleares do sangue periférico humano
DCFH	– 2', 7' - Diclorofluoresceína diacetato
ERN	– Espécie reativa de nitrogênio
ERRO	– Espécie reativa de oxigênio
FOXO	– Forkhead box transcriptional factor class O: fator de sinalização
GCT	– Alanina
GPx	– Glutaciona peroxidase
GR	– Glutaciona redutase
GSH	– Glutaciona
GSSG	– Glutaciona oxidada
GST	– Glutaciona-S-transferase
GTT	– Valina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	– Peróxido de hidrogênio
HDACs	– Histonas desacetilases
IFT- $\gamma$	– Interferon gama
IL-10	– Interleucina dez
IL-1 $\beta$	– Interleucina um beta
IL-6	– Interleucina seis
MDA	– Malondialdeído
MnSOD	– Superóxido dismutase dependente de manganês
MTS	– Mitochondrial target sequence
MTT	– 3- [4,5dimetiltiazol 2-il]-2,5-brometo difeniltetrazólio
NAD <sub>+</sub>	– Dinucleotídeo nicotinamida
NF- $\kappa$ B	– Fator nuclear $\kappa$ B
O <sub>2</sub> $\cdot^-$	– Superóxido
OH $\cdot$	– Hidroxila
ON	– Óxido nítrico
ONOO-	– Peroxinitrito
PGC-1 $\alpha$	– Proliferador co-ativador de receptor gama
PPAR- $\gamma$	– Receptor proliferador ativador de peroxissomas gama
qRT-PCR	– Transcrição reversa quantitativa em tempo real da reação em cadeia da polimerase

RES	– Resveratrol
RL	– Radical livre
Sir2	– Silent information regulator
SIRT 1	– Sirtuína 1
SNP	– Single nucleotide polymorphism
SOD	– Superóxido dismutase
TBARS	– Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF- $\alpha$	– Fator de necrose tumoral alfa
UV	– Ultravioleta
V-SOD2	– Valina - superóxido dismutase dois
VV	– Valina valina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1 Metabolismo oxidativo</b> .....	<b>15</b>
1.1.1 Radicais livres e espécies reativas de oxigênio .....	15
1.1.2 Estresse oxidativo .....	16
1.1.3 Peroxidação lipídica .....	17
1.1.4 Carbonilação de proteínas .....	17
1.1.5 Genotoxicidade .....	18
<b>1.2 Antioxidantes</b> .....	<b>18</b>
1.2.1 Sistema de defesa exógeno ou não enzimático .....	19
1.2.2 Sistema de defesa endógeno ou enzimático .....	20
<b>1.3 Genética da superóxido dismutase dependente de manganês (SOD2)</b> .....	<b>21</b>
1.3.1 Polimorfismo do gene da superóxido dismutase dependente de manganês (Ala16Val-SOD2) .....	22
1.3.1.1 Associação com doenças .....	24
1.3.1.2 Associação com agentes estressores .....	25
1.3.1.3 Associação com agentes antioxidantes .....	26
<b>1.4 Resveratrol</b> .....	<b>26</b>
1.4.1 Conceito .....	26
1.4.2 Efeito do resveratrol na modulação do metabolismo oxidativo .....	28
1.4.3 Efeito do resveratrol na modulação da sirtuína 1 .....	30
1.4.4 Efeito do resveratrol na modulação da resposta imune .....	32
<b>1.5 Hipótese do estudo</b> .....	<b>33</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	<b>34</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>34</b>
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
<b>ARTIGO</b> .....	<b>36</b>
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	<b>58</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>63</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Metabolismo oxidativo

### 1.1.1 Radicais livres e espécies reativas de oxigênio

Organismos aeróbios produzem energia a partir da utilização do oxigênio. Entretanto, esta molécula facilmente se desestabiliza eletronicamente, produzindo moléculas denominadas radicais livres (RL) e espécies reativas de oxigênio não radicalares (EROs). Os RL possuem um ou mais elétrons desemparelhados em sua órbita externa (HALLIWELL, 2006), são altamente instáveis e de meia-vida curta, tentam parear-se, retirando elétrons de outras moléculas integrantes da estrutura celular e causam danos quando o sistema redox estiver desequilibrado (HALLIWELL, 1993). No entanto, existem nos compartimentos celulares e no interstício, moléculas altamente reativas e que não possuem elétron desemparelhado, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). As EROs podem ser produzidas em todos os organismos aeróbios, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas. (FINKEL; HOLBROOK, 2000; HALLIWELL, 2001).

As principais fontes de EROS são as organelas citoplasmáticas que metabolizam o oxigênio, o nitrogênio e o cloro, gerando grande quantidade de metabólitos. Estas moléculas são geradas no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana plasmática, e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação. As mitocôndrias são as principais organelas envolvidas, e nela o oxigênio molecular sofre redução tetravalente até a formação de água. Durante esse processo são formados intermediários reativos, tais como o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) (HALLIWELL, 2007). Além das mitocôndrias, as EROs e outros tipos de RL também são produzidos por diferentes sítios celulares e vias metabólicas, tais como os peroxissomos e os sistemas enzimáticos xantina oxidase (XO), nicotinamida dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH oxidase) e óxido nítrico sintetase (NOS).

Dentre as EROs, o radical  $O_2^{\cdot-}$  é o mais comum e abundante, e bastante difusível tanto no interior quanto entre as células *in vivo*, sendo o primeiro RL formado através da redução

do oxigênio por um único elétron durante a fosforilação oxidativa que ocorre na mitocôndria (HALLIWELL, 2007). Por ser uma molécula que potencialmente pode reagir com outras moléculas e causar danos celulares, existe um controle endógeno específico nos níveis do ânion  $O_2^{\bullet-}$ . Este é feito via a ação da enzima superóxido dismutase. A interação entre dois radicais superóxidos com dois prótons, na presença da enzima superóxido dismutase (SOD), origina  $H_2O_2$ . Pela reação com íons cobre ( $Cu^+$ ) ou ferro ( $Fe^{2+}$ ) que estão presentes no citoplasma o  $H_2O_2$  produz o radical  $OH^{\bullet}$ . Esta é denominada reação de Fenton (HALLIWELL, 2007). Além disso, a reação entre o  $H_2O_2$  e ânion  $O_2^{\bullet-}$  na presença de metais de transição como o Cobre II e Ferro III também leva a formação do radical  $OH^{\bullet}$ , através da reação de Haber-Weiss. Devido à alta afinidade do ânion  $O_2^{\bullet-}$  com o óxido nítrico (ON), ocorre a formação do peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) que é a espécie reativa de nitrogênio (ERN) também considerada como um potente agente oxidante, que pode causar extensa lipoperoxidação das membranas (HALLIWELL, 2007). Até o momento não se conhece nenhuma enzima ou substância capaz de remover estes radicais no organismo (MORRIS et al., 1995; VAJDOVICH, 2008).

Atualmente é sabido que, em baixos níveis, tanto as EROs quanto as ERN são fundamentais para a manutenção da vida por participarem de processos fisiológicos essenciais no organismo. Dröge (2002) refere-se à participação dos RL em diversas rotas metabólicas e fisiológicas, como na regulação do tônus vascular, controle da produção de eritropoietina e outras funções induzidas pela hipóxia. Estas moléculas também participam na transdução de sinais envolvidos com a função imune. No entanto, a produção exacerbada e descontrolada das EROs e ERNs leva a efeitos deletérios irreversíveis no metabolismo proteico, lipídico e no DNA, podendo causar danos celulares e o desenvolvimento de doenças não-transmissíveis (FOLKERTS et al., 2001).

Entretanto, é importante ressaltar que a produção de EROs nem sempre é consequência do metabolismo aeróbio, podendo ser gerada também pelas oxidases (enzimas da membrana plasmática) como resposta a fatores de crescimento e citocinas e, consequentemente, podem servir como segundo mensageiro em processos específicos de sinalização celular e regulação gênica (BARZILAI et al., 2004).

### 1.1.2 Estresse oxidativo

O desequilíbrio entre a produção de EROs e ERNs e moléculas antioxidantes, com

predomínio dos primeiros leva ao estresse oxidativo, desencadeando as mais diversas patologias orgânicas (SIES, 1993; BEST et al., 1999; BARBOSA et al., 2010). No entanto, o termo “desequilíbrio redox” tem sido utilizado desde a descoberta da participação das EROs nos processos de sinalização celular e não somente como moléculas causadoras de danos oxidativo. Fatores endógenos (genéticos) e exógenos (ambientais) também podem levar a um aumento na produção de EROs e, conseqüente, produção de um estado de estresse oxidativo. Entre as fontes exógenas de EROs incluem luz ultravioleta (UV), radiação ionizante e agentes químicos (BERRA, 2006).

### 1.1.3 Peroxidação lipídica

Denomina-se peroxidação lipídica a ação das EROs e ERNs sobre a estrutura e fisiologia das membranas celulares através da oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados presentes nos lipídios, assim como pela inibição da síntese dos lipídios, desnaturação de ácidos graxos ou ativação das lipases (GOETZ et al., 2008). Como conseqüência ao processo de oxidação, ocorre alterações nas propriedades físico-químicas das membranas, alterando sua fluidez e permeabilidade, com risco de ruptura da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo citoplasmático (VASCONCELOS et al., 2007).

Durante as reações que envolvem a oxidação dos lipídios vários produtos intermediários são produzidos como, por exemplo, o malondialdeído (MDA) que reage com o grupo amina de purinas. Este metabólito pode ser detectado através da técnica espectrofotométrica do ácido tiobarbitúrico (TBARS), sendo importante indicador de peroxidação lipídica (CATALGOL et al., 2007; JIA et al., 2007; LYKKESFELDT, 2007; MICALLEF et al., 2007).

### 1.1.4 Carbonilação de proteínas

A ação de espécies reativas sobre as proteínas envolve a formação de um radical centrado no carbono através da extração de  $H\cdot$  do carbono  $\alpha$  em uma ligação peptídica. A reação é seguida por um processo de fragmentação das cadeias e oxidação dos aminoácidos (principalmente os

aromáticos), com produção de carbonilação de compostos a partir de resíduos de prolina, arginina e lisina (DALLE-DONE et al., 2003; VASCONCELOS et al., 2007).

A carbonilação também pode ocorrer através da reação com aldeídos derivados da peroxidação lipídica (MDA) ou gerados a partir da reação de redução de açúcar (glicose) ou produtos de sua oxidação com resíduos de lisina (reações de glicação e de glicoxidação formando carboximetil-lisina) (ELLIS, 2007; VASCONCELOS et al., 2007). Segundo Ellis (2007), o dano causado por aldeídos leva à perda da função de proteínas e enzimas, danifica lipídios e ainda leva à formação de adutos no DNA. Estas perturbações moleculares podem culminar com a morte celular.

### 1.1.5 Genotoxicidade

O estresse oxidativo também pode causar extensos danos ao DNA (genotoxicidade) que pode, ou levar ao acúmulo de mutações que prejudicam a função destas células, ou induzir a apoptose das mesmas, ou mesmo criam instabilidade genômica que desencadeiam processos carcinogênicos. Por exemplo, o radical  $\text{OH}\cdot$  produzido por reações químicas, como a reação de Fenton, possui alta afinidade a molécula de DNA gerando quebras e outros danos genômicos (MURTAS et al., 2010).

Desse modo, é de extrema importância para as células a existência de um mecanismo de defesa e reparo, uma vez que lesões oxidativas, em certas biomoléculas, como no DNA e na membrana celular, podem se tornar letais para as células. A fim de combater a produção excessiva das EROs provenientes de diversas fontes, as células humanas elaboraram um mecanismo de defesa celular denominado sistema de defesa antioxidante (VALKO et al., 2007).

## 1.2 Antioxidantes

Para controlar os níveis de EROs e ERNs existem substâncias que, em baixas concentrações, atuam impedindo a formação de espécies reativas ou combatendo as já formadas. O antioxidante ideal é aquele que após exercer sua ação, possui baixa capacidade seguir a cascata de oxidações. Estas substâncias são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo

metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque à dupla ligação dos ácidos graxos poli-insaturados, aos aminoácidos das proteínas, e às bases de DNA, evitando assim a formação de lesões e perda da integridade e estabilidade celular. Podem ter origem endógena (enzimática) ou exógena (não enzimática) (YU, 1994; DEVARAJ; JIALAL, 2000).

### 1.2.1 Sistema de defesa exógeno ou não enzimático

É constituído por pequenas moléculas como glutathiona (GSH) e micronutrientes como vitaminas A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, C e E, cobre, zinco, selênio, carotenóides, ácido  $\alpha$ -lipóico, ácido fólico, ácido úrico, albumina, coenzima Q<sub>10</sub> (JOHANSEN et al., 2005). A glutathiona e as vitaminas A, C e E atuam como aceptores de elétrons (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007), enquanto o selênio, ferro, zinco, cobre e manganês atuam como cofatores para enzimas antioxidantes (MACHLIN; BENDICH, 1987; OPARA, 2006).

A GSH é um tripeptídeo (*L*- $\gamma$ -glutamil-*L*-cisteinilglicina) que desempenha funções essenciais na célula, salientando a sua função como cofator da família de enzimas glutathiona peroxidases (GPx), onde exerce papel protetor contra o estresse oxidativo, com sua oxidação a glutathiona oxidada (GSSG) (C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub>S<sub>2</sub>) (VASCONCELOS et al., 2007). A glutathiona é o mais importante regulador não enzimático da homeostase redox intracelular, em todos os tipos de células (ÇIMEN, 2008).

O ácido ascórbico ou vitamina C é geralmente encontrado sob a forma de ascorbato em nosso organismo, que é a forma que atua como antioxidante, ao doar um H• ou [H<sup>+</sup> + e<sup>-</sup>] para um radical (VASCONCELOS et al., 2007). Está localizado nos compartimentos aquosos dos tecidos orgânicos, devido a sua alta solubilidade em água.

Os polifenóis são denominados quimicamente como substâncias que possuem um anel aromático com grupos hidroxila, incluindo ésteres e glicosídeos (D'ARCHIVIO et al., 2007). No entanto, eles são agrupados em diferentes classes dependendo do número de anéis fenólicos e do tipo e número de elementos estruturais que ligam os anéis fenólicos, isto por causa da diversa gama de estruturas. As classes incluem ácidos fenólicos simples, estilbenos, chalconas e flavonóides. (MANACH et al., 2004).

Encontram-se presentes em frutas e vegetais como uva, tomate, chá verde, azeitonas, chocolate, entre outros. Os polifenóis têm demonstrado atividade antioxidante, neutralizando

EROs e ERNs (OLAS; WACHOWICZ, 2002; JOHANSEN et al., 2005; SINGH et al., 2008). São os antioxidantes mais abundantes presentes na dieta, sendo que seu consumo diário pode atingir 1g. Este consumo é muito maior que ingestão de todos os outros fitoquímicos classificados como antioxidantes (MANACH et al., 2004; CERQUEIRA et al., 2007). De modo geral, os polifenóis e, em particular os flavonoides, possuem estrutura ideal para o seqüestro de radicais, sendo antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E (BARREIROS et al., 2006). Um dos polifenóis mais estudados e reconhecidos é o resveratrol, membro da classe dos estilbenos, encontrado em grande quantidade nas cascas de uvas, nozes, chocolate e em bebidas como vinho tinto, vem se destacando pelas suas propriedades antioxidantes e eficácia farmacológica (D'ARCHIVIO et al. 2007; ORALLO, 2008).

### 1.2.2 Sistema de defesa endógeno ou enzimático

O sistema de defesa antioxidante enzimático é a primeira linha de defesa antioxidante constituído, principalmente, pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR) (VILLANUEVA; KROSS, 2012), que atuam diretamente sobre o ânion  $O_2^{\bullet-}$  e sobre o  $H_2O_2$  convertendo-os em espécies menos reativas (SCANDALIOS 2005; KALYANARAMAN, 2013).

A SOD faz parte de um grupo de metaloenzimas abundantes em células aeróbias sendo a principal enzima antioxidante que catalisa os íons  $O_2^{\bullet-}$  produzidos por todo organismo via dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$ . Três isoformas da SOD são conhecidas, dependendo do íon contido em seu sítio ativo e o gene a partir do qual são sintetizadas. Assim, as mesmas diferem entre si pela sua estrutura, e não pela sua função propriamente dita:

- SOD1, citoplasmática, dependente de cobre e zinco (Cu/Zn-SOD): é encontrada nos lisossomas e no núcleo de eucariontes, nos cloroplastos e em alguns procariotos e apresenta estrutura homodimérica (CEMELI et al., 2009).
- SOD2, mitocondrial, dependente de manganês (MnSOD): é encontrada em procariotos e na mitocôndria de leveduras e animais e apresenta estrutura homotetramérica (SCANDALIOS et al., 2005).
- SOD3, extracelular, dependente de cobre e zinco (Cu-ZnSOD): encontrada no meio extracelular e apresenta estrutura homotetramérica (ZELKO et al., 2002).

A CAT está presente em todas as células, principalmente nos peroxissomas, principal organela responsável pela desintoxicação celular e oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, fonte inesgotável de peróxidos e produtos carbonílicos. Também, encontrada nas mitocôndrias das células do tecido cardíaco (VASCONCELOS et al., 2007). Possui o ferro como centro ativo e atua sobre o  $H_2O_2$  transformando-o em oxigênio e duas moléculas de água ( $H_2O$ ). A CAT é a principal reguladora dos níveis intracelulares de  $H_2O_2$ , e quando sua atividade está inibida há um aumento da concentração de  $H_2O_2$  em órgãos como o fígado (SCANDALIOS et al., 2005; KALYANARAMAN, 2013).

A GPx está presente no citosol e na mitocôndria e possui como mecanismo de ação a redução do  $H_2O_2$  em água. Esta reação utiliza a forma glutatona reduzida (GSH) e a transforma em GSSG e  $H_2O$  (YU, 1994; HALLIWELL et al., 1999; FINAUD et al., 2006). Apresenta-se sob quatro isoformas: GPx1 ou enzima clássica, presente no citosol de todas as células do corpo; GPx2 ou gastrointestinal, específica do trato gastrointestinal; GPx3 ou plasmática ou extracelular, encontrada no fluido do revestimento interno do pulmão e no leite materno, além do plasma em mamíferos, e a GPx4, que atua sobre peróxidos de resíduos de ácidos graxos nas membranas e lipoproteínas, diminuindo, também, o hidroperóxido da timina, formado como consequência do ataque dos radicais a base timina do DNA (RAYMAN, 2000; VASCONCELOS et al., 2007; KALYANARAMAN, 2013).

A glutatona redutase age conjuntamente com a glutatona peroxidase, sendo responsável pela regeneração da glutatona à sua forma reduzida na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), impedindo a paralisação do ciclo metabólico da glutatona (ROVER JÚNIOR et al., 2001).

### **1.3 Genética da superóxido dismutase dependente de manganês (SOD2)**

Dentro destas enzimas a superóxido dismutase dependente de manganês (SOD2) se destaca, uma vez que, atua dentro da mitocôndria que é o principal compartimento celular que produz altos níveis de  $O_2^{\bullet-}$ . A SOD2 é uma molécula homotetramétrica composta por tetrâmeros de aproximadamente 23 kDa por subunidade (BRESCIANI et al., 2013) considerada uma enzima antioxidante da primeira linha de defesa, codificada por um gene nuclear e é encontrada na sua forma ativa na matriz mitocondrial, dismutando o  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$  (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Estudos têm demonstrado que a expressão da SOD2 é vital para a sobrevivência do organismo. Pesquisas realizadas com camundongos *knockout*, ou seja, que não possuem o gene da SOD2, morreram logo após o nascimento devido ao dano oxidativo exacerbado, além de apresentarem alterações morfofuncionais importantes, incluindo cardiomiopatia dilatada e neurodegeneração (LI et al., 1995).

### 1.3.1 Polimorfismo do gene da superóxido dismutase dependente de manganês (Ala16Val-SOD2)

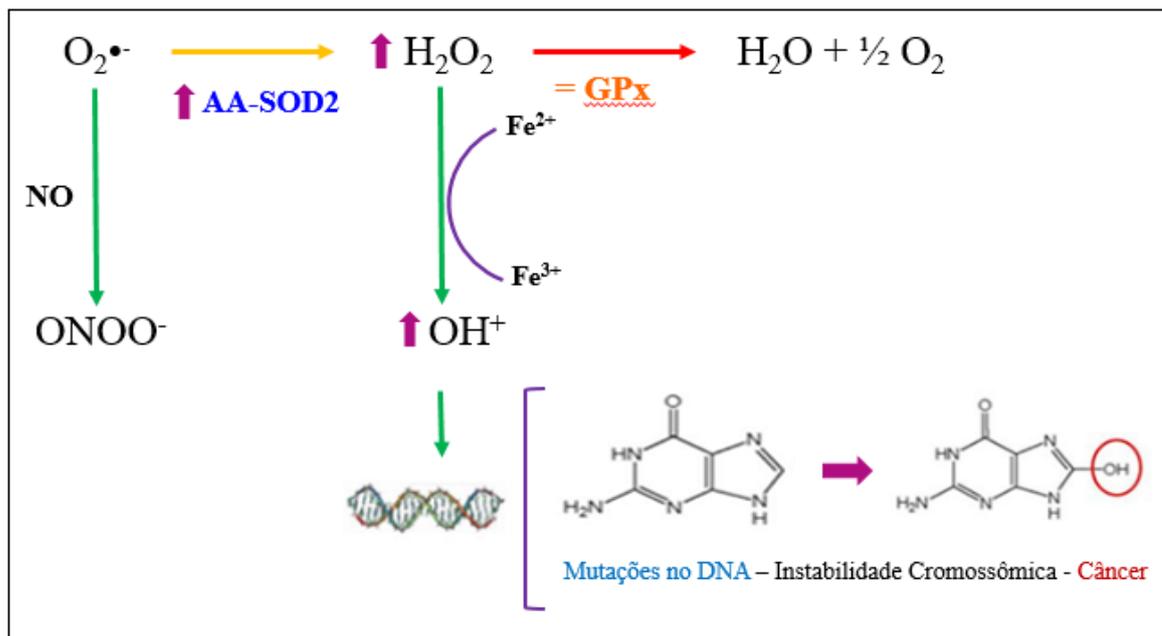
A enzima SOD2 é produzida a partir de um gene nuclear localizado no braço longo do cromossomo 6, na sub-região q25.3, possuindo cinco éxons e quatro íntrons (CHURCH, et al., 1992; WAN, et al., 1994). A proteína da SOD2 é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso, e uma vez sintetizada esta proteína SOD2 contém uma pequena sequência peptídica chamada sequência mitocondrial alvo (*mitochondrial target sequence*, MTS), que direciona a enzima para o interior da mitocôndria. Uma vez que, a SOD2 entra na mitocôndria a região MTS é clivada por lisossomos e a enzima SOD2 torna-se ativa e funcional (ZELKO et al., 2002).

Na região gênica que codifica a sequência MTS, foi detectado um polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP, *single nucleotide polymorphism*) localizado no éxon 2, nucleotídeo 47, ocorre a substituição de uma timina (T) por uma citosina (C). A substituição da T pela C faz com que haja a inserção de um aminoácido alanina (A) (GCT) ao invés do aminoácido valina (V) (GTT) na posição 9 do códon 16. Por este motivo, este polimorfismo é denominado Ala16Val-SOD2. Este polimorfismo que possui os dois alelos A e V, resulta em três possíveis genótipos: AA, AV e VV (ZELKO et al., 2002).

Em termos fenotípicos, a variante A-SOD2 apresenta uma estrutura  $\alpha$ -hélice, que facilita a sua entrada para o interior da mitocôndria. Portanto, portadores do genótipo AA possuem uma maior eficiência enzimática da SOD2. Já a variante V-SOD2 apresenta uma estrutura  $\beta$ -lâmina, fazendo com que fique parcialmente detida no poro da membrana interna mitocondrial dificultando assim a sua entrada. Esta condição acaba resultando em menor atividade da enzima SOD2 nos indivíduos portadores do genótipo VV (SUTTON et al., 2005). No caso, os indivíduos heterozigotos (AV) possuem uma eficiência intermediária em relação aos genótipos homozigóticos (AMBROSONE et al., 1998, SUTTON et al., 2003, BAG; BAG, 2008). In-

investigações *in vitro* estimaram que o alelo A-SOD2 é capaz de gerar uma enzima 30-40% mais eficiente o que o alelo V-SOD2 (SUTTON et al., 2003; MONTIEL et al., 2013). Esta grande diferença na eficiência enzimática pode levar a riscos de disfunções e doenças associadas ao estresse oxidativo (BRESCIANI et al., 2013).

Apesar do alelo A-SOD2 ser mais eficiente em termos enzimáticos, o mesmo pode ocasionar danos celulares via excesso de produção de  $H_2O_2$ , que necessariamente não é catalisada pela GPx, a qual atua no interior da mitocôndria. Como o  $H_2O_2$  é permeável as membranas, o excesso desta molécula pode ir para o citoplasma e participar da reação de Fenton gerando um excesso de radical  $OH\cdot$  (Figura 1). Esta é a possível explicação do porque o genótipo AA tem sido associado com maior risco de desenvolvimento de alguns tipos de câncer (BRESCIANI et al., 2013).

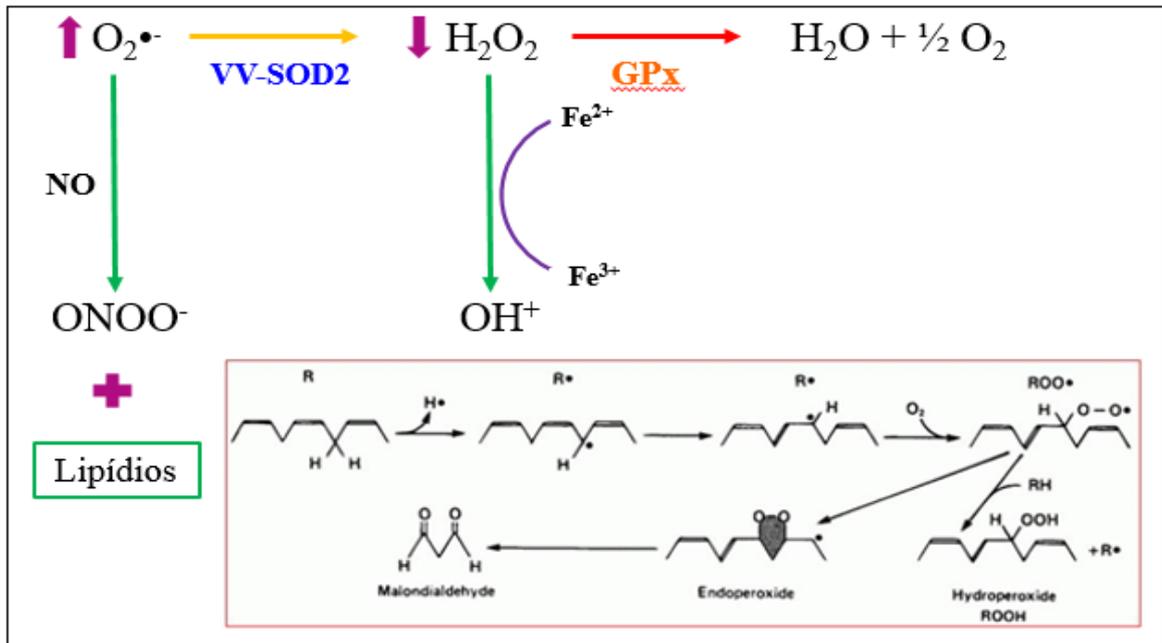


**Figura 1 -** Potencial associação entre o genótipo AA do polimorfismo Ala16Val-SOD2 com a produção de níveis elevados de hidroxila, que estão associados a danos ao DNA e ao risco aumentado de câncer. No caso, a maior taxa de dismutação do  $O_2\cdot^-$  em  $H_2O_2$ , devido a solubilidade do  $H_2O_2$  nas membranas e no citoplasma, pode reagir via reação de Fenton originando altos níveis de  $OH\cdot$ .

Fonte: Os Autores

Já os indivíduos do genótipo VV tendem apresentar aumento dos níveis de  $O_2\cdot^-$  que facilmente reage com ON produzindo  $ONOO^-$  que, por sua vez, causa extensa lipoperoxi-

dação celular (Figura 2). Esta condição também tem sido associada a doenças metabólicas (BRESCIANI et al., 2013). Deste modo, parece ocorrer um desequilíbrio basal da SOD2 nas células dos dois genótipos homocigotos (TAUFER et al., 2005; MONTAGNER et al., 2010).



**Figura 2-** Potencial associação do genótipo VV com maiores níveis de lipoperoxidação que causam danos as membranas plasmática e das organelas. A menor eficiência na taxa de dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$  faz com que haja acúmulo de  $O_2^{\bullet-}$  na mitocôndria. Uma vez que virtualmente todas as células produzem ON, e que o  $O_2^{\bullet-}$  possui alta afinidade por esta molécula, a reação entre  $O_2^{\bullet-}$  e ON produz **ONOO<sup>-</sup>** que pode causar extensa lipoperoxidação das membranas.

Fonte: Os Autores

### 1.3.1.1 Associação com doenças

Na recente revisão sobre a interação do polimorfismo Ala16Val-SOD2 com diversos aspectos da saúde humana feita por Bresciani e colaboradores (2013), são elencadas as principais disfunções e risco de morbidades associadas aos genótipos homocigóticos. O genótipo AA apresenta uma enzima SOD2 mais eficiente. Nessa perspectiva, acredita-se que tal genótipo esteja associado a um risco maior de neoplasias como o câncer de próstata

(TAUFER et al., 2005; IGUCHI et al., 2009; ZEJNILOVIC et al., 2009; MAO et al., 2010), câncer de mama (COX et al., 2006; BICA et al., 2009; ERAS-ERDOGAN et al., 2009), câncer de estômago, câncer de pulmão (ZEJNILOVIC et al., 2009). Outro aspecto levantado no estudo de Taufer e colaboradores (2005) foi que o polimorfismo Ala16Val-SOD2 afeta muitos aspectos relacionados ao envelhecimento, relatando que portadores do genótipo AA possuem um sistema imune mais deficiente que os demais genótipos, tornando-se mais suscetíveis a infecções, doenças autoimunes e câncer.

Em contrapartida, o genótipo VV por apresentar uma enzima menos eficiente, pode estar associado à disfunção endotelial e indicadores bioquímicos associados ao risco cardiometabólico e complicações microvasculares do diabetes (JONES et al., 2010; TIAN et al., 2011), cardiomiopatia e maiores níveis de LDL-oxidado em indivíduos com diabetes mellitus do tipo II (GOTTLIEB et al., 2005). Dedoussis e colaboradores (2008) observaram níveis elevados de LDL-oxidado em homens de meia idade e níveis mais baixos em mulheres idosas, ambos do genótipo VV, quando comparados com os outros genótipos (AA e AV). Em um estudo conduzido por Montano e colaboradores (2009) apontaram que em indivíduos obesos há maior frequência do genótipo VV. De acordo com os dados estimados a razão de chance (RC) é de 1.5 vezes maior de indivíduos VV serem obesos do que indivíduos AA e AV. Sugerindo que um aumento dos níveis do ânion  $O_2^{\bullet-}$  poderia ser ocasionado pela baixa eficiência do genótipo VV-SOD2 e assim afetar as vias metabólicas contribuindo para obesidade. Duarte e colaboradores (2010) e Bica e colaboradores (2010) também encontraram em suas pesquisas uma associação do genótipo VV com a hipercolesterolemia e câncer de mama com maior potencial metastático, respectivamente.

### 1.3.1.2 Associação com agentes estressores

Com base nos resultados obtidos nos estudos citados anteriormente, foi possível delinear novas pesquisas empregando um modelo experimental *in vitro*. No estudo farmacogenético de Montagner e colaboradores (2010) investigaram a resposta *in vitro* de uma cultura de linfócitos oriundos de indivíduos saudáveis com os diferentes genótipos do polimorfismo Ala16Val-SOD2, expostas à radiação UV. Os resultados apresentaram aumento da viabilidade celular e índice mitótico dos linfócitos portadores do genótipo AA, bem como, maior índice de danos no DNA quando expostos à radiação UV. Outra investigação mais recente utili-

zando cultura de linfócitos observou a ocorrência de níveis elevados na produção de citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFT- $\gamma$ ) em linfócitos portadores do genótipo VV, quando comparados com os linfócitos dos demais genótipos (AA e AV) (MONTANO et al., 2012).

Costa e colaboradores (2012), utilizando o mesmo protocolo *in vitro* observaram que o efeito antioxidante do citrato de clomifeno, um fármaco utilizado para a indução da ovulação, era influenciado pelo polimorfismo Ala16Val-SOD2. No mesmo ano, foi realizado um estudo por Algarve e colaboradores (2012), para avaliar a influência do Ala16Val-SOD2 sobre os efeitos citotóxicos relacionados a exposição *ex vivo* ao metímercúrio (MeHg) em leucócitos, sugerindo efeito toxicogénico na resposta das células expostas ao MeHg. Barbisan e colaboradores (2014) também observaram em um estudo *in vitro* que o polimorfismo Ala16Val-SOD2 é capaz de modular a resposta citotóxica de linfócitos ao fármaco metotrexato (MTX). Este fármaco, um antimetabólito análogo do ácido fólico, é utilizado em doses elevadas no tratamento de neoplasias como a leucemia linfocítica e em baixas doses para o tratamento de doenças autoimunes, como a psoríase e a artrite reumatóide.

### 1.3.1.3 Associação com agentes antioxidantes

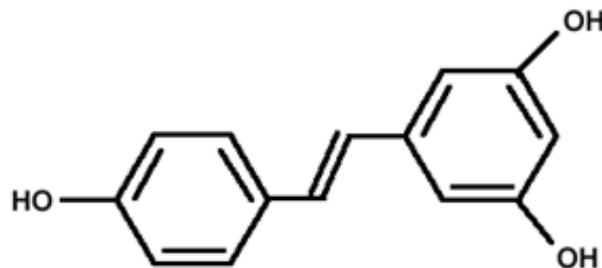
Ao contrário dos estudos sobre de associação entre o polimorfismo Ala16Val-SOD2 com doenças e respostas diferenciadas a agentes estressores, investigações sobre o potencial efeito de moléculas antioxidantes relacionadas a este polimorfismo não foram relatadas na literatura. A relevância de tais estudos encontra-se no fato de que, ambos os genótipos homozigóticos (AA e VV) produzem um estado de desbalanço crônico do metabolismo oxidativo basal que pode aumentar o risco de doenças. Deste modo, entender como tais genótipos se comportam frente a suplementação de antioxidantes, como o RES, é científico e clinicamente relevante.

## 1.4 Resveratrol

### 1.4.1 Conceito

O Resveratrol (3,5,4'- triidroxiestilbeno; RES) (Figura 3) é uma fitoalexina polifenólica presente em mais de 72 espécies de plantas distribuídas por 31 gêneros e 12 famílias. Dessas

plantas destacam-se as uvas tintas (principalmente *Vitis vinifera*), amoras, amendoim, maçã, mirtilo (*blueberry*), framboesa, entre outros. Esse composto é sintetizado em resposta à infecção por fungos (*Botrytis cinerea*) e a estresses ambientais, como a exposição à luz UV (AGGARWAL et al., 2004; HARIKUMAR; AGGARWAL, 2008) e agentes químicos (ADRIAN et al., 1996). A biossíntese do RES ocorre pela condensação de três moléculas de malonil-COA e uma molécula de 4-coumaril-COA através da enzima resveratrol sintetase (KING et al., 2006). Pode ser isolado de sementes, raízes, frutos e inflorescências conforme cada espécie (BURNS et al., 2002). Entretanto, é nas cascas das uvas, e conseqüentemente nos vinhos tintos, que encontram-se as maiores concentrações de RES (WATERHOUSE et al., 1993; JEANDET et al., 1995; BAVARESCO, 2003).



**Figura 3 - Estrutura química da molécula do Resveratrol**

**Fonte:** Adaptado de Doré, 2005.

As concentrações variam de 50 a 100 mg de RES por grama de peso bruto nas cascas das uvas, sendo que nos vinhos tintos pode variar de 2 a 7 mg/mL (PERRONE et al., 2007). Por ser liberado a partir da casca durante o processo de fermentação, no suco de uva a concentração do RES é geralmente menor (CARERI et al., 2003). Entretanto, a concentração de RES em sucos preparados a partir de diversas espécies de uvas, pode aproximar-se daquelas encontradas em vinhos (SOLEAS; DIAMANDIS; GOLDBERG, 1997). É importante salientar que as concentrações de RES dependem de diversos fatores como: o tipo, a intensidade e a duração do *stress* sob o qual se encontra a videira durante a fase frutífera, ou ainda do estágio de desenvolvimento do fruto (PAN et al., 2009).

Souto e colaboradores (2001) constataram que em vinhos da região sul do Brasil a média de RES é de 2,57 mg/L, considerada uma das mais altas do mundo. A justificativa para esse resultado provavelmente decorre da alta precipitação pluviométrica da Serra Gaúcha, favorecendo a proliferação de doenças fúngicas na parte aérea das videiras. Vitrac e colaboradores (2005), sugeriram que o vinho brasileiro pode ser uma importante fonte de RES, uma vez que pessoas com um consumo regular de 160 mL/dia de vinho tinto, foi estimado um consumo total de 5,3 mg/dia de compostos do RES.

A partir de 1992, o RES foi considerado o principal responsável pelos efeitos cardioprotetores do vinho tinto, chamando atenção dos pesquisadores (SIEMANN; CREASY, 1992). O interesse surgiu devido a um fenômeno conhecido como “Paradoxo francês”. Tal fenômeno retrata um caso que ocorreu na França onde a população, embora ingerisse grande quantidade de gorduras saturadas na alimentação, apresentava baixos índices de mortes relacionadas a doenças cardíacas. Visto que, o vinho tinto é muito consumido pela população francesa, surgiu a hipótese de que a alta concentração de RES encontrada nele teria sido a responsável pelo baixo índice de doença cardíaca (WENZEL; SOMOZA, 2005; KING et al, 2006).

Desde então, a busca científica pelo conhecimento das características e propriedades do RES aumentou de forma considerável. Atualmente, além da proteção cardiovascular, diversas propriedades biológicas associadas a esse composto estão descritas, tais como atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticarcinogênica, estrogênica, anti-agregação plaquetária e ação apoptótica (SHAKIBAEI; HARIKUMAR; AGGARWAL, 2009). Além de atuar no tratamento do diabetes tipo 2 (FRÖJDÖ et al., 2008), tratamento e prevenção de câncer (WANG et al., 2010) e no sistema nervoso (ALBANI et al., 2010). Também já se sabe que o RES é capaz de mimetizar os efeitos da restrição calórica e prevenir diversos processos de envelhecimento, aumentando a longevidade via modulação de genes como a Sirtuína 1 (BAUR; SINCLAIR, 2006).

#### 1.4.2 Efeito do resveratrol na modulação do metabolismo oxidativo

A quantidade de efeitos biológicos proporcionados pelo RES está intimamente associado à estrutura do composto considerando a disposição do grupo fenol, apresentada pela molécula do isômero *trans*-resveratrol, a característica fundamental para o desenvolvimento da sua atividade antioxidante (LEONARD et al., 2003).

A atividade antioxidante sucede da capacidade do composto em se unir aos RL existentes no meio celular. Esses, por sua vez, são produtos decorrentes do metabolismo celular, que em virtude da sua capacidade de desencadear reações envolvidas em diferentes processos patológicos em consequência do seu aumento e/ou redução de antioxidantes, são considerados como iniciantes de processos oxidativos (LEONARD et al., 2003). Desta forma, a capacidade antioxidante do RES serve como uma importante ferramenta na prevenção ou inibição de determinados estresses oxidativos que acometem diversas linhagens celulares (SGAMBATO et al., 2001).

Estudos pioneiros sobre a ação antioxidante do RES foram realizadas por, Frankel e colaboradores (1993), onde verificaram que o RES protege as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) humanas da oxidação catalisada pelo cobre. A partir disso, através de mais estudos, foi possível demonstrar que, principalmente, através da capacidade em quelar o cobre e de captar RL é que ocorre a atividade antioxidante direta do composto (BELGUENDOZ et al., 1997; FAUCONNEAU et al., 1997; FREMONT et al., 1999; ZOU et al., 1999). Os grupos hidroxilas dos anéis fenólicos do RES atuam como doadores de elétrons, sendo os responsáveis pela capacidade de neutralizar e sequestrar o radical  $\text{OH}\cdot$  e o ânion  $\text{O}_2\cdot^-$  prevenindo dessa forma a peroxidação lipídica das membranas, oxidação proteica e dano ao DNA (LEONARD et al., 2003; LÓPEZ-VÉLEZ et al., 2003; MOKNI et al., 2007). O RES também pode atuar na quelção do ferro, exercendo um papel fundamental na geração de EROs através de reações como a de Fenton.

Esse composto, além da atividade antioxidante direta, também é caracterizado pela sua atividade antioxidante indireta, por causa dos seus efeitos em diferentes sistemas enzimáticos e antioxidantes celulares que em conjunto melhoram o estado redox da célula. Conforme dados encontrados na literatura, o RES é capaz de induzir um aumento na expressão e na atividade das enzimas envolvidas no estresse oxidativo como a SOD, CAT e GPx de forma dose-dependente (MOKNI et al., 2007) e o conteúdo da glutatona (SHARMA; GUPTA, 2002; ATES et al., 2007). Yen e colaboradores (2003) demonstraram em seu estudo, que após um insulto com  $\text{H}_2\text{O}_2$  em linfócitos, houve aumento na atividade das enzimas GPx, GST e GR. No estudo de Brito e colaboradores (2006) verificaram que através da indução da gama-glutamylcisteína sintetase ( $\gamma$ -GCS), enzima limitante da síntese de glutatona, o RES gerou um aumento nos níveis intracelulares do tripeptídeo.

O RES quando adicionado em baixas concentrações (25, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ) a uma cultura de cardiomiócitos, mostrou induzir enzimas antioxidantes e de fase 2, incluindo SOD, CAT, GR,

GPx, GST e NAD(P)H: quinona oxirredutase 1, e essas defesas celulares promovem proteção contra injúria oxidativa quando aumentadas (FAN et al., 2008).

Estudos prévios sobre a potencial interação entre o RES e a enzima SOD2 têm sido relatados na literatura. Em um estudo norteado por Robb e colaboradores (2008) investigaram os efeitos a curto e a longo prazo do RES (50  $\mu$ M e 100  $\mu$ M) em fibroblastos sobre a atividade de enzimas antioxidantes, percebendo um aumento da expressão e da atividade da SOD2 a longo prazo. Sugerindo que esse aumento seja um importante mecanismo pelo qual o RES exerce os seus efeitos biológicos, uma vez que, a SOD2 é a enzima responsável por reduzir o estresse oxidativo intracelular.

#### 1.4.3 Efeito do resveratrol na modulação da sirtuína 1

As sirtuínas (SIRT) são um grupo de enzimas amplamente distribuídas e conservadas que pertencem à classe III da família de deacetilases de histonas (HDACs) dependentes do cofator dinucleotídeo de nicotinamida (NAD<sup>+</sup>) (SAUVE et al., 2006).

As SIRT receberam essa denominação devido a semelhança com a enzima Sir2 (*silent information regulator 2*) da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, identificada e descrita inicialmente por Klar e colaboradores (1979), como MAR1 (*mating type regulator 1*) por influenciar o controle de silenciamento transcricional lócus específico em leveduras. Anos depois, outros quatro genes foram relacionados a esse e identificados como reguladores de silenciamento de informação (SIRT 1, 2, 3 e 4). Posteriormente, a Sir2 foi encontrada em outros organismos como *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* e tantos outros. (BLANDER; GUARENTE, 2004; CANTÓ; AUWERX, 2009).

Atualmente sabe-se que outros microorganismos possuem apenas um gene para SIRTs, enquanto os eucariotos possuem múltiplas SIRTs. Em mamíferos, esta família apresenta sete membros (SIRT 1-SIRT 7) sendo cada um deles identificado por um domínio catalítico com sequência conservada de 275 aminoácidos e também por uma sequência adicional N e/ou C-terminal única e de comprimento variável. Em seres humanos, estas SIRTs estão distribuídas de forma diferenciada nas células, diferindo-se quanto a especificidade tecidual, atividade enzimática e substratos alvo. As sirtuínas SIRT 1, SIRT 6 e SIRT 7 encontram-se localizadas no núcleo, a SIRT 2 encontra-se no citoplasma e as SIRT 3, SIRT 4 e SIRT 5 encontram-se na mitocôndria (MICHISHITA et al., 2005). Duas reações diferentes são catalisa-

das pela classe das SIRT: reação de deacetilação e reação de ADP-ribosilação. As subclasses SIRT 1, 2, 3, 5 e 7 catalisam a reação de deacetilação, enquanto que as restantes, SIRT 4 e 6 catalisam a reação de ADP-ribosilação (NEBBIOSO et al., 2012).

Uma vez que, a atividade das SIRTs depende da disponibilidade da NAD<sup>+</sup>, esta proteína atua como um sensor do estado *redox* da célula, fazendo uma ponte entre as condições energéticas intracelulares, que dependem do estado nutricional da célula e a deacetilação de diversos substratos. Sabe-se que em condições de jejum, restrição calórica e exercício físico, os níveis de NAD<sup>+</sup> celulares são elevados (CANTO et al, 2010; CHEN et al, 2008) induzindo a uma ativação da SIRT 1, visto que uma dieta rica em gorduras diminui a razão [NAD<sup>+</sup>] / [NADH] (KIM et al., 2011).

Entre as sete SIRTs presentes nos seres humanos, a SIRT 1, é a sirtuína mais pesquisada, sendo homóloga ao gene Sir2 em leveduras. É descrita como uma deacetilase nuclear em células mamíferas, cujos substratos incluem proteínas primariamente, mas não exclusivamente, envolvidas na regulação transcricional. Diversos processos fisiológicos, tais como diferenciação, sobrevivência e metabolismo celular, são influenciados pela SIRT 1. Seu potencial envolve a regulação da estrutura da heterocromatina e transcrição gênica, ativação ou supressão da proteína p53, processos apoptóticos, reparo de DNA, regulação de vias pró-inflamatórias e regulação do metabolismo de lipídios (KIM et al., 2011).

A SIRT 1 pode deacetilar as histonas H1, H2, H3 e H4, mas preferencialmente deacetila a lisina 26 da histona H1 (HIK26), as lisinas 9, 14 e 56 da histona H3 (H3K9, H3K14, H3K56) e a lisina 16 da histona H4 (H4K16) (VAQUERO et al., 2007; YUAN et al., 2009). Além das histonas, a SIRT1 também é capaz de deacetilar proteínas não-histonas, controlando suas atividades e tendo efeitos em diversas condições fisiológicas. Estas proteínas não-histonas incluem fatores de transcrição, bem como: a sub-família ForkHead O (FOXO - FOXO1 e FOXO3), o receptor proliferador ativador de peroxissomas gama (PPAR- $\gamma$ ), peroxissoma proliferador co-ativador de receptor gama (co-ativador de transcrição gênica) (PGC-1 $\alpha$ ), o fator nuclear NF- $\kappa$ B, fator de reparação do DNA Ku70, o gene supressor tumoral p53 e acetil-CoA sintetase (YAMAMOTO et al., 2007; YU; AUWERX, 2009b).

Desta forma as SIRTs sinalizam o estado nutricional (YU; AUWERX, 2009). A expressão da SIRT 1, bem como a sua atividade, são sensíveis aos níveis de nutrientes, e dessa forma, ela desempenha um papel fundamental na regulação de processos metabólicos e fisiológicos críticos, regulando diversos alvos moleculares (CAKIR et al., 2009; CHUNG et al., 2010; SILVA, WAHLESTEDT, 2010).

Existem compostos naturais que possuem a propriedade de regular a atividade das SIRT, conferindo benefícios para diversos tipos de patologias como as cardiovasculares, neurodegenerativas, inflamatórias, autoimunes, tumores, entre outros. Esses compostos são derivados do fenol como quercetina, piceatannol e RES (ALCAIN; VILLALBA, 2009). Dentre eles, o RES é o ativador de SIRT com ação mais potente. Este, por sua vez, altera a estrutura da SIRT 1, reforça sua atividade em até oito vezes e favorece a sua ligação com o substrato acetilado (HOWITZ et al., 2003; BORRA et al., 2005). Sabe-se que o RES é um importante ativador de SIRT (HOWITZ et al., 2003), sendo relacionado como mimetizador de restrição calórica. Essa é a única intervenção não genética, conhecida desde a década de 30, por aumentar a longevidade de diferentes espécies (BAUR, SINCLAIR, 2006).

Nesta perspectiva, diversos estudos vêm reportando o potencial do RES no aumento da longevidade e prevenção ou retardo de doenças associadas a idade, algumas relacionando com a SIRT1 (HOWITZ et al., 2003; BAUR et al., 2006; LAGOUGE et al., 2006; BARGER et al., 2008). Foi demonstrado que o RES aumentou a longevidade de leveduras (HOWITZ et al., 2003), moscas (*Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*) (WOOD et al., 2004), peixes (VALENZANO et al., 2006) e camundongos alimentados por dieta rica em lipídios (BAUR et al., 2006).

Xiuyun Hou e colaboradores (2008), afirmaram que o RES diminui o acúmulo de lipídios em hepatócitos, induzidos por alta concentração de glicose. Este efeito protetor do composto pode estar associado à ativação da SIRT 1 e AMPK (proteína quinase ativada por AMP). Em pré-adipócitos 3T3-L1 a ativação da SIRT 1 pelo RES reduz a secreção de adiponectina, proteína secretada pelos adipócitos, que regula a homeostasia de lipídios e da glicose e potencializa a ação da insulina a nível hepático (QIANG et al., 2007).

#### 1.4.4 Efeito do resveratrol na modulação da resposta imune

O envelhecimento pode afetar o sistema imune de diversas maneiras, incluindo várias modificações que podem conduzir a hiper-responsividade, que no quadro inflamatório pode agravar morbidades degenerativas e provocar doenças autoimunes (CAVAGNAT et al., 2012). A inflamação crônica relacionada à idade é fortemente afetada pelo estresse oxidativo, que causa danos ao DNA e encurtamento dos telômeros, comprometendo as funções das células imunes (CAVAGNAT et al, 2012; FULOP et al, 2014).

No entanto, uma série de estudos descreve a ação de um grupo de pequenas moléculas que apresentam algumas propriedades anti-envelhecimento e anti-inflamatória, e por essa razão são consideradas como agentes gero-supressores. Um exemplo é o RES. A propriedade anti-envelhecimento relacionada a esse composto, envolve sua propriedade mimética da restrição calórica, incluindo a ativação de alguns genes, como a SIRT 1. Em relação ao sistema imune, estudos prévios descreveram a capacidade de RES em suprimir a produção de células T, o estresse oxidativo e os processos inflamatórios em ratos obesos induzidos por dieta super calórica (WANG et al., 2013). O efeito do RES na inibição da ativação de células T parece estar envolvido no aumento da atividade da SIRT 1 (ZOU et al., 2013). No entanto, não está claro se o estado do metabolismo oxidativo celular tem alguma influência sobre o efeito anti-inflamatório desse composto.

Além disso, compreender estes processos torna-se essencial, pois há uma série de fatores que podem alterar o metabolismo oxidativo basal, o que poderia afetar a resposta imune celular de compostos anti-inflamatórios, como o RES.

### **1.5 Hipótese do estudo**

A hipótese deste estudo é que o resveratrol, que é uma molécula com ação antioxidante, anti-inflamatória e moduladora de genes da longevidade como a SIRT 1 regula a ativação inflamatória de células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) através de um efeito farmacogenético dependente do polimorfismo Ala16Val-SOD2.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Investigar a influência do polimorfismo Ala16Val-SOD2 no efeito anti-inflamatório *in vitro* do resveratrol em CMSPs através da análise da viabilidade, proliferação celular, parâmetros oxidativos, inflamatórios e na modulação da sirtuína 1.

### **2.2 Objetivos específicos**

Avaliar o efeito de diferentes concentrações do resveratrol na ativação inflamatória de CMSP portadoras de diferentes genótipos do polimorfismo Ala16Val-SOD2 através da análise:

- da viabilidade e proliferação celular;
- dos níveis de marcadores oxidativos (EROs e lipoperoxidação);
- dos níveis das citocinas inflamatórias interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6), fator de crescimento tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferon gama (IFT- $\gamma$ ), e da citocina anti-inflamatória interleucina 10 (IL-10);
- da modulação do gene e dos níveis da proteína sirtuína 1.

### **3 RESULTADOS**

Os resultados, bem como, a metodologia utilizada neste estudo, estão organizados sob a forma de um manuscrito científico submetido a revista *Biogerontology*.

Título: The anti-inflammatory effects of resveratrol on human peripheral blood mononuclear cells are influenced by a superoxide dismutase 2 gene polymorphism.

Autores: Dianni Capeleto, Fernanda Barbisan, Verônica Azzolin, Eduardo Bortoluzzi Dornelles, Felipe Rogalski, Cibele Ferreira Teixeira, Alencar Kolinski Machado, Francine Carla Candoná, Tális da Silva, Thiago Duarte, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte, Ivana Beatrice Mânica da Cruz.

## **ARTIGO**

### **The anti-inflammatory effects of resveratrol on human peripheral blood mononuclear cells are influenced by a superoxide dismutase 2 gene polymorphism**

Dianni Capeleto<sup>1#</sup>, Fernanda Barbisan<sup>1#</sup>, Verônica Azzolin<sup>1</sup>, Eduardo Bortoluzzi Dornelles<sup>2</sup>, Felipe Rogalski<sup>3</sup>, Cibele Ferreira Teixeira<sup>3</sup>, Alencar Kolinski Machado<sup>2</sup>, Francine Carla Candoná<sup>1</sup>, Tális da Silva<sup>2</sup>, Thiago Duarte<sup>1</sup>, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte<sup>3</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>1,2,3\*</sup>

- 1- Pharmacology graduate program – Federal University of Santa Maria, Santa Maria/RS-Brazil
- 2- Biochemical Toxicology graduate program— Federal University of Santa Maria, Santa Maria/RS-Brazil
- 3- Biogenomic laboratory- Federal University of Santa Maria, Santa Maria/RS-Brazil

\* Corresponding author: Ivana BM da Cruz, Av. Roraima 1000, Prédio 19, UFSM, Santa Maria-RS, Brazil. Zip code: 90105900. Phone: 55-55-32208163, Fax: 55-55-32208139, Email: ibmcruz@hotmail.com

## ABSTRACT

Resveratrol is an anti-aging molecule that provides both anti-inflammatory and antioxidant properties. However, it is unclear whether the basal oxidative state of the cell has any influence on the effects of this compound. In humans, a single nucleotide polymorphism (SNP) is present in the enzyme manganese superoxide dismutase (SOD2), localized in codon 16 (rs4880), which can either be an alanine (A) or valine (V). This SNP causes an imbalance in the cellular levels of SOD2, where AA- and VV-genotypes result in higher or lower enzymatic activity, respectively. Furthermore, the VV-genotype has been associated with high levels of inflammatory cytokines. Here, we examined the effects of a range of resveratrol concentrations on the *in vitro* activation of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) carrying different Ala16Val-SOD2 genotypes. Cell proliferation (at 24 and 72 h) was analyzed using an MTT assay and several oxidative biomarkers and cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IFT- $\gamma$  and IL-10) were also quantified. In addition, the effects of resveratrol on the expression of the *sirt1* gene were evaluated by qRT-PCR. We show that after 24 h exposure to resveratrol, A-genotype PBMCs displayed a decrease in cell proliferation, whilst VV-cells contrasted this; although after 72 h, cell proliferation was similar in homozygous cells when compared to control groups. At 10  $\mu$ M resveratrol, there was a significant decrease in the production of inflammatory cytokines in A-allele cells; however, VV-cells generally displayed a subtle decrease in these, except for TNF- $\alpha$ , which was not affected. In all SOD2 genotypes cells exposed to resveratrol resulted in an upregulation of Sirt1 levels. Together, these results suggest that the effect of resveratrol on human PBMC activation is not universal and is dependent on the Ala16Val-SOD2 SNP.

**Keywords:** superoxide dismutase manganese-dependent, Sirtuin 1, cytokines, oxidative stress, resveratrol, inflammation.

## INTRODUCTION

Aging can affect the immune system in a number of ways, including several modifications that may lead to hyperresponsiveness, which in an inflammatory context can aggravate degenerative morbidities and trigger autoimmune diseases (Cavagnat *et al.*, 2012). Age-related chronic inflammation is strongly affected by oxidative stress, which causes DNA damage and telomere shortening, leading to impairment of immune cell functions (Cavagnat *et al.*, 2012; Fulop *et al.*, 2014). However, a number of studies have described the action of a group of small molecules that provide both anti-aging and anti-inflammatory properties and are considered to be gero-suppressive agents. One example is resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-*trans*-stilbene); a polyphenol compound found at high concentrations in grapes that displays anticarcinogenic, cardioprotective and neuroprotective properties (Švajger & Jeras, 2012).

The anti-aging function of resveratrol has been linked to its role as a caloric restriction mimetic, where it can activate the expression of gene products such as Sirtuin 1 (silent mating type information regulation 2 homolog 1; Sirt1). Sirt1 is a deacetylase and/or ADP-ribosyltransferase protein that can modulate the effects of energy intake over the lifespan of an organism (Poulsen *et al.*, 2013). In relation to the immune system, previous studies have described the ability of resveratrol to suppress T-cell production, oxidative stress and inflammation processes in a mouse model of high-fat-diet-induced obesity (Wang *et al.*, 2013). The effects of resveratrol on the inhibition of T-cell activation appear to involve an increase in Sirt1 activity (Zou *et al.*, 2013), however, it is unclear whether the metabolic oxidative state of cells has an influence over the anti-inflammatory effects that are linked to this drug. Moreover, understanding these processes are essential since there are a number of factors that can alter basal oxidative metabolism, which could affect the immune cell response to anti-inflammatory compounds, such as resveratrol.

In humans, some people present a basal superoxide anion ( $O_2^{\bullet-}$ ) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) imbalance, which is genetically determined by a single nucleotide polymorphism (SNP) localized in the manganese superoxide dismutase (MnSOD or SOD2) gene. SOD2 is an antioxidant enzyme that represents the major defense against reactive oxygen species (ROS) within the mitochondria, a cellular compartment where there is a continuous production of  $O_2^{\bullet-}$  by the electron transport chain. The SOD2 enzyme catalyzes the dismutation of  $O_2^{\bullet-}$  into  $H_2O_2$ , which in turn is converted into  $H_2O$  by glutathione peroxidase (Dröse *et al.*, 2014). The control of  $O_2^{\bullet-}$  and  $H_2O_2$  concentrations is considered crucial to the cell because at low concentrations ROS can function as intracellular signaling molecules related to homeostatic regulation, whilst at high levels they can cause cellular damage (Holley *et al.*, 2012; Kamiński *et al.*, 2013).

The SNP that causes basal metabolic SOD2 imbalance is located at codon 16 (rs4880) and encodes for either an alanine or valine residue at the – 9 position in the mitochondrial targeting sequence (MTS). The results of an Ala16Val-SOD2 SNP is that the overall  $O_2^{\bullet-}$  scavenging efficiency in the cell is reduced but rather than this being related to enzymatic activity, it is due to defects in its transport into the mitochondria (Shimoda-Matsubayashi *et al.*, 1996). The Ala variant is able to traverse both mitochondrial membranes quickly in order to enter the matrix, whilst most of the Val16 variant remain imbedded within the inner membrane (Sutton *et al.*, 2005). This manifests itself as an imbalance in  $O_2^{\bullet-}$  and  $H_2O_2$  levels in mitochondria and several studies have described an association between an A-allele and AA-genotype with several types of cancer. On the other hand, other investigations have described an association between a V-allele and VV-genotype with metabolic morbidities such as hypercholesterolemia, obesity, cardiovascular dysfunction and diabetes complications (Bresciani *et al.*, 2013a). However, these Ala16Val-SOD2 SNP derived outcomes are influenced by en-

vironmental factors such as dietary antioxidant intake and exercise (Ambrosone *et al.*, 1999; Bresciani *et al.*, 2013b).

Previous *in vitro* investigations using samples of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from carriers of Ala16Val-SOD2 genotypes showed that this polymorphism has an influence on the viability, antioxidant and inflammatory responses to hepatocytes cryopreservation (Martin *et al.*, 2009), exposure to ultraviolet radiation and methylmercury (dos Santos Montagner *et al.*, 2010; Algarve *et al.*, 2013), elevated glucose/insulin levels (Montano *et al.*, 2012) and a number of drugs such as clomiphene citrate (Costa *et al.*, 2012) and methotrexate (Barbisan *et al.*, 2014). In this study we have examined the impact of resveratrol on the activation of human PBMCs carrying different Ala16Val-SOD2 genotypes evaluating its effect on cell proliferation, oxidative stress biomarkers and on Sirt1 expression.

## **MATERIAL AND METHODS**

***Volunteers and Ala16Val-SOD2 SNP genotyping.*** The study described here is associated with a research project that was previously approved by the Ethics Committee at the Universidade Federal de Santa Maria, Brazil. A total of 120 volunteers ( $27.4 \pm 7.8$  years old) were enrolled and we obtained consent from all blood cell donors. Subjects that were grouped as non-smokers and not obese did not present previous non-transmissible diseases, chronic use of medication or vitamin supplements and other dysfunctions that could influence oxidative metabolism and *sirt1* gene expression. Blood samples were collected by venipuncture in EDTA tubes from this group and the Val16Ala polymorphism group. Ala16Val-SOD2 genotyping was performed as described by Barbisan *et al.* (2014) using a Phusion High-Fidelity PCR kit (Thermo Scientific CO) to access genomic DNA and amplify the *SOD2* gene segment by tetra-primer ARMS-PCR analysis: Primer F1 (forward): CACCAGCACTAGCAG-

CATGT; F2 (forward): GCAGGCAGCTGGCTACGGT; R1 (reverse): ACGCCTCCTGG-TACTTCTCC; R2 (reverse): CCTGGAGCCCAGATACCCTAAAG.

The PCR reaction was carried out in a total volume of 40  $\mu$ l containing 20–40 ng of genomic DNA template, 0.5  $\mu$ M of each primer, 100  $\mu$ M dNTP mix, 1.25 mM MgCl<sub>2</sub>, PCR buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl), 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) and 1.25 U of DNA polymerase. The PCR amplification was carried out with an initial denaturation at 94°C for 7 min, followed by 35 cycles of 60 s at 94°C (denaturation), 20 s at 60°C (annealing), and 30 s at 72°C (extension), with an additional 7 min of extension at 72°C at the end of the final cycle. A 20  $\mu$ l aliquot of the PCR product was mixed with 6  $\mu$ l of loading buffer and resolved by electrophoresis in a 1.5% agarose gel. This procedure resulted in three bands in heterozygotes (514, 366, and 189 bp) and two bands in homozygotes (Val/Val resulting in bands of 514 and 189 bp, and Ala/Ala resulting in bands of 514 and 366 bp). The SOD2 genotype frequencies were the following: AA, 26.7%; VV, 28.2%; and AV, 45.1%. We performed calculations to assess any deviations from the Hardy–Weinberg equilibrium, used to assess the chi-squared goodness-of-fit, which showed that the samples were in genetic equilibrium.

***PBMC cultures and resveratrol treatment.*** A randomized sub-sample of volunteers were selected to obtain blood samples to perform the *in vitro* experimentation as described previously by Algarve *et al.* (2013), with slight modifications. The fasting blood collections were obtained from 5–6 volunteers each with Ala16Val-SOD2 genotypes. To carry out all remaining protocols, blood samples were collected from 12 volunteers. The volunteers were asked to avoid the consumption of antioxidant-containing foods (e.g. salads, fruits and natural/manufactured juices) 24 h prior to each blood collection. Blood samples were collected by venous puncture into grey and red top Vacutainer tubes with heparin (5 ml) and PBMCs were obtained within 1 h of collection using Histopaque (Hp) density gradient medium centrifuged for 15 min at 2,500 g. The PBMCs were counted in a Neubauer chamber using Trypan exclu-

sion dye and  $1 \times 10^6$  PBMCs were cultured in RPMI 1630 culture medium with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 24 h. After this period, the supernatant containing PBMCs was collected and transferred into the same culture medium with the addition of phytohemagglutinin (PHA) mitogen, used to trigger lymphocyte cell division. Concomitantly these cells ( $1 \times 10^5$  concentration) were distributed in a 96-well plate with and without a range of resveratrol concentrations. The effect of resveratrol on PBMC activation was determined by analysis of the cellular proliferation of PBMCs carrying different SOD2 genotypes after 24 and 72 h. To discard possible cytotoxic effects of resveratrol on the cells, we also performed an analysis of cellular mortality and oxidative stress biomarkers after 24 h. Over the same period we also determined the levels of the following cytokines involved in inflammation pathways: interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interferon gamma (IFT- $\gamma$ ) and interleukin 10 (IL-10). The effect of resveratrol on gene (*sirt1*) and protein (Sirt1) expression was also evaluated. The protocols used to perform these analyses are described below.

**Cellular proliferation assay.** Cellular proliferation was evaluated using a colorimetric MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay, confirmed by flux cytometry analysis (Mosmann *et al.*, 1983). The MTT assay measures the level of NAD(P)-H-dependent cellular oxidoreductase enzymes, which reflects the number of viable cells. After the incubation period, cells were stained for 1 h at 37°C with 20  $\mu$ l/well MTT reagent (10% concentration) and 5 mg/ml in PBS. Then 100  $\mu$ l of DMSO was added per well to solubilize the purple formazan crystals that were produced. The absorbance of each well was measured at 570 nm and results were expressed as the average percentage of concentration compared to the control.

**Cellular viability assay.** To evaluate the potential cytotoxic or cytoprotective effects of resveratrol on PBMC activation, the concentration of free double stranded DNA (dsDNA) in

cell culture was measured using a specific fluorochrome dye DNA Picogreen®. This creates a highly stable complex with dsDNA in alkaline conditions but not with single stranded DNA (ssDNA), proteins, SDS or urea. This selective characteristic can be used to identify dsDNA free in culture medium and indicates cellular death. The test was performed as previously described by Parra *et al.* (2012). Briefly, the cell medium was centrifuged at 2,500 g for 10 min and the supernatant was collected and used to perform the test. The dsDNA was measured using 50 µl of the sample and 50 µl of the DNA Picogreen® dissolved in TE buffer, 1X (1:1; v/v), following by incubation for 5 min in the dark. Fluorescence was measured at an excitation of 485 nm and an emission of 520 nm at room temperature (SpectraMax M2/M2e Multimode Plate Reader, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA). Results were expressed as a percentage of dsDNA calculated for each treatment in relation to the untreated control samples. Values below 100% indicated a decrease and values above 100% indicate an increase in the mortality of cells when compared to the control group.

***Oxidative metabolism parameters.*** The ROS and lipoperoxidation levels of PBMCs after 24 and 72 h of supplementation with resveratrol were determined. The ROS levels were determined by dichlorofluorescein acetate fluorimetric assay (DCF-DA) (Halliwell & Whiteman, 2004) with fluorescence measured at an excitation of 485 nm and an emission of 520 nm. Lipoperoxidation was estimated by the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) measured by spectrophotometry as described by Jentzsch *et al.* (1983). All measurements were performed in triplicate and the results are presented as a percentage compared to the untreated control group.

***Cytokines and Sirt1 protein quantification.*** The inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IFT- $\gamma$ , anti-inflammatory cytokine IL-10 and Sirt1 were quantified with an immunological test, using a Sirt1 Human sandwich ELISA kit (ab123457), according to the manufacturer's instructions (ABCAN, Technology, San Diego, CA). The results were expressed as a percent-

age compared to the untreated control group of each Ala16Val-SOD2 genotype, as previously described in Montano *et al.* (2012).

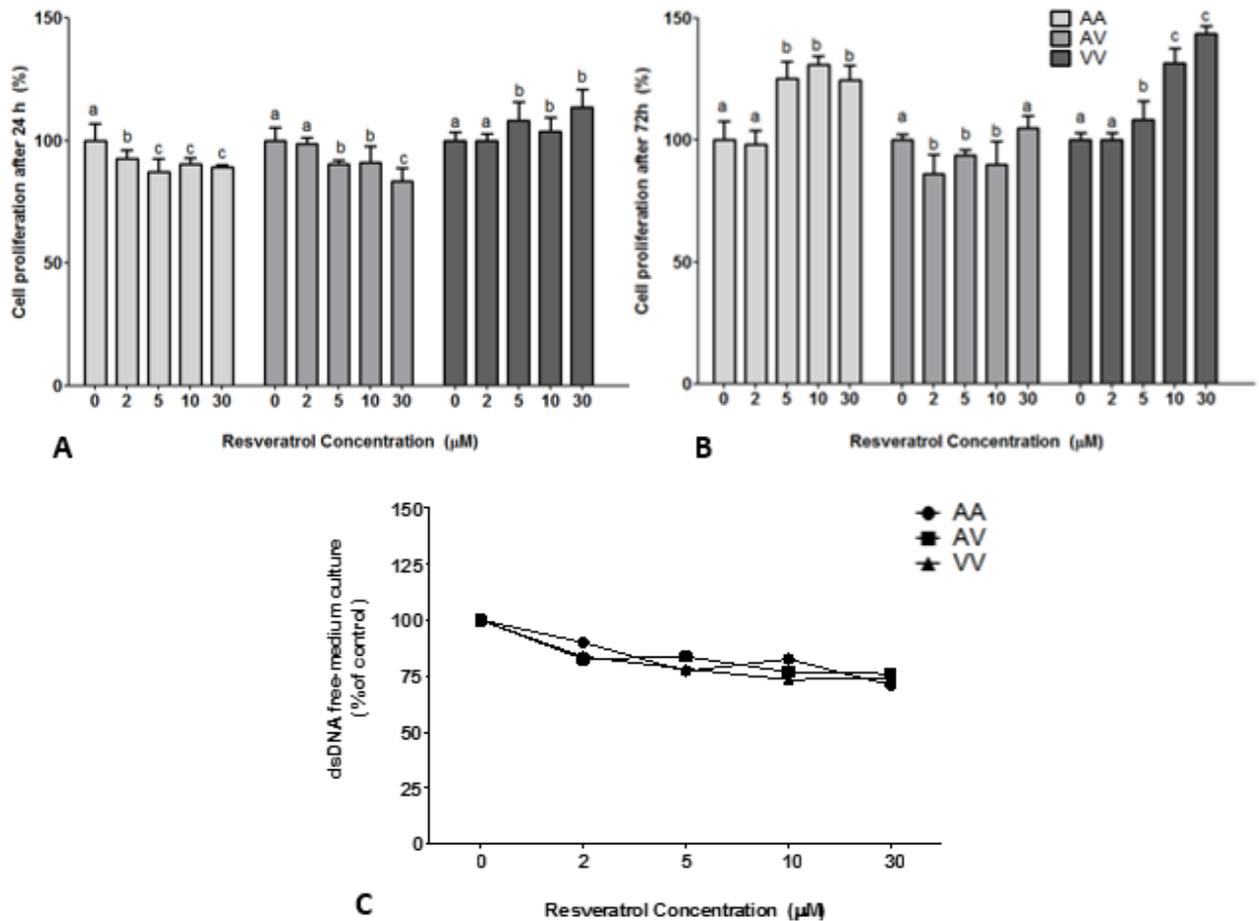
***Analysis of sirt1 gene and Sirt1 protein expression.*** RNA was extracted using Trizol reagent and the quantity and purity was analyzed using a NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, Del., USA). A ratio of  $A_{260/280}$  of 1.9–2.1 signified a pure RNA sample. Single stranded cDNA was synthesized using an iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). The *sirt1* gene expression was evaluated by real-time polymerase chain reaction (PCR) performed with a StepOne Real Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA) with the SYBR Green detection method. PCR primers for *sirt1* and  $\beta$ -actin (a house-keeping gene) were designed by Primer Express 3 software (Applied Biosystems) and purchased from Metabion. The relative expression was calculated using the comparative Ct and was expressed as the fold expression compared to the control. The specific primer pairs used in this study were: *sirt-1* Forward ACAGGTTGCGGGAATCCAA and Reverse TCG-TACAGCTTCACAGTCAACTTTG and  $\beta$ -actin Forward TGTGGATCAGCAAGCAGGAGTA and Reverse TGCGCAAGTTAGGTTTTGTCA (Aleman *et al.*, 2009). The PCR reactions were performed as follows: PCR proceeded in special optical tubes in 96-well reaction plates (MicroAmp Optical, ABI, Foster City, Calif., USA) with 10  $\mu$ l of Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.5  $\mu$ l forward primer, 0.5  $\mu$ l reverse primer, 2  $\mu$ l cDNA template and made up to 20  $\mu$ l in DEPC treated water. The wells were sealed with optical adhesive film (Applied Biosystems) and the plate was centrifuged for several seconds 250 g. Amplification was performed using the standard two-step run protocol: 95°C for 3 min followed by 40 cycles of 95°C for 10 s, 60°C for 30 s and a melt curve of 65–95°C in 0.5°C increments for 5 s. For each gene, mRNA expression levels were normalized to the level of  $\beta$ -actin mRNA. The fold change in gene expression was computed using the comparative Ct ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) method.

**Statistical analysis.** The data were analyzed by GraphPad Prism software by two-way analysis of variance followed by *post hoc* Bonferroni test. A p value  $\leq 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

Whilst the activation of PBMCs by PHA was affected by resveratrol treatment, the results were significantly influenced by Ala16Val-SOD2 genotypes. After 24 h the proliferation rate decreased significantly in AA-cells treated with all resveratrol concentrations when compared to untreated control (Fig. 1A). Cells carrying a heterozygous genotype showed a decrease in cell proliferation just in the high resveratrol concentrations tested here (10 and 30  $\mu\text{M}$ ). In contrast to AA- and AV-genotypes, cells carrying the VV-genotype did not show any significant differences in proliferation rate when they were exposed to resveratrol at 2 and 5  $\mu\text{M}$ , but they did present a significant increase in cell proliferation when exposed to resveratrol at 10 and 30  $\mu\text{M}$ . After 72 h incubation, resveratrol caused a higher cellular proliferation in Ala16Val-SOD2 homozygous genotypes (AA and VV) at  $\geq 5$   $\mu\text{M}$ . The AV-cells displayed a decrease in proliferation when exposed to 2, 5 and 10  $\mu\text{M}$  resveratrol; however, higher concentrations (30  $\mu\text{M}$ ) did not affect cellular proliferation when compared to the untreated control group (Fig. 1B).

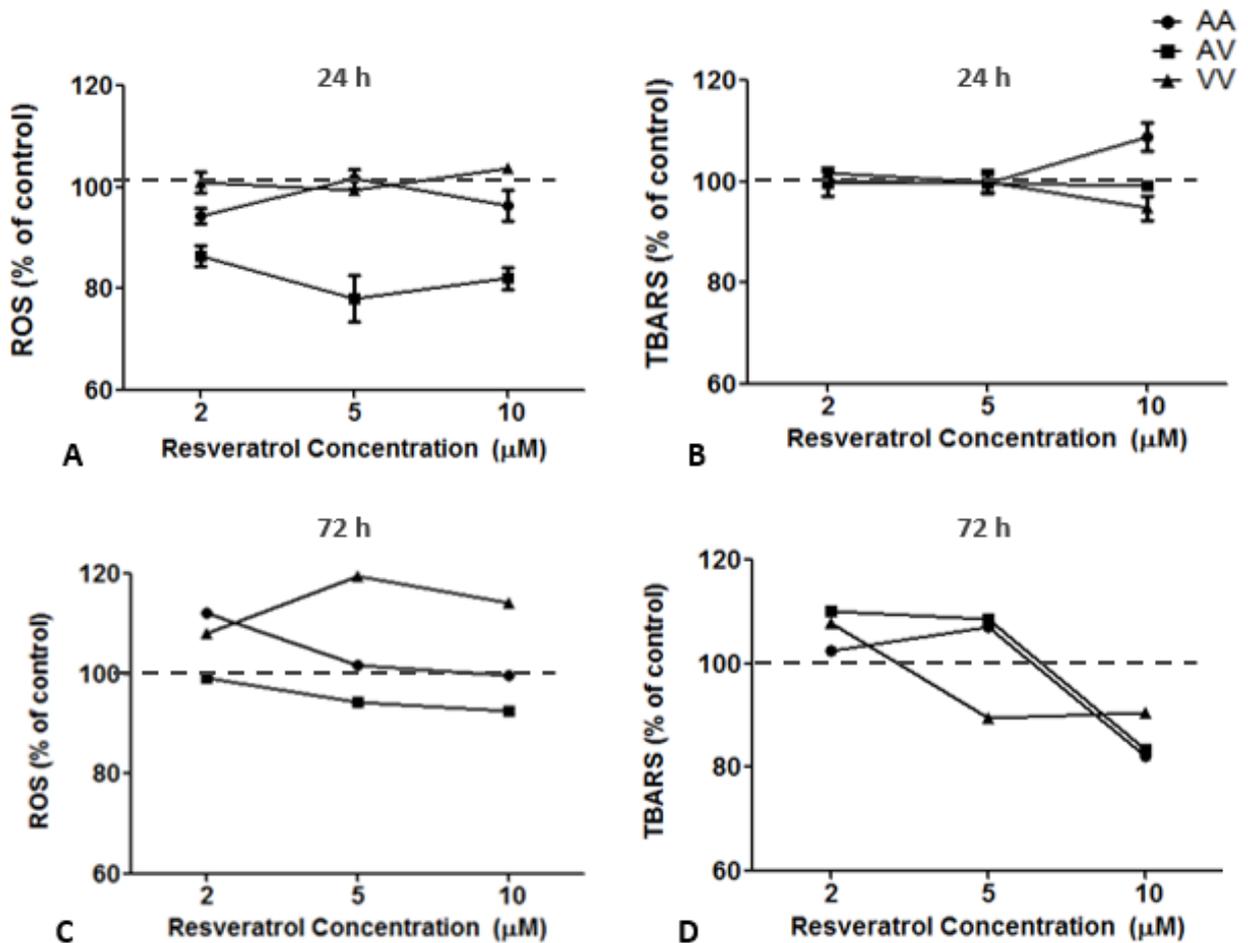
A complementary assay that monitors free dsDNA levels present in culture medium was performed to evaluate whether resveratrol could affect cell viability within the first 24 h of exposure (Fig. 1C). The results show a significant decrease in dsDNA levels in cells exposed to resveratrol when compared to the untreated control groups, which indicates that resveratrol has a cytoprotective effect. However, this result was independent of the Ala16Val-SOD2 SNP and was detected in all concentrations of resveratrol tested here.



**Figure 1 - Resveratrol effect on human PBMC carrier's different Ala16Val-SOD2 genotypes (AA, VV and AV). (A) Cell proliferation after 24 h and (B) 72 h exposition evaluated by MTT assay. Double-strand DNA degradation of cells exposed to different resveratrol concentrations evaluated by fluorimetry using DNA Picogreen dye. Different letters indicated statistical differences analyzed by One-way analysis of variance followed by Tukey post hoc test. Significance was considered when  $p \leq 0.05$ .**

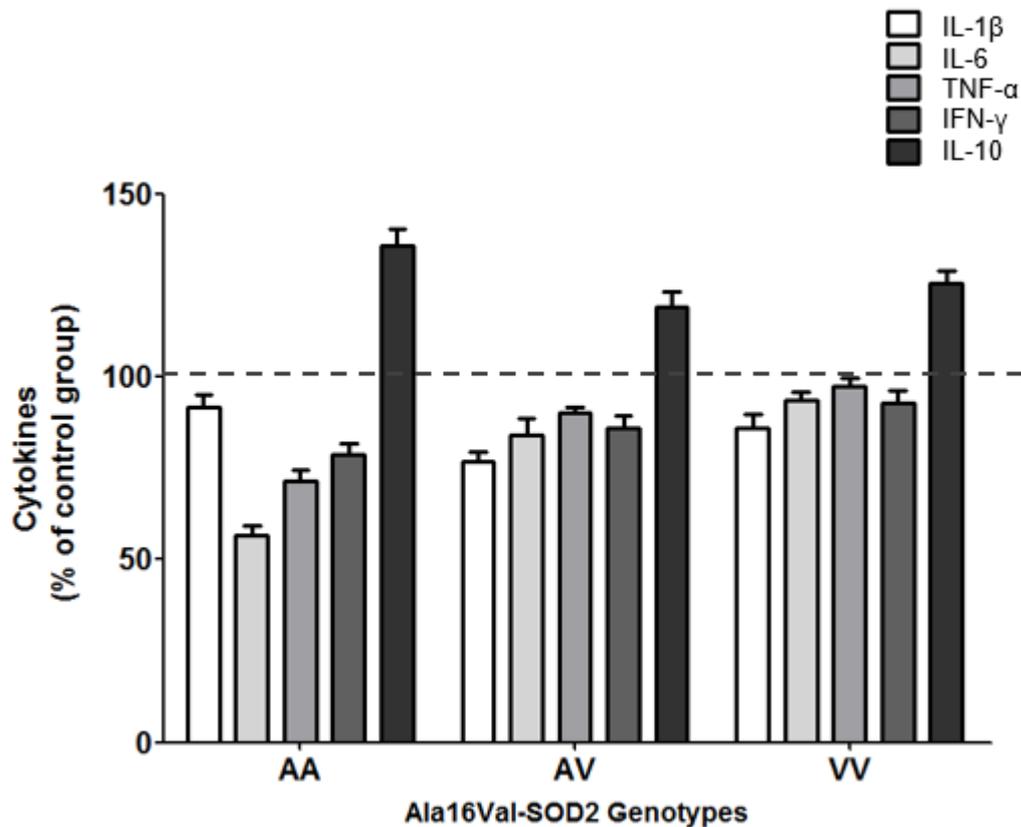
The effects of resveratrol on the levels of ROS and lipoperoxidation in activated PBMCs are shown in Figure 2. After 24 h of PBMC activation, AV-cells exposed to resveratrol at all concentrations presented lower ROS levels when compared to the untreated control group (Fig. 2A). However, when AA- and VV-cells were exposed to resveratrol concentrations of 2 and 5  $\mu\text{M}$ , the observed ROS levels were similar to those in the control group. Lipoperoxidation evaluated by TBARS levels after 24 h of exposure to resveratrol also showed a dependence on the Ala16Val-SOD2 SNP (Fig. 2B). Whereas AV-cells exposed to resveratrol did not present differences in TBARS levels compared with AV-untreated cells, at 10  $\mu\text{M}$  resveratrol, TBARS levels were significantly decreased for VV-cells, whereas the opposite was observed for AA-cells.

The ROS and lipoperoxidation levels were also evaluated after 72 h (Fig. 2C). Whilst AV-cells, as measured at 24 h, presented low levels of ROS when treated with 5 and 10  $\mu$ M resveratrol, both homozygous Ala16Val-SOD2 cells presented an increase in ROS levels when exposed at low resveratrol concentrations (2  $\mu$ M). However, whereas we observed a decrease in ROS levels in AA-cells in the presence of 5 and 10  $\mu$ M resveratrol, VV-cells displayed a significant increase in ROS levels at the same concentrations. At low resveratrol concentration (2  $\mu$ M), an increase of TBARS levels was observed in all PBMCs independent of the SOD2 genotype. In contrast, in A-allele cells (AA and AV) high TBARS levels were also observed in samples treated with 5  $\mu$ M resveratrol, whilst VV-cells showed lower levels when compared to the VV-control group. However, at the higher resveratrol concentration tested here, TBARS levels also significantly decreased in A-allele cells when compared to the untreated control groups.



**Figure 2 - Resveratrol effect on human PBMC carrier's different Ala16Val-SOD2 genotypes (AA, VV and AV) on reactive oxygen species evaluated by DCF-H fluorimetry assay and lipoperoxidation evaluated by TBARS-MDA quantification. A and B = levels after 24 h exposition; C and D= levels after 72 h exposition.**

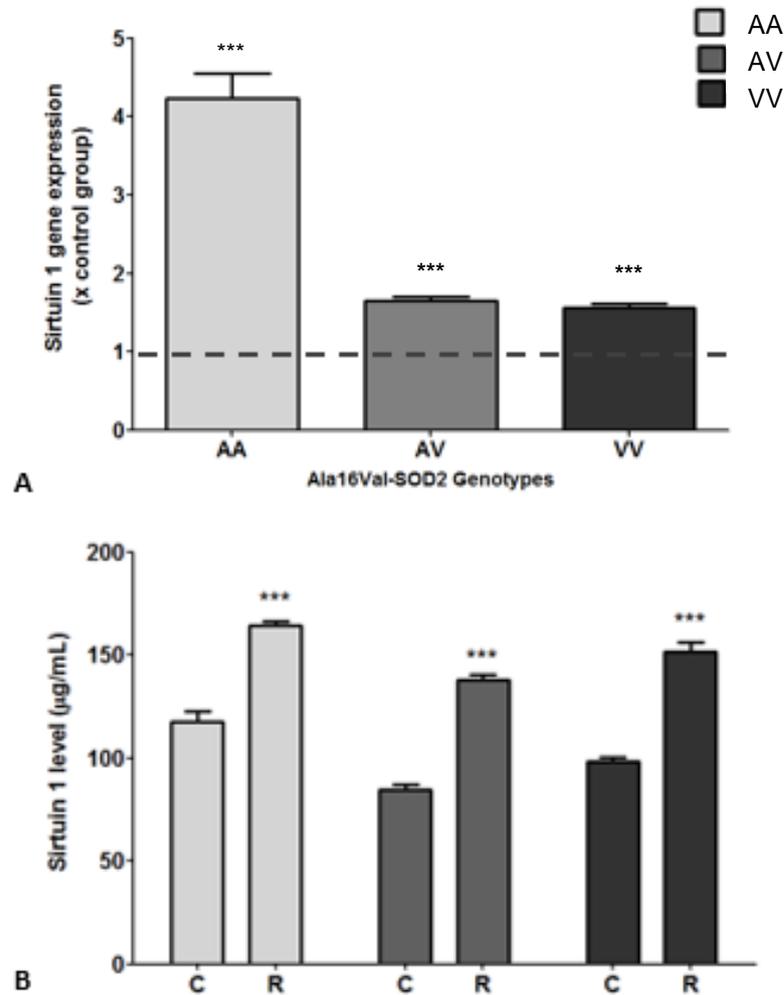
We next examined the effect of resveratrol (10 μM) on cytokine and Sirt1 expression. Resveratrol significantly decreased the inflammatory cytokines in A-allele-carrying PBMCs (Fig. 3); however, the anti-inflammatory effect of resveratrol was more evident in AA-PBMCs. In VV-cells compared to the untreated VV-control group, resveratrol did not significantly decrease the level of TNF- $\alpha$ , although it did have a mild effect on the levels of other inflammatory cytokines. Resveratrol did, however, significantly increase the levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 independent of the Ala16Val-SOD2 SNP.



**Figure 3 - Cytokine levels of PBMC carrier's different Ala16Val-SOD2 genotypes after 24 h exposition of 10  $\mu$ M resveratrol. Results are presented as percentage of untreated control group (represented by dashed line on the graph) evaluated by Elisa immunoenzymatic assay.**

The effect on *sirt1* gene and Sirt1 protein expression in PBMCs exposed to 10  $\mu$ M resveratrol was also evaluated. As is evident in Figure 4A, *sirt1* is upregulated by resveratrol independently of the Ala16Val-SOD2 genotype, however, this was more intense in AA-cells compared with cells carrying the V-allele. Furthermore, after 24 h exposure to resveratrol, Sirt1 protein levels (Fig. 4A) are in line with *sirt1* gene activation in all PBMCs, independent of Ala16Val-SOD2 genotypes. In relation to the untreated control group (100%), AA-cells present Sirt1 levels at 163%, VV-cells at 154% and AV-cells at 139%. This suggests that AA-

cells are more responsive to resveratrol, leading to increased upregulation and higher protein levels of Sirt1 in this compared to the other Ala16Val-SOD2 genotypes.



**Figure 4 - Resveratrol effects Sirtuin 1 mRNA and protein levels of PBMC carrier's different Ala16Val-SOD2 genotypes. C= control, R= resveratrol at 10  $\mu$ M concentration. Results are presented as fold of untreated control group (represented by dashed line on the graph). The results were compared by Student T test. \*\*\* =  $p < 0.01$ .**

## DISCUSSION

In general, our results corroborate previous investigations describing the inhibition of immune cell proliferation, decrease in inflammatory cytokine production (Fulop *et al.*, 2014) and upregulation of *sirt1* gene expression (Hori *et al.*, 2013) by resveratrol. However, to our

knowledge we show for the first time that these effects on human PBMC activation are apparently not universal but influenced by the oxidative metabolic status of the cell associated with SOD2 enzymatic function. Studies performed by Kamiński *et al.* (2013) suggest that the SOD2 enzyme constitutes an important control switch in the process of activation-induced oxidative signal generation in T-cells. The authors observed that SOD2 overexpression triggers T-cell activation. It is therefore plausible to infer that cells with differential SOD2 efficiency may provide differential responses to molecules that act on PBMC activation.

It is generally accepted that the SOD2 enzyme is essential for the survival of cells under aerobic conditions. Here oxidative phosphorylation is used to generate energy for metabolism from ATP production and generates  $O_2^{\bullet-}$  as a sub-product (Holley *et al.*, 2010; Kamiński *et al.*, 2013). Other investigations have estimated that during normal respiration the  $O_2^{\bullet-}$  concentrations in mitochondria can reach pM concentrations (Dhar & St Clair, 2012). However, the control of  $O_2^{\bullet-}$  levels by SOD2 needs to be finely regulated: low SOD2 efficiency can increase  $O_2^{\bullet-}$  levels, whereas high SOD2 efficiency can increase  $H_2O_2$  levels. Moreover, both of these situations can cause oxidative stress, potential cellular damage (Cavagnat *et al.*, 2012) and have differential effects on the immune system. In fact, the proliferation of AV-PBMCs decreased in the presence of resveratrol treatments in a similar way as described in previous studies using immune cells as an experimental model (Wu *et al.*, 2006; Halicka *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Zou *et al.*, 2013). However, these results were not the same in homozygous carrier cells suggesting that there may be a pharmacogenetic effect of Ala16Val-SOD2 in PBMC activation when exposed to resveratrol.

We show here that AA-allele high efficiency SOD2 cells display greater responsiveness to T-cell lymphocyte inhibition when treated with resveratrol. These cells also show a decrease in inflammatory cytokines and ROS levels. However, after 72 h this effect is totally reverted and at  $\geq 5 \mu M$  resveratrol concentrations cell proliferation in AA-cells increased sig-

nificantly when compared to the untreated control group. In VV low-efficiency SOD2 cells, supplementation with resveratrol ( $\geq 5 \mu\text{M}$ ) in culture medium stimulated cellular proliferation after 24 and 72 h at the same concentrations as was also observed in VV-cells. Although resveratrol decreased the levels of some inflammatory cytokines in VV-cells, this effect was less evident in A-allele carriers. These results corroborate previous investigations that describe high levels of inflammatory cytokines in VV-allele PBMCs when compared to A-allele PBMCs (Montano *et al.*, 2012) indicating that VV-cells were more resistant to antioxidant and anti-inflammatory molecules such as resveratrol. In contrast, the effect of resveratrol in AA-cells appears to be transient, precipitating a reversion in T-cell activation response after 72 h of exposure.

Despite these differences, resveratrol treatment was able to activate Sirt1 in PBMCs, independent of the Ala16Val-SOD2 SNP, although this effect is more evident in AA-cells. There is evidence that Sirt1 can preserve mitochondrial function of non-immune cells, such as cardiomyocytes, attenuating myocardial oxidative damage during ischemia reperfusion involving SOD2 upregulation (Tanno *et al.*, 2010). As *sirt1* expression is upregulated in all Ala16Val-SOD2 genotypes in response to resveratrol, differences in the PBMC proliferative response are likely a consequence of  $\text{O}_2\cdot^-$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  imbalance found in SOD2 homozygous genotypes. These may either be not fully reverted by Sirt1 gene regulation or are a direct antioxidant effect of resveratrol.

Whilst a consistent number of studies have associated the Ala16Val-SOD2 SNP with chronic diseases and biological dysfunctions, there are a number of inconsistent results that may be due to environmental factors such as dietary and physical activity (Bresciani *et al.*, 2013a). Unfortunately, epidemiological investigations do not permit the isolation and control of the contributions of environmental variables in genetic studies. For this reason, the use of Ala16Val-SOD2 SNP as a model to investigate the impact of constitutive oxidative metabolic

imbalance in response to pharmacological and nutritional molecules under *in vitro* controlled conditions can be considered relevant. However, only recently have investigations been performed using *in vitro* genetic-models to analyze the effect of stressor agents such as cryopreservation, UV radiation, elevated levels of glucose/insulin and the effects of pharmacological drugs on cytotoxicity, oxidative stress and inflammatory biomarkers (Martin *et al.*, 2009; dos Santos Montagner *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2012; Montano *et al.*, 2012; Barbisan *et al.*, 2014). In all studies presented so far, the cellular response shows some differential effect related to  $O_2^{\bullet-}$  and  $H_2O_2$  imbalance found in AA- and VV-genotypes.

In this study, we tested for the first time the effect of an antioxidant and recognized anti-aging molecule, resveratrol, on cells carrying different SOD2 genotypes. Despite the occurrence of some methodological limitations related to *in vitro* studies and the low number of volunteers used to perform these experiments, we conclude that the effects of resveratrol on human PBMCs is not universal. Complementary *in vivo* pharmacogenetic investigations evaluating the resveratrol effect on immunological biomarkers could help us to validate the results presented here and confirm any impact this data has on human physiology.

## REFERENCES

- Algarve, T. D., Barbisan, F., Ribeiro, E. E., Duarte, M. M., Mânica-Cattani, M. F., Mostardeiro, C. P., Lenz, A. F. & da Cruz, I. B. (2013) *In vitro* effects of Ala16Val manganese superoxide dismutase gene polymorphism on human white blood cells exposed to methylmercury. *Genet. Mol. Res.*, 12, 5134-5144.
- Ambrosone, C. B., Freudenheim, J. L., Thompson, P. A., Bowman, E., Vena, J. E., Marshall, J. R., Graham, S., Laughlin, R., Nemoto, T. & Shields, P. G. (1999) Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants and risk of breast cancer. *Cancer Res.*, 59, 602-606.

Barbisan, F., Motta, J. R., Trott, A., Azzolin, V., Dornelles, E. B., Marcon, M., Algarve, T. D., Duarte, M. M., Mostardeiro, C. P., Unfer, T. C., Schott, K. & Da Cruz, I. B. (2014) Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism. *Plos One*, 2014 (ahead pub).

Bresciani, G., Cruz, I. B., de Paz, J. A., Cuevas, M. J. & González-Gallego, J. (2013a) The MnSOD Ala16Val SNP: relevance to human diseases and interaction with environmental factors. *Free. Radic. Res.*, 47, 781-792.

Bresciani, G., González-Gallego, J., da Cruz, I. B., de Paz, J. A. & Cuevas, M. J. (2013b) The Ala16Val MnSOD gene polymorphism modulates oxidative response to exercise. *Clin. Biochem.*, 46, 335-340.

Cavagnat, M. M., Weyand, C. M. & Goronzy, J. J. (2012) Chronic inflammation and aging: DNA damage tips the balance. *Curr. Opin. Immunol.* 24, 488-493.

Costa, F., Dornelles, E., Mânica-Cattani, M. F., Algarve, T. D., Souza Filho, O. C., Sagrillo, M. R., Garcia, L. F. & Cruz, I. B. (2012) Influence of Val16Ala SOD2 polymorphism on the *in vitro* effect of clomiphene citrate in oxidative metabolism. *Reprod. Biomed. Online*, 24, 474-481.

Dhar, S. K. & St Clair, D. K. (2012) Manganese superoxide dismutase regulation and cancer. *Free Radic. Biol. Med.*, 52, 2209-2222.

dos Santos Montagner, G. F., Sagrillo, M., Machado, M. M., Almeida, R. C., Mostardeiro, C. P., Duarte, M. M. & da Cruz, I. B. (2010) Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. *Toxicol. In Vitro*, 24, 1410-1416.

- Dröse, S., Brandt, U. & Wittig, I. (2014) Mitochondrial respiratory chain complexes as sources and targets of thiol-based redox-regulation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1844, 1344-1354.
- Fulop, T., Le Page, A., Fortin, C., Witkowski, J. M., Dupuis, G. & Larbi, A. (2014) Cellular signaling in the aging immune system. *Curr. Opin. Immunol.*, 29C, 105-111.
- Halicka, H. D., Zhao, H., Li, J., Lee, Y. S., Hsieh, T. C., Wu, J. M. & Darzynkiewicz, Z. (2012) Potential anti-aging agents suppress the level of constitutive mTOR- and DNA damage-signaling. *Aging (Albany NY)*, 4, 952-965.
- Halliwell, B. & Whiteman, M. (2004) Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.*, 142, 231-255.
- Holley, A. K., Dhar, S. K., Xu, Y. & St Clair, D. K. (2012) Manganese superoxide dismutase: beyond life and death. *Amino Acids*, 42, 139-158.
- Hori, Y. S., Kuno, A., Hosoda, R. & Horio, Y. (2013) Regulation of FOXOs and p53 by SIRT1 modulators under oxidative stress. *Plos One*, 11, e73875.
- Jentzsch, A. M., Bachmann, H., Fürst, P. & Biesalski, H. K. (1983) Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic. Biol. Med.*, 20, 251-256.
- Kamiński, M. M., Röth, D., Krammer, P. H. & Gülow, K. (2013) Mitochondria as oxidative signaling organelles in T-cell activation: physiological role and pathological implications. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 61, 367-384.
- Martin, R. C., Li, Y., Liu, Q., Jensen, N. S., Barker, D. F., Doll, M. A. & Hein, D. W. (2009) Manganese superoxide dismutase V16A single-nucleotide polymorphism in the mitochondrial

targeting sequence is associated with reduced enzymatic activity in cryopreserved human hepatocytes. *DNA Cell. Biol.*, 28, 3-7.

Montano, M. A., da Cruz, I. B., Duarte, M. M., Krewer, Cda. C., da Rocha, M. I., Mânica-Cattani, M. F., Soares, F. A., Rosa, G., Maris, A. F., Battiston, F. G., Trott, A. & Lera, J. P. (2012) Inflammatory cytokines in vitro production are associated with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism of peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine*, 60, 30-33.

Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63.

Parra, J. M., Sánchez-Fortún, S. & Castaño, A. (2012) Assessment of genotoxic effects induced by selected pesticides on RTG-2 fish cells by means of a modified fast micromethod assay. *Environ. Toxicol.*, 27, 238-243.

Poulsen, M. M., Jørgensen, J. O., Jessen, N., Richelsen, B. & Pedersen, S. B. (2013). Resveratrol in metabolic health: an overview of the current evidence and perspectives. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1290, 74-82.

Shimoda-Matsubayashi, S., Matsumine, H., Kobayashi, T., Nakagawa-Hattori, Y., Shimizu, Y., Shimizu, Y. & Mizuno, Y. (1996) Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 226, 561-565.

Sutton, A., Imbert, A., Igoudjil, A., Descatoire, V., Cazanave, S., Pessayre, D. & Degoul, F. (2005) The manganese superoxide dismutase Ala16Val dimorphism modulates both mitochondrial import and mRNA stability. *Pharmacogenet. Genomics*, 15, 311-319.

Švajger, U. & Jeras, M. (2012) Anti-inflammatory effects of resveratrol and its potential use in therapy of immune-mediated diseases. *Int. Rev. Immunol.*, 31, 202-222.

Tanno, M., Kuno, A., Yano, T., Miura, T., Hisahara, S., Ishikawa, S., Shimamoto, K. and Horio, Y. (2010) Induction of manganese superoxide dismutase by nuclear translocation and activation of SIRT1 promotes cell survival in chronic heart failure. *J. Biol. Chem.*, 285, 8375-8382.

Wang, B., Sun, J., Li, X., Zhou, Q., Bai, J., Shi, Y. & Le, G. (2013) Resveratrol prevents suppression of regulatory T-cell production, oxidative stress and inflammation of mice prone or resistant to high-fat diet-induced obesity. *Nutr. Res.*, 33, 971-981.

Wu, S. L., Yu, L., Jiao, X. Y., Meng, K. W. & Pan, C. E. (2006) The suppressive effect of resveratrol on protein kinase C theta in peripheral blood T lymphocytes in a rat liver transplantation model. *Transplant. Proc.*, 38, 3052-3054.

Zou, T., Yang, Y., Xia, F., Huang, A., Gao, X., Fang, D., Xiong, S. & Zhang, J. (2013) Resveratrol inhibits CD4+ T-cell activation by enhancing the expression and activity of Sirt1. *Plos One*, 20, e75139.

## 4 DISCUSSÃO

Os resultados aqui descritos corroboraram investigações anteriores que descrevem o efeito anti-inflamatório do RES via inibição da proliferação de CMSPs, diminuição dos níveis das citocinas inflamatórias (FULOP et al., 2014) e a super regulação da expressão SIRT 1 e aumento na concentração citoplasmática desta proteína (HORI et al., 2013). No entanto, o presente estudo relata pela primeira vez efeito farmacogenético na ação do RES indicando que a intensidade da ação anti-inflamatória desta molécula não é universal, mas sim fortemente dependente do estado metabolismo oxidativo associado com a função enzimática da SOD2.

A potencial interação entre o RES e a enzima SOD2 tem sido relatada em estudos prévios. Ungvari e colaboradores (2009) mostraram um aumento na expressão da SOD2 provocado pelo RES, ao verificar se o mesmo atenua a produção de espécies reativas de oxigênio mitocondriais em células endoteliais de artérias coronárias humanas.

Nesse mesmo ano, Danz e colaboradores (2009), avaliaram o papel protetor do RES sobre a morte de cardiomiócitos induzida pela doxorrubicina (DOX), um importante agente quimioterápico. Os resultados observados mostraram que o tratamento com RES inibiu a produção de EROs nas mitocôndrias das células cardíacas ocasionadas pela doxorrubicina e isso provavelmente devido a um aumento na atividade da SOD2 (DANZ et al., 2009). Fukui e colaboradores (2010) mostraram aumento da SOD2 estimulado pelo RES em células neuronais do hipocampo. Nos estudos realizados por Kairisalo e colaboradores (2011), mostraram que o RES reduz o estresse oxidativo e aumenta a sobrevivência das células feocrocitomas e aumenta os níveis de SOD2.

Em 2011, Jackson e colaboradores, ao administrar uma suplementação dietética de longo prazo com RES em ratos jovens, de meia-idade e idosos, pesquisaram a capacidade de RES em reduzir o estresse oxidativo induzido pelo envelhecimento e proteger contra a Sarcopenia, uma síndrome caracterizada pela perda progressiva e generalizada da força e massa muscular, que ocorre em consequência do envelhecimento. Os dados mostraram que o RES aumentou a SOD2 e reduziu os níveis de  $H_2O_2$  e de peroxidação lipídica em amostras de músculo (JACKSON et al., 2011). Xu e colaboradores (2012) ao analisar o RES, observaram efeito protetor na mitocôndria exposta a hiperglicemia, induzida por dano oxidativo. Este efeito estava associado a ativação do gene da SIRT 1.

Recentemente, Chang e colaboradores (2014) investigaram em seus estudos a via de

sinalização metabólica e o efeito antioxidante do RES nos músculos esqueléticos de contração rápida e lenta em ratos com diabetes. Sugerindo que o tratamento com RES no músculo diabético de contração lenta elevou a atividade da SOD2.

Estudos realizados por Kaminski e colaboradores (2013) sugeriram que a enzima da SOD2 constitui um importante interruptor no controle do processo de geração de sinais oxidativos induzido por ativação em linfócitos T. Neste caso, os autores observaram que a super expressão da SOD2 induziu a ativação dos linfócitos T. Portanto, é plausível inferir que as células com diferentes eficiências da SOD2 poderiam apresentar diferentes respostas à moléculas que atuam na ativação das CMSPs. Como já foi previamente comentado, a enzima SOD2 é essencial para a sobrevivência de células aeróbias, as quais utilizam fosforilação oxidativa para gerar energia para o metabolismo a partir da produção de ATP gerando  $O_2^{\bullet-}$  como um subproduto (HOLLEY et al., 2010; KAMINSKI et al., 2013). Uma investigação estimou que durante a respiração normal, as concentrações de  $O_2^{\bullet-}$  na mitocôndria pode atingir  $10^{-12}$  M (DHAR, ST CLAIR, 2012). Entretanto, o controle dos níveis de  $O_2^{\bullet-}$  pela enzima SOD2 precisa ser bem regulado: a baixa eficiência da SOD2 pode aumentar os níveis de  $O_2^{\bullet-}$ , por outro lado, a alta eficiência da SOD2 pode aumentar os níveis de  $H_2O_2$ , e ambas as situações geram estresse oxidativo e potenciais danos celulares e diferentes efeitos no sistema imune (CAVAGNAT et al., 2012).

De fato, a proliferação de CMSP-AV, consideradas células com SOD2 balanceada, diminuiu na presença do tratamento com RES, em uma maneira similar àquela descrita em estudos prévios utilizando células do sistema imune de modelos experimentais (WU et al., 2006; HALICKA et al., 2012; WANG et al., 2013; ZOU et al., 2013). Contudo, esses resultados não foram os mesmos em células homozigóticas, sugerindo um efeito farmacogenético do Ala16Val-SOD2 na ativação de CMSP quando expostas ao RES.

As CMSP-AA com alta eficiência da SOD2, nas primeiras 24 horas, apresentaram maior resposta na inibição de linfócitos quando tratadas com RES. Estas células também diminuíram os níveis de citocinas inflamatórias e de EROs. No entanto, após 72 horas este efeito foi totalmente revertido, e em concentrações menores de  $5 \mu\text{M}$  de RES, as CMSP-AA aumentaram significativamente a proliferação celular quando comparadas com o grupo controle sem tratamento.

Em CMSP-VV, que possuem eficiência mais baixa da enzima SOD2, a suplementação de RES em concentrações  $\geq 5 \mu\text{M}$  estimulou a proliferação celular em culturas de 24 e 72 horas. Embora, o RES tenha diminuído os níveis de algumas citocinas inflamatórias nas CMSP-VV, esse efeito também foi menos intenso do que aquele observado em portadores do

alelo A. Esses resultados corroboram resultados descritos em pesquisas anteriores que descreveram níveis altos de citocinas inflamatórias em CMSP-VV quando comparados com CMSP do alelo A, indicando que as CMSP-VV são mais resistentes à moléculas antioxidantes e anti-inflamatórias, como o RES (MONTANO et al., 2012). Ao contrário, o efeito do RES em CMSP-AA parece ser transitório precipitando uma reversão na resposta anti-inflamatória em células cultivadas durante 72 horas.

Apesar dessas diferenças, o tratamento com RES foi capaz de ativar a SIRT 1 nas CMSP, independentemente do polimorfismo Ala16Val-SOD2, embora o seu efeito tenha sido mais intenso nas CMSP-AA. Há evidências que a SIRT 1 pode preservar a função mitocondrial de células não imunes, como cardiomiócitos atenuando o dano oxidativo do miocárdio durante reperfusão isquêmica, via regulação positiva da SOD2 (TANNO et al., 2010). Como o RES regula positivamente o gene da SIRT 1 em todos os genótipos Ala16Val-SOD2, diferenças na resposta proliferativa de CMSP provavelmente são consequência do desequilíbrio  $O_2^{\bullet-}$  -  $H_2O_2$  encontrados nos genótipos homozigotos da SOD2 não envolvendo ação direta da SIRT 1.

Um número consistente de estudos, tem descrito associação entre o polimorfismo Ala16Val-SOD2 com risco de doenças crônicas e disfunções biológicas, apesar de haver alguns resultados inconsistentes, provavelmente, devido a interações ambientais como variáveis de atividade física e nutricionais (BRESCIANI et al., 2013). Infelizmente, investigações epidemiológicas não permitem o isolamento e controle da contribuição destas variáveis ambientais em estudos de polimorfismos genéticos. Por essa razão, o uso do polimorfismo Ala16Val-SOD2 como modelo *in vitro* para investigar o impacto do metabolismo oxidativo constitutivo desbalanceado em resposta às moléculas farmacológicas e nutricionais em condições controladas, pode ser considerado relevante.

Entretanto, até o momento, as investigações realizadas com modelo genético *in vitro* foram mais focadas na avaliação do efeito de agentes estressores (causadores de estresse) como criopreservação, radiação UV, exposição a altas concentrações de glicose e insulina ou drogas farmacológicas na citotoxicidade, estresse oxidativo e biomarcadores inflamatórios (MARTIN et al., 2009; dos SANTOS MONTAGNER et al., 2010; COSTA et al., 2012; MONTANO et al., 2012; BARBISAN et al., 2014). Em todos estes estudos realizados, a resposta celular apresentou algum efeito diferencial relacionado com o desequilíbrio de  $O_2^{\bullet-}$  -  $H_2O_2$  encontrado nos genótipos AA e VV. Diferente destes estudos, esta investigação relatou pela primeira vez o efeito do RES, que é uma molécula antioxidante e reconhecida por ter propriedades anti-envelhecimento, em CMSPs.

Apesar da existência de limitações metodológicas relacionadas a estudos *in vitro* e o baixo número de voluntários usados para a realização dos experimentos, os resultados do presente estudo permitem sugerir que o efeito do RES em CMSP humanas não é universal, já que células portadoras do genótipo VV não apresentaram efeito anti-inflamatório na presença desta molécula antioxidante. Investigações farmacogenéticas complementares *in vivo* avaliando o efeito do RES em biomarcadores imunológicos poderiam ajudar a elucidar se os resultados encontrados nesse estudo possuem algum impacto na fisiologia e saúde humana.

## 5 CONCLUSÃO

No presente estudo, foi avaliado o efeito de diferentes concentrações do RES na ativação inflamatória de CMSPs portadoras de diferentes genótipos do polimorfismo Ala16Val-SOD2:

Os resultados mostraram ação anti-inflamatória do RES em CMSPs, conforme previamente relatado na literatura. Entretanto, esta ação foi fortemente influenciada pelo polimorfismo da SOD2, já que não ocorreu efeito na viabilidade e proliferação celular de CMSPs portadoras do genótipo VV;

Os níveis dos de marcadores oxidativos (EROs e lipoperoxidação) também foram influenciados pelo RES que atuou como antioxidante dependendo dos genótipos investigados;

O RES diminuiu os níveis das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IFT- $\gamma$ , principalmente, nas células portadoras do alelo A (AA e AV);

Um aumento significativo nos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 foi observado nas CMSPs independente do polimorfismo Ala16Val-SOD2;

O RES também aumentou a expressão do gene da SIRT 1 e dos níveis de proteína desta molécula. Este efeito também foi independente do polimorfismo Ala16Val-SOD2, ainda que tenha sido mais intenso em células AA.

O conjunto dos resultados sugere que existe uma resposta farmacogenética associada a modulação dos níveis de O<sub>2</sub> $\bullet^-$  e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na modulação de parâmetros inflamatórios de CMSPs humano.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADRIAN, M. et al. Induction of phytoalexin (RES) synthesis in grapevine leaves treated with aluminum chloride (AlCl<sub>3</sub>). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 44, n. 8, p. 1979-1981, 1996.
- AGGARWAL, B. et al. Role of RES in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. **Anticancer Research**. v. 24, n. 5, p. 2783-2840, 2004.
- ALBANI, D.; POLITO, L.; FORLONI, G. Sirtuins as novel targets for Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders: experimental and genetic evidence. **Journal of Alzheimer's Disease**. v. 19, n. 1, p. 11-26, 2010.
- ALCAIN, F. J.; VILLALBA, J. M. Sirtuins inhibitors. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**. v. 19, p. 283-294, 2009.
- ALGARVE, T. D. et al. *In vitro* effects of Ala16Val manganese superoxide dismutase gene polymorphism on human white blood cells exposed to methylmercury. **Genetics and Molecular Research**. v. 12, n. 4, p. 5134-5144, 2013.
- AMBROSONE, C. B. et al. Breast cancer risk, meat consumption and N-acetyltransferase (NAT2) genetic polymorphism. **International Journal of Cancer**, v. 16, p. 825-830, 1998.
- CEMELI, E.; BAUMGARTNER, A.; ANDERSON, D. Antioxidants and the comet assay. **Mutation research/reviews in mutation research**. v. 681, n. 1, p. 51-67, 2009.
- ATES, O. et al. Neuroprotection by RES against traumatic brain injury in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 294, p. 137-144, 2007.
- BAG, A.; BAG, N. Target Sequence Polymorphism of Human Manganese Superoxide Dismutase Gene and Its Association with Cancer Risk: A Review. **Cancer Epidemiology Biomarkers, Prevention**. v. 17, n. 12, p. 3298, 2008.
- BARBISAN, F. et al. Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism. **Plos One**. 2014 (ahead pub).
- BARGER, J. L. et al. A low dose of dietary RES partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice. **Plos One**. v. 3, n. 6, p. e2264, 2008.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**. v. 29, n.1, p. 113-23, 2006.
- BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K. DNA damage responses to oxidative stress. **DNA repair**, v.3, n. 8-9, p.1109-1115, 2004.

- BAUR, J. A. et al., RES improves health and survival of mice on a high-calorie diet. **Nature**. v. 444, n. 7117, p. 337-342, 2006.
- BAUR, J. A.; SINCLAIR, D. A. Therapeutic potential of RES: the in vivo evidence. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 5, n. 6, p. 493-506, 2006.
- BAVARESCO, L. Role of viticultural factors on stilbene concentrations of grapes and wine. **Drugs under Experimental and Clinical Research**. v. 29, n. 5-6, p. 181-187, 2003.
- BELGUENDOZ, L.; FREMONT, L.; LINARD, A. RES inhibits metal iondependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins. **Biochemical Pharmacology**. v. 53, p. 1347-1355, 1997.
- BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**. v. 29, n. 6, p. 1340-1344, 2006.
- BICA, C. G. et al. MnSOD Gene Polymorphism Association with Steroid-Dependent Cancer. **Pathology Oncology Research**. v.15, n. 1, p. 19-24, 2009.
- BICA, C. G. et al. Polymorphism (ALA16VAL) correlates with regional lymphnode status in breast cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**. v. 196, p. 153-158, 2010.
- BLANDER, G.; GUARENTE, L. The Sir2 family of protein deacetylases. **Annual Review of Biochemistry**. v. 73, p. 417-435, 2004.
- BORRA, M. T.; SMITH, B. C.; DENU, J. M. Mechanism of human SIRT1 activation by RES. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 280, n. 17, p. 17187-17195, 2005.
- BRESCIANI, G. et al. The MnSOD Ala16Val SNP: relevance to human diseases and interaction with environmental factors. **Free Radical Research**. v. 47, n. 10, p. 781-792, 2013.
- BRITO, P. et al. RES affords protection against peroxynitrite-mediated endothelial cell death: A role for intracellular glutathione. **Chemico-Biological Interactions**. v. 164, p. 157-166, 2006.
- BURNS, J. et al. Plant foods and herbal sources of RES. **Journal of Agricultura and Food Chemistry**. v. 22, n. 11, p. 3337-3340, 2002.
- CAKIR, I. et al. Hypothalamic Sirt1 regulates food intake in a rodent model system. **Plos One**. v. 4, n. 1, e8322, 2009.
- CANTO, 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.
- CANTÓ, C.; AUWERX, J. Calorie restriction: is AMPK a key sensor and effector? **Physiology**. v. 26, n. 4, p 214-224, 2009.
- CARERI, M. et al. Direct HPLC analysis of quercetin and trans-RES in red wine, grape, and winemaking byproducts. **Journal of Agricultura and Food Chemistry**. v. 51, n. 18, p. 5226-5231, 2003.

- CATALGOL, B. K.; OZDEN, S.; ALPERTUNGA, B. Effects of trichlorfon on malondialdehyde and antioxidant system in human erythrocytes. **Toxicology in Vitro**. v. 21, n. 8, p. 1538-1544, 2007.
- CAVAGNAT, M. M.; WEYAND, C. M.; GORONZY, J. J. Chronic inflammation and aging: DNA damage tips the balance. **Current Opinion in Immunology**. v. 24, p. 488-493, 2012.
- CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.
- CHANG, C. C. RES exhibits differential protective effects on fast- and slow-twitch muscles in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Diabetes**. v. 6, n. 1, p. 60-67, 2014.
- CHEN, D. et al. Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction. **Genes & Development**. v. 22, p. 1753-1757, 2008.
- CHUNG, S. et al. Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. **Archives of Biochemistry and Biophysical**. v. 501, n. 1, p. 79-90, 2010.
- CHURCH, S. L. et al. Sublocalization of the gene encoding manganese superoxide dismutase (MnSOD/SOD2) to 6q25 by fluorescence in situ hybridization and somatic cell hybrid mapping. **Genomics**, v.14, n. 3, p. 823-825, 1992.
- ÇİMEN, M. Y. B. Free radical metabolism in human erythrocytes. **Clinica Chimica Acta**. v. 390, n. 1-2, p. 1-11, 2008.
- COSTA, F. et al. Influence of Val16Ala SOD2 polymorphism on the in-vitro effect of clomiphen citrate in oxidative metabolism. **Reproductive BioMedicine Online**. v. 24, n. 4, p.474-481, 2012.
- COX, D. G.; TAMIMI, R. M.; HUNTER, D. J. Gene x Gene interaction between MnSOD and GPX-1 and breast cancer risk: a nested case-control study. **BMC Cancer** v. 6, p. 217, 2006.
- DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**. v.329, n. 1-2, p. 23-28, 2003.
- DANZ, E. D. et al. RES prevents doxorubicin cardiotoxicity through mitochondrial stabilization and the Sirt1 pathway. **Free Radical Biology Medicine**. v. 46, n. 12, p. 1589-1597, 2009.
- D'ARCHIVIO, A. A. et al. Comparison of different sorbents for multiresidue solid-phase extraction of 16 pesticides from groundwater coupled with high-performance liquid chromatography. **Talanta**. v. 71, n. 1, p. 25-30, 2007.
- DEDOUSSIS, G. V. et al. Age-dependent dichotomous effect of superoxide dismutase Ala16Val polymorphism on oxidized LDL levels. **Experimental & Molecular Medicine**. v. 40, n. 1, p. 27-34, 2008.
- DEVARAJ, S.; JIALAL, I. Antioxidants and vitamins to reduce cardiovascular disease. **Current Atherosclerosis Reports**. v. 2, n. 4, p. 342-351, 2000.

DHAR, S. K.; ST CLAIR, D. K. Manganese superoxide dismutase regulation and cancer. **Free Radical Biology Medicine**. v. 52, p. 2209-2222, 2012.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiology Reviews**. v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

DUARTE, M. M. et al. Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. **Clinical Biochemistry**. v. 43, n. 13-14, p.1118-1123, 2010.

ELLIS, E. M. Reactive carbonyls and oxidative stress: potential for therapeutical intervention, **Pharmacology and therapeutics**, v.115, n. 1, p. 13-24, 2007.

ERAS-ERDOGAN, N. et al. Relationship between polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene and breast cancer. **Mutation Research**. v. 680, n. 1-2, p. 7-11, 2009.

FAN, E. et al. Review: Beneficial effects of RES on atherosclerosis. **Journal of Medicinal Food Larchmont**. v. 11, n. 4, p. 610-614, 2008.

FAUCONNEAU, B. et al. Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests. **Life Sciences**. v. 61, p. 2103-2110, 1997.

FERREIRA, A. L.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas e sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v.43, p. 61-68, 1997.

FINAUD, J. et al. Antioxidant status and oxidative stress in professional rugby players: evolution throughout a season. **International Journal of Sports Medicine**. v. 27, n. 2, p. 87-93, 2006.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**. v. 408, n. 6809, p. 239-247, 2000.

FOLKERTS, G. et al. Reactive nitrogen and oxygen species in airway inflammation. **European Journal of Pharmacology**. v. 429, n. 1-3, p. 251-262, 2001.

FRANKEL, E. N.; WATERHOUSE, A. L.; KINSELLA, J. E. Inhibition of human LDL oxidation by RES. **Lancet**. v. 341, p. 1103-1104, 1993.

FREMONT, L.; BELGUENDOZ, L.; DELPAL, S. Antioxidant activity of RES and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. **Life Sciences**. v. 64, p. 2511-2521, 1999.

FRÖJDÖ, S.; DURAND, C.; PIROLA, L. Metabolic effects of RES in mammals--a link between improved insulin action and aging. **Current Aging Science**. v. 1, n. 3, p. 145-151, 2008.

- FUKUI, M.; CHOI, H. J.; ZHU, B.T. Mechanism for the protective effect of RES against oxidative stress-induced neuronal death. **Free Radical Biology Medicine**. v. 49, p. 800–813, 2010.
- FULOP, T. et al. Cellular signaling in the aging immune system. **Current Opinion in Immunology**. v. 29C, p. 105-111, 2014.
- GOETZ, M. E.; LUCH, A. Reactives species: a cell damaging rout assisting to chemical carcinogens. **Cancer Letters**, v.266, n. 1, p. 73-83, 2008.
- GOTTLIEB, M. G. V. et al. Association among oxidized LDL levels, MnSOD, apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population. **Genetics and Molecular Research**. v. 30, n. 4, p. 691-703, 2005.
- HALICKA, H. D. et al. Potential anti-aging agents suppress the level of constitutive mTOR- and DNA damage- signaling. **Aging (Albany NY)**. v. 4, p. 952-965, 2012.
- HALLIWEL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Journal of Plant Physiology**. v. 141, n. 2, p. 312-322, 2006.
- HALLIWEL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs & Aging**. v. 18, n. 9, p. 685-716, 2001.
- HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**. v. 35, p. 1147-1150, 2007.
- HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 57, n. 5, p. 715S-724S, 1993.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4th ed. Oxford/UK: Clarendon Press/Oxford Science Publications, 2007.
- HALLIWELL, B.; ZHAO, K.; WHITEMAN, M. Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. **Free Radical Research**. v. 31, n. 6, p. 651-669, 1999.
- HARIKUMAR, B.; AGGARWAL, B. RES: a multitargeted agent for age- associated chronic diseases. **Cell Cycle**. v. 7, n. 8, p 1020-1035, 2008.
- HOLLEY, A. K. et al. Manganese superoxide dismutase: beyond life and death. **Amino. Acid Source**. v. 42, p. 139-158, 2012.
- HORI, Y. S. et al. Regulation of FOXOs and p53 by SIRT1 modulators under oxidative stress. **Plos One**. 11, 2013.
- HOWITZ, K. T. et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. **Nature**. v. 425, n. 6954, p. 191-196, 2003.
- IGUCHI, T. et al. MnSOD genotype and prostate cancer risk as a function of NAT genotype and smoking status. **In Vivo**. v. 23, n. 1, p. 7-12, 2009.

JACKSON, J. R.; RYAN, M. J.; ALWAYS, S. E. Long-term supplementation with RES alleviates oxidative stress but does not attenuate sarcopenia in aged mice. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**. v. 66, p. 751–764, 2011.

JEANDET, P. et al. Effect of enological practices on the RES isomer content of wine. *J. Agric. Journal of Agricultura and Food Chemistry*. v. 43, p. 316-319, 1995.

JOHANSEN, J. S. et al. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. **Cardiovascular Diabetology**. v. 4, n. 1, p. 5, 2005.

JONES, D. A. et al. Association between the rs4880 superoxide dismutase 2 (C>T) gene variant and coronary heart disease in diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**. v. 90, n. 2, p. 196-201, 2010.

KAIRISALO, M. et al. RES reduces oxidative stress and cell death and increases mitochondrial antioxidants and XIAP in PC6.3-cells. **Neuroscience Letters**. v. 488, n. 3, p. 263-266, 2011.

KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox Biology**. v. 1, n. 1, p. 244–257, 2013.

KAMIŃSKI, M. M. Mitochondria as oxidative signaling organelles in T-cell activation: physiological role and pathological implications. **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis (Warsz)**. v. 61, p. 367-384, 2013.

KIM, H. et al. Metabolomic analysis of livers and sérum from high-fat diet induced obese mice. **Journal of Proteome Research**. v. 10, p. 722-731, 2011.

KING, R. E.; BOMSER, J. A.; MIN, D. B. Bioactivity of RES. **Comprehensive Reviews in Food and Science and Food Safety**. v. 5, p. 65-70, 2006.

KLAR, A. J. S. et al. MAR1-a Regulator of the HMa and HMalpha Loci in *Saccharomyces Cerevisiae*. **Genetics**. v. 93, n. 1, p. 37-50, 1979.

LAGOUGE, M. et al. RES improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. **Cell**. v. 127, n. 6, p. 1109-1122, 2006.

LEONARD, S. et al. RES scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 309, n. 4, p. 1017-1026, 2003.

LI, Y. et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. **Nature Genetics**. v. 11, n. 4, p. 376-81, Dec. 1995.

LÓPEZ-VÉLEZ, M.; MARTINEZ-MARTINEZ, F.; DEL VALLE-RIBES, C. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 43, n. 3, p. 233-244, 2003.

- LYKKESFELDT, J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. **Clinica Chimica Acta**. v. 380, n. 1-2, p. 50-58, 2007.
- MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.
- MAO, C. et al. MnSOD Val16Ala polymorphism and prostate cancer susceptibility: a meta-analysis involving 8,962 subjects. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**. v. 136, n. 7, p. 975-979, 2010.
- MARTIN, R. C. et al. Manganese superoxide dismutase V16A single-nucleotide polymorphism in the mitochondrial targeting sequence is associated with reduced enzymatic activity in cryopreserved human hepatocytes. **DNA and Cell Biology**. v. 28, p. 3-7, 2009.
- MICALLEF, M.; LEXIS, L.; LEWADOWSKI, P. Red wine consumption increases antioxidant status and decreases oxidative stress in the circulation of both young and old humans. **Nutrition Journal**. v.6, p. 1-8, 2007.
- MICHISHITA, E. et al. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. **Molecular Biology of the Cell**. v. 16, n. 10, p. 4623-4635, 2005.
- MOKNI, M. et al. Effect of RES on antioxidant enzyme activities in the brain of healthy rat. **Neurochemical Research**. v. 32, p. 981-987, 2007.
- MONTAGNER, G. F. S. et al. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. **Toxicology in Vitro**. v. 24, n. 5, p. 1410-1416, 2010.
- MONTANO, M. A. E. et al. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and elderly obesity. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 328, n. 1-2, p. 33-40, 2009.
- MONTANO, M. A. E. et al. Inflammatory cytokines in vitro production are associated with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism of peripheral blood mononuclear cells. **Cytokine**. v. 9, n. 1, p. 30-33, 2012.
- MONTIEL, I. J. et al. SOD2 gene Val16Ala polymorphism is associated with macroalbuminuria in Mexican Type 2 Diabetes patients: a comparative study and meta-analysis. **BMC Medical Genetics**. v. 14, p. 110, 2013.
- MORRIS, C. J. et al. Reactive oxygen species and iron--a dangerous partnership in inflammation. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 27, n. 2, p. 109-122, 1995.
- MURTAS, D. et al. Nuclear 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as survival biomarker in patients with cutaneous melanoma. **Oncology Reports**. v. 23, n. 2, p. 329-335, 2010.
- NEBBIOSO, A. et al. Trial with "epigenetic" drugs: An update. **Molecular Oncology**. v. 6, p. 657-682, 2012.

OLAS, B.; WACHOWICZ, B. RES, a phenolic antioxidant with effects on blood platelets functions. **Platelets**. v. 16, n. 5, p. 251–260, 2005.

OPARA, E. C. Oxidative stress. **Disease-a-Month**. v. 52, n. 5, p. 183-198, 2006.

ORALLO, F. Trans-RES: a magical elixir of eternal youth? **Current Medicinal Chemistry**. v. 15, n. 19, p. 1887-1898, 2008.

PAN, H.; WANG, L.; LI, J. M. - Amounts and subcellular localization of stilbene synthase in response of grape berries to UV irradiation. **Plant Science**. v. 1, n. 3, p. 360-6, 2009.

PERRONE, G. et al. Positive correlation between high levels of ochratoxin A and RES-related compounds in red wines. **Journal of Agricultura and Food Chemistry**. v. 55, n. 16, p. 6807-6812, 2007.

QIANG, L.; WANG, H.; FARMER, S. Adiponectin secretion is regulated by SIRT1 and the endoplasmic reticulum oxidoreductase Ero1- $\alpha$ . **Molecular and Cellular Biology**. v. 27, p. 4698-4707, 2007.

RAYMAN, M. P. The importance of Selenium in human health. **Lancet**. v. 356, n. 9225, p. 233-241, 2000.

ROBB, L. et al. Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by RES: Specific and progressive induction of MnSOD. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 367, p. 406-412, 2008.

ROVER JÚNIOR, L. et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**. v. 1, n. 1, p. 112-119, 2001.

SAUVE, A. et al. The biochemistry of sirtuins. **Annual Review of Biochemistry**. v. 75, p. 435-465, 2006.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SGAMBATO, A. et al. RES, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage. **Mutation Research**. v. 496, p. 171-180, 2001.

SHAKIBAEI, M.; HARIKUMAR, K. B.; AGGARWAL, B. B. - RES addiction: to die or not to die. **Molecular Nutrition & Food Research**. v. 53, n. 1, p. 115-128, 2009.

SHARMA, M.; GUPTA, Y. K. Chronic treatment with trans RES prevents intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. **Life Sciences**. v. 71, p. 2489-2498, 2002.

SIEMANN, E. H.; CREASY, L. L. Concentration of the phytoalexin RES in wine. **American Journal. Enology and Viticulture**. v. 43, p. 49-52, 1992.

SILVA, J. P.; WAHLESTEDT, C. Role of Sirtuin 1 in metabolic regulation. **Drug Discovery Today**. v. 15, n. 17-18, p. 781-791, 2010.

SINGH, M. et al. Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 56, n. 13, p. 4855-4873, 2008.

SOLEAS, J.; DIAMANDIS, P.; GOLDBERG, D. M. RES: a molecule whose time has come? And gone? **Clinical Biochemistry**. v. 30, n. 2, p. 91-113, 1997.

SOUTO, A. C. Determination of trans-RES concentrations in Brazilian red wines by HPLC. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 14, p. 441-445, 2001.

SUTTON, A. et al. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. **Pharmacogenetics**, v.13, n. 3, p. 145-157, 2003.

SUTTON, A. et al. The manganese superoxide dismutase Ala16Val dimorphism modulates both mitochondrial import and mRNA stability. **Pharmacogenetics and Genomics**, v.15, n. 5, p. 311-319, 2005.

TANNO, M. Induction of manganese superoxide dismutase by nuclear translocation and activation of SIRT1 promotes cell survival in chronic heart failure. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 285, p. 8375-8382, 2010.

TAUFER, M. et al. Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process? **Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 60, n. 4, p. 423-438, 2005.

TIAN, C. et al. Association of the C47T polymorphism in SOD2 with diabetes mellitus and diabetic microvascular complications: a meta-analysis. **Diabetologia**. v. 54, n. 4, p. 803-11, 2011.

UNGVARI, Z. et al. RES attenuates mitochondrial oxidative stress in coronary arterial endothelial cells. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**. v. 297, n. 5, p. 1876-1881, 2009.

VAJDOVICH, P. Free Radicals And Antioxidants In Inflammatory Processes And Ischemia-Reperfusion Injury. **Veterinary Clinical of North America: Small Animal Practice**. v. 38, n. 1, p. 31-123, 2008.

VALENZANO, D. R.; CELLERINO, A. RES and the pharmacology of aging: a new vertebrate model to validate an old molecule. **Cell Cycle**. v. 5, n. 10, p. 1027-1032, 2006.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VAQUERO, A.; STERNGLANZ, R.; REINBERG, D. NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylation of H4 lysine 16 by class III HDACs. **Oncogene**. v. 26, p. 5505-5520, 2007.

- VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**. v.30, n. 5, p.1323-1338, 2007.
- VITRAC, X. Determination of stilbenes (delta-viniferin, trans-astringin, trans-piceid, cis- and transRES, epsilon-viniferin) in Brazilian wines. **Journal of Agricultura and Food Chemistry**. v. 53, p. 5664-5669, 2005.
- WAN, X. et al. Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. **DNA and Cell Biology**. v.13, n. 11, p. 1127-1136, 1994.
- WANG, B. et al. RES prevents suppression of regulatory T-cell production, oxidative stress and inflammation of mice prone or resistant to high-fat diet-induced obesity. **Nutrition. Research**. v. 33, 971-981, 2013.
- WANG, T. T. et al. Differential effects of RES and its naturally occurring methylether analogs on cell cycle and apoptosis in human androgen-responsive LNCaP cancer cells. **Molecular Nutrition & Food Research**. v. 4, n. 3, p. 335-344, 2010.
- WATERHOUSE, A.; MCCAULEY, J.; PEÑA, J. Winemaking effects on RES levels. **American Journal. Enology and Viticulture**. v. 44, p. 345, 1993.
- WENZEL, E.; SOMOZA, V. Metabolism and bioavailability of trans-RES. **Molecular Nutrition & Food Research**. v. 49, p. 472-481, 2005.
- WOOD, J. G. et al. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. **Nature**. v. 430, n. 7000, p. 686-689, 2004.
- WU, S. L. et al. The suppressive effect of RES on protein kinase C theta in peripheral blood T lymphocytes in a rat liver transplantation model. **Transplantation Proceedings**. v. 38, p. 3052-3054, 2006.
- XIUYUN, H. et al. Regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase. **Journal of Biological Chemistry**. v. 283, p. 20015-20026, 2008.
- XU, Y. et al. RES protects against hyperglycemia-induced oxidative damage to mitochondria by activating SIRT1 in rat mesangial cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 259, n. 3, p. 395-401, 2012.
- YAMAMOTO, H. et al. Sirtuin functions in health and disease. **Molecular Endocrinology**. v. 21, n. 8, p. 1745-1755, 2007.
- YEN, G. C.; DUH, P. D.; LIN, C. W. Effects of RES and 4-hexylresorcinol on hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes. **Free Radic. Research**. v. 37, p. 509-514, 2003.
- YU, C. C.; WOODS, A. L.; LEVISON, D. A. The assessment of cellular proliferation by immunohistochemistry: a review of currently available methods and their applications. **The Histochemical Journal**. v. 24, n. 3, p. 121-131, 1992.

YU, J.; AUWERX, J. Protein deacetylation by SIRT1: na emerging key post-translational modification in metabolic regulation. **Pharmacology Research**. v. 62, n. 35-41, 2009.

YUAN, J. et al. Histone H3-K56 acetylation is importante for genomic stability in mammals. **Cell Cycle**. v. 8, p. 1747-1753, 2009.

ZEJNILOVIC, J. et al. Association between manganese superoxide dismutase polymorphism and risk of lung cancer. **Cancer Genetics Cytogenetics**. v. 189, n. 1, p. 1-4, 2009.

ZELKO, I. N.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene strutures, evolution, and expression. **Free Radical Biology and Medicine**, v.33, n. 3, p.337-349, 2002.

ZOU, J. G. et al. RES inhibits copper ion-induced and azo compound-initiated oxidative modification of human low density lipoprotein. **Biochemistry and Molecular Biology International**. v. 47, p. 1089- 1096, 1999.

ZOU, T. et al. RES Inhibits CD4+ T cell activation by enhancing the expression and activity of Sirt1. **Plos One**. 20, 2013.