

## Efeito antioxidante do Resveratrol na função vascular

### Antioxidant effect of Resveratrol on vascular function

Catarina Freitas<sup>1</sup> , Ana Patrícia Lourenço<sup>1</sup> , Maria Helena Timoteo<sup>1</sup> , Maria Soares<sup>1</sup> , João Paulo Figueiredo<sup>1</sup> , Telmo Pereira<sup>1,2</sup> , Armando Caseiro<sup>1,2,3</sup> 

<sup>1</sup>Instituto Politécnico de Coimbra, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, Coimbra, Portugal;

<sup>2</sup>LABINSAÚDE - Laboratório de Investigação em Ciências Aplicadas à Saúde, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, Coimbra, Portugal;

<sup>3</sup>Unidade I&D Química-Física Molecular, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.

\*Autor correspondente/Corresponding author: [ana.catarinapfr@gmail.com](mailto:ana.catarinapfr@gmail.com)

Recebido/Received: 30-01-2022; Revisto/Revised: 24-06-2022; Aceite/Accepted: 05-08-2022

#### Resumo

**Introdução:** O stress oxidativo (SO) resulta da produção excessiva de espécies reativas de oxigénio (ROS), sendo responsável pelo desenvolvimento de inúmeras patologias. O resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) é um antioxidante de origem natural, produzido por uma grande variedade de espécies, cujas propriedades têm despoletado um interesse crescente. **Objetivo:** Compreender o papel do resveratrol nas defesas antioxidantes enzimáticas e na função vascular, mas também na redução da inflamação. **Material e Métodos:** 27 alunos clinicamente saudáveis, com idades entre os 18 - 22 anos foram randomizados em grupo controlo (GC) e experimental (GE), e submetidos à suplementação com placebo e resveratrol, respetivamente, durante 30 dias. Foi realizada a avaliação laboratorial da atividade da glutathione peroxidase (GPx) e redutase (GluRed) por espectrofotometria, e dos níveis séricos de endotelina 1 (ET-1), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-6 (IL-6) por *slot blot*, no período basal (T0) e após suplementação (T1). **Resultados:** No que concerne à atividade da GPx, no momento T1, observaram-se valores superiores no GE ( $p = 0,005$ ). Relativamente à GluRed, ambos os grupos demonstraram uma tendência de aumento da atividade enzimática em T1. No entanto, apenas o GC revelou resultados estatisticamente significativos ( $p = 0,004$ ). Nos restantes parâmetros avaliados, não foram observadas diferenças significativas. **Conclusões:** A suplementação com resveratrol pode ser eficaz na redução do SO, ao aumentar a atividade das enzimas antioxidantes. Ainda assim, não foi possível provar o seu papel como agente cardioprotetor e anti-inflamatório.

**Palavras-chave:** Resveratrol, Glutathione Peroxidase, Endotelina, Interleucina-6, Fator De Necrose Tumoral-Alfa.

#### Abstract

**Introduction:** Oxidative stress (OS) results from the overproduction of reactive oxygen species (ROS), being responsible for the development of numerous pathologies. Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) is a naturally occurring antioxidant, produced by a wide variety of fruit and plant species, in response to several stimuli. Due to its antioxidant, anti-inflammatory, cardio, and neuroprotective properties, this polyphenol has shown great interest in recent years. **Objective:** To understand the role of resveratrol in enzymatic antioxidant defenses and vascular function, but also in decreasing inflammation. **Material and Methods:** 27 healthy students, aged 18 - 22 years, were randomized into control (CG) and experimental (EG) groups, and submitted to placebo and resveratrol supplementation, respectively, for 30 consecutive days. In these participants, laboratory evaluation of glutathione peroxidase (GPx) and reductase (GluRed) activity by spectrophotometry, and serum levels of endothelin 1 (ET-1), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and interleukin-6 (IL-6) by slot blot were performed, before (T0) and after supplementation (T1). **Results:** Evaluating GPx activity at T1, higher values were observed in the EG ( $p = 0.005$ ). Regarding GluRed, both groups demonstrated a tendency to increase enzyme activity at T1. However, significant results were only observed in CG ( $p = 0.004$ ). In the remaining parameters evaluated, no significant differences were observed. **Conclusions:** Supplementation with resveratrol may be effective in reducing OS by increasing the activity of endogenous antioxidant enzymes. Yet, it was unable to prove its role as a cardioprotective and anti-inflammatory agent.

**Keywords:** Resveratrol, Glutathione Peroxidase, Endothelin, Tumor Necrosis Factor-Alpha, Interleukin-6.

#### 1. INTRODUÇÃO

Os radicais livres são espécies químicas reativas que apresentam um eletrão desemparelhado na sua órbita externa, sendo altamente instáveis e com alto poder reativo (Kehrer et

#### 1. INTRODUCTION

Free radicals are reactive chemical species that have an unpaired electron in their external orbit, being highly reactive and unstable (Kehrer et al., 2010; Pisoschi and Pop, 2015; Rytsyk et al., 2020). Reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen

al., 2010; Pisoschi and Pop, 2015; Rytsyk et al., 2020). As espécies reativas de oxigênio (ROS), como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), resultam do metabolismo do oxigênio, sendo continuamente produzidas em organismos aeróbios, por fontes endógenas e exógenas (Phaniendra et al., 2015; Pisoschi and Pop, 2015; Rytsyk et al., 2020; Sinha and Dabla, 2015; Tan et al., 2018). O desequilíbrio entre a produção de espécies oxidantes e a capacidade de o organismo as neutralizar, através de sistemas de proteção antioxidante, é definido como stress oxidativo (SO) (Kehrer et al., 2010; Pisoschi and Pop, 2015; Pizzino et al., 2017; Sinha and Dabla, 2015; Tan et al., 2018). Este reflete uma produção excessiva de ROS, ou uma redução na capacidade antioxidante do organismo (Kehrer et al., 2010; Pisoschi and Pop, 2015).

Estudos sugerem que o SO resultante do dano induzido por radicais livres contribui para a fisiopatologia e patogênese de vários problemas de saúde, incluindo doenças cardiovasculares e inflamatórias, cancro e doenças neurodegenerativas (Pisoschi and Pop, 2015; Pizzino et al., 2017; Rytsyk et al., 2020; Tan et al., 2018).

Qualquer composto que, quando presente numa concentração inferior à do substrato oxidável, tem capacidade de prevenir ou retardar a sua oxidação, é considerado um antioxidante. Entre as inúmeras funções destes compostos, é de salientar o seu papel na redução do SO e mutações no DNA (Pisoschi and Pop, 2015; Tan et al., 2018).

O resveratrol (3,5,4-trihidroxiestilbeno), é um composto antioxidante polifenólico, de origem natural, produzido por cerca de 70 espécies de frutos e plantas, incluindo amoras, mirtilos, amendoins e uvas (Banez et al., 2020; Breuss et al., 2019; Colica et al., 2018; Gerszon et al., 2014; Neves et al., 2012). Em virtude das elevadas concentrações encontradas na pele de uva, o vinho tinto é a principal fonte dietética de resveratrol (Banez et al., 2020; Neves et al., 2012). Em resposta a ataques fúngicos, radiação ultravioleta (UV), lesão e exposição ao ozono, o resveratrol é sintetizado de novo pela sintetase dos estilbenos (STS), sendo por isso classificado como uma fitoalexina natural (Colica et al., 2018; Gerszon et al., 2014; Neves et al., 2012).

O destaque do resveratrol surgiu no início dos anos 90, no contexto do "Paradoxo Francês", onde a baixa incidência de doenças cardiovasculares, apesar da dieta rica em gorduras saturadas, foi associada ao consumo de vinho e, consequentemente, ao resveratrol (Banez et al., 2020; Breuss et al., 2019; Moreira-Pinto et al., 2021; Neves et al., 2012). Devido às suas propriedades neuroprotetoras, anti-inflamatórias, antioxidantes, anticancerígenas e anti-envelhecimento, este polifenol tem despoletado um interesse crescente (Colica et al., 2018; Neves et al., 2012). Recentemente, surgiu como potencial tratamento para a obesidade e a diabetes (Neves et al., 2012).

O resveratrol é encontrado nas formas isoméricas *cis*- e *trans*-, sendo o isómero *trans*- o mais abundante e biologicamente ativo. O *cis*-resveratrol é menos comum e muito instável, resultando da conversão do *trans*-resveratrol quando este é exposto à radiação UV (Colica et al., 2018; Gerszon et al., 2014; Neves et al., 2012).

Estudos sobre a biodisponibilidade do resveratrol indicam que, apesar da elevada absorção oral, este apresenta um metabolismo rápido, o que resulta em ínfimas quantidades de resveratrol inalterado na circulação sistémica (Breuss et al., 2019;

peroxide ( $H_2O_2$ ), superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) and hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ), emerge as by-products of oxygen metabolism, who are continuously produced in aerobic organisms from both exogenous and endogenous sources (Phaniendra et al., 2015; Pisoschi and Pop, 2015; Rytsyk et al., 2020; Sinha and Dabla, 2015; Tan et al., 2018). The imbalance between the generation of ROS and the ability of a biological system to counteract their action, through antioxidant protection systems, is defined as oxidative stress (OS) (Kehrer et al., 2010; Pisoschi and Pop, 2015; Pizzino et al., 2017; Sinha and Dabla, 2015; Tan et al., 2018). It reflects an excessive production of ROS or a decrease in antioxidant defense systems (Kehrer et al., 2010; Pisoschi and Pop, 2015).

Studies suggest that OS resulting from free radical-induced damage contributes to the pathophysiology and pathogenesis of several health problems, including cancer, cardiovascular, inflammatory, and neurodegenerative diseases (Pisoschi and Pop, 2015; Pizzino et al., 2017; Rytsyk et al., 2020; Tan et al., 2018).

Any substance that is capable of preventing or retarding its oxidation when present at a lower concentration than that of an oxidizable substrate, is designated as an antioxidant. Among the numerous functions of antioxidant species, it's worth emphasizing their role in reducing OS and mutations in DNA (Pisoschi and Pop, 2015; Tan et al., 2018).

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) is a naturally occurring polyphenol, produced by approximately 70 species of fruits and plants including blackberries, blueberries, peanuts, and grapes (Banez et al., 2020; Breuss et al., 2019; Colica et al., 2018; Gerszon et al., 2014; Neves et al., 2012). Due to the high concentrations found in grape skin, red wine is the most important dietary source of resveratrol (Banez et al., 2020; Neves et al., 2012). In response to fungal attack, ultraviolet (UV) radiation, injury, and ozone exposure, resveratrol is synthesized de novo by stilbene synthetase (STS) and, therefore, it is classified as a natural phytoalexin (Colica et al., 2018; Gerszon et al., 2014; Neves et al., 2012).

Resveratrol became prominent in the early '90s, in the context of the "French Paradox", where the low incidence of cardiovascular diseases, despite a high-saturated fat diet, was associated with wine consumption and, consequently, resveratrol (Banez et al., 2020; Breuss et al., 2019; Moreira-Pinto et al., 2021; Neves et al., 2012). Due to its beneficial neuroprotective, anti-inflammatory, antioxidant, anti-carcinogenic, and anti-aging properties, the interest in this polyphenol has increased over the last few years (Colica et al., 2018; Neves et al., 2012). Recently, it has emerged as a potential treatment for obesity and diabetes (Neves et al., 2012).

Resveratrol is found in two isomeric *cis*- and *trans*- forms, with the *trans*-isomer being the most abundant and biologically active. The *cis*-isomer, however, is less common and very unstable, resulting from the conversion of *trans*-resveratrol when exposed to UV radiation (Colica et al., 2018; Gerszon et al., 2014; Neves et al., 2012).

Recent studies on the bioavailability of resveratrol suggest that, despite having high oral absorption, it also has a rapid metabolism in both humans and rodents, resulting in minute amounts of unchanged resveratrol in the systemic circulation (Breuss et al., 2019; Neves et al., 2012). It is worth noting that there is significant variability in resveratrol absorption and

Neves et al., 2012). É de salientar que existe uma variabilidade interpessoal significativa na absorção e metabolização de resveratrol, sustentada por diversos fatores, nomeadamente, a função hepática e a atividade metabólica da flora intestinal (Neves et al., 2012).

As propriedades antioxidantes do resveratrol estão associadas com a ativação de enzimas capazes de remover as ROS produzidas pelo organismo, como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase. O resveratrol não só aumenta a expressão de enzimas responsáveis pela manutenção do equilíbrio redox na célula, incluindo a glutatona redutase (GluRed), a glutatona peroxidase (GPx) e a SOD, mas também reduz a atividade de enzimas que têm um papel predominante na produção de ROS, como a xantina oxidase. O seu efeito protetor resulta da regulação negativa da proteína Keap1, que promove a dissociação e ativação do fator nuclear eritróide 2 – fator relacionado 2 (Nrf2), responsável pela eliminação de ROS através da ativação de enzimas antioxidantes (Gerszon et al., 2014; Neves et al., 2012). Adicionalmente, demonstra uma forte capacidade de remoção de radicais livres, associada à presença de três grupos hidroxilo nas posições 3, 4' e 5, assim como a presença de anéis aromáticos e uma dupla ligação na molécula (Gerszon et al., 2014).

A GPx é uma enzima citosólica, cuja principal função é catalisar a redução de  $H_2O_2$ , usando-o como substrato para a oxidação de glutatona reduzida (GSH), resultando na formação de água e glutatona oxidada (GSSG) (Kehrer et al., 2010; Pisoschi and Pop, 2015; Sarikaya and Doğan, 2020). Na célula, a GluRed é responsável pela manutenção dos níveis de GSH, catalizando a redução de GSSG a GSH, usando a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) como cofator (Couto et al., 2016; Kehrer et al., 2010; Sarikaya and Doğan, 2020).

A fim de explicar os efeitos cardioprotetores do resveratrol, inúmeros mecanismos têm sido estudados. Um estudo realizado por Caseiro *et al.* revelou que a ingestão regular de resveratrol parece ser uma abordagem preventiva das doenças cardiovasculares, devido à sua capacidade de regular positivamente a expressão da óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS), conduzindo à produção de um potente vasodilatador – óxido nítrico (NO), e à consequente redução da pressão sanguínea (Banez et al., 2020; Breuss et al., 2019; Caseiro et al., 2019; Colica et al., 2018; Li et al., 2019; Neves et al., 2012). Simultaneamente, suprime a produção de endotelina-1 (ET-1), mantendo um equilíbrio entre vasodilatadores e vasoconstritores, prevenindo a aterogénese e danos vasculares (Colica et al., 2018; Li et al., 2019). Outros mecanismos vasculoprotetores envolvem a inibição da agregação plaquetária e a redução do SO vascular (Banez et al., 2020; Colica et al., 2018; Li et al., 2019).

A ET-1, um potente vasoconstritor, é o principal membro da família de péptidos endotelínicos (Barton and Yanagisawa, 2019; Li et al., 2019). Embora seja produzida por quase todos os tipos de células, a sua expressão máxima tem sido relatada em células musculares lisas, miócitos cardíacos, células endoteliais vasculares e fibroblastos (Barton and Yanagisawa, 2019). A sobreprodução deste péptido está relacionada ao desenvolvimento de aterosclerose e doença vascular (Li et al., 2019).

A regulação da resposta inflamatória é um dos principais mecanismos de proteção do resveratrol. Os seus efeitos anti-inflamatórios incluem a inibição da produção e libertação

metabolization, supported by several factors, including liver function and the metabolic activity of the gastrointestinal flora (Neves et al., 2012).

The antioxidant properties of resveratrol are associated with the activation of enzymes capable of removing ROS, such as superoxide dismutase (SOD) and catalase. Resveratrol not only increases the expression of enzymes responsible for maintaining the redox balance in the cell, including glutathione reductase (GluRed), glutathione peroxidase (GPx), and SOD, but also reduces the activity of enzymes that play a predominant role in ROS production, such as xanthine oxidase. Its protective effect results from the downregulation of Keap1 protein, which promotes the dissociation and activation of nuclear erythroid factor 2 - related factor 2 (Nrf2), responsible for scavenging ROS through the activation of antioxidant enzymes, preventing DNA damage, and protecting cell membranes (Gerszon et al., 2014; Neves et al., 2012). Resveratrol's strong ability to remove free radicals is also related to the existence of three hydroxyl groups in positions 3, 4' and 5 and the presence of a double bond in the molecule and aromatic rings (Gerszon et al., 2014).

GPx is a cytosolic selenium-containing enzyme, whose major function is to catalyze the reduction of  $H_2O_2$ , using it as a substrate for the oxidation of reduced glutathione (GSH), producing water and oxidized glutathione (GSSG) (Kehrer et al., 2010; Pisoschi and Pop, 2015; Sarikaya and Doğan, 2020). In the cell, GluRed is responsible for maintaining GSH levels by catalyzing the reduction of GSSG to GSH, using nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) as a cofactor (Couto et al., 2016; Kehrer et al., 2010; Sarikaya and Doğan, 2020).

In order to explain the cardioprotective effects of resveratrol, numerous mechanisms have been studied. A study performed by Caseiro *et al.* revealed that regular intake of resveratrol seems to be a preventive approach to cardiovascular diseases, due to its capacity to upregulate the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), which results in the production of a powerful vasodilator – nitric oxide (NO) and a consequent reduction in blood pressure (Banez et al., 2020; Breuss et al., 2019; Caseiro et al., 2019; Colica et al., 2018; Li et al., 2019; Neves et al., 2012). Concurrently, it suppresses endothelin-1 (ET-1) production, maintaining a balance between vasodilators and vasoconstrictors, preventing atherogenesis and vascular damage (Colica et al., 2018; Li et al., 2019). Further vasculoprotective mechanisms involve inhibition of platelet aggregation and reduction of vascular oxidative stress (Banez et al., 2020; Colica et al., 2018; Li et al., 2019).

ET-1, a potent vasoconstrictor, is the main member of the endothelin peptide family (Barton and Yanagisawa, 2019; Li et al., 2019). Despite being produced by almost every cell type, its highest expression has been reported in smooth muscle cells, cardiac myocytes, vascular endothelial cells and fibroblasts (Barton and Yanagisawa, 2019). Overproduction of this peptide is related to the development of atherosclerosis and vascular disease (Li et al., 2019).

The regulation of inflammatory response is one of the main protective mechanisms of resveratrol. Its anti-inflammatory effects include the inhibition of the production and release of pro-inflammatory mediators and cytokines, such as interleukins (IL) 1, 6, and 8, tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), and

de mediadores pró-inflamatórios e citocinas, tais como as interleucinas (IL) 1, 6, e 8, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), e proteína C-reativa (PCR) (Akhondzadeh et al., 2020; Banez et al., 2020; Haghghatdoost and Hariri, 2019; Neves et al., 2012). Adicionalmente, inibe a transcrição inflamatória do fator nuclear *kappa-light-chain enhancer of activated B cells* (NF- $\kappa$ B), e suprime a expressão das enzimas pró-inflamatórias ciclo-oxigenase-1 e 2 (COX-1 e COX-2, respetivamente), levando à supressão da produção de eicosanóides (Akhondzadeh et al., 2020; Banez et al., 2020; Breuss et al., 2019; Neves et al., 2012).

A IL-6 e o TNF- $\alpha$ , produzidos por macrófagos e linfócitos, são maioritariamente sintetizados em inflamação de baixo e alto grau. A produção de PCR ocorre principalmente no fígado, em resposta à inflamação, mas concentrações crescentes de IL-6 e TNF- $\alpha$  conduzem também à sua secreção (Haghghatdoost and Hariri, 2019).

Este estudo teve como objetivo compreender melhor o papel e as vias de atuação do resveratrol nas defesas antioxidantes enzimáticas endógenas e na função vascular, assim como o seu potencial papel na redução da inflamação.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO EM ESTUDO E ESTRATÉGIA DE AVALIAÇÃO

Um total de 27 estudantes voluntários da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, clinicamente saudáveis, de ambos os sexos, com idades compreendidas entre os 18 e os 22 anos, participaram neste estudo. Estes foram randomizados em dois grupos: controlo (GC, n=12), cujos participantes ingeriram diariamente uma quantidade padronizada de placebo (100 mg de farinha); e um grupo experimental (GE, n=15), suplementado diariamente com 100 mg de resveratrol, durante 30 dias consecutivos. Foi realizada uma amostragem não probabilística de conveniência (Caseiro et al., 2019).

Com base nos critérios do estudo, nenhum dos participantes praticava exercício físico. Indivíduos portadores de patologias, incluindo patologias da cavidade oral, fumadores e indivíduos submetidos a qualquer fármaco ou suplementação, excetuando o contraceptivo oral, foram excluídos do estudo (Caseiro et al., 2019).

A metodologia do estudo integrou duas etapas de avaliação: uma avaliação basal (T0) e uma avaliação realizada trinta dias após a suplementação diária com resveratrol e placebo (T1). Em ambas as etapas foram realizadas colheitas sanguíneas e medição da pressão arterial a todos os participantes (Caseiro et al., 2019).

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Instituto Politécnico de Coimbra, e foi realizado de acordo com os princípios da Declaração de Helsínquia, assegurando a confidencialidade dos dados. Todos os indivíduos participaram de forma voluntária na realização deste estudo e deram o seu consentimento informado por escrito.

### 2.2 COLHEITA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Com recurso a um equipamento automático (*Classe A - Colson MAM BP 3AA1-2<sup>o</sup>; Colson, Paris*), a medição da pressão arterial de repouso foi efetuada na artéria braquial, após um período de repouso de 10 minutos em decúbito dorsal. Para

C-reactive protein (CRP) (Akhondzadeh et al., 2020; Banez et al., 2020; Haghghatdoost and Hariri, 2019; Neves et al., 2012). In addition, it inhibits the inflammatory transcription nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells, (NF- $\kappa$ B) and suppresses the expression of proinflammatory enzymes cyclooxygenase-1 and 2 (COX-1 and COX-2, respectively), leading to the repression of the production of eicosanoids (Akhondzadeh et al., 2020; Banez et al., 2020; Breuss et al., 2019; Neves et al., 2012).

IL-6 and TNF- $\alpha$ , produced by macrophages and lymphocytes, are mostly synthesized in low- and high-grade inflammation. The production of CRP occurs primarily in the liver, in response to inflammation, but rising concentrations of IL-6 and TNF- $\alpha$  also lead to its secretion (Haghghatdoost and Hariri, 2019).

This study aimed to further understand the role and pathways of resveratrol in endogenous enzymatic antioxidant defenses and vascular function, as well as its potential role in reducing inflammation.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 SAMPLE CHARACTERIZATION AND EVALUATION STRATEGY

A total of 27 clinically healthy volunteer students of both genders, aged 18 to 22 years old, from Coimbra Health School, participated in this study. The students were randomized into two groups: control (CG, n=12), whose participants ingested daily a standardized amount of placebo (100 mg of flour); and an experimental group (EG, n=15), supplemented daily with 100 mg of resveratrol, for 30 consecutive days. A non-probability convenience sampling was performed (Caseiro et al., 2019).

According to the study criteria, none of the participants practiced physical exercise. Individuals with any disease, including oral cavity pathologies, smokers, and individuals taking any drug or supplementation other than oral contraceptives, were excluded from the trial (Caseiro et al., 2019).

The study incorporates two evaluation steps: a basal evaluation (T0) and an evaluation performed thirty days after daily resveratrol and placebo supplementation (T1). Blood pressure measurement and sampling were performed in both evaluation stages, to all participants (Caseiro et al., 2019).

This trial was approved by the Ethics Committee of the Polytechnic Institute of Coimbra and was performed in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki, ensuring the confidentiality of data. All participants joined voluntarily to this study and provided written informed consent.

### 2.2 SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Using an automatic device (*Class A - Colson MAM BP 3AA1-2<sup>o</sup>; Colson, Paris*), resting blood pressure was measured in the brachial artery after a 10-minute rest period in dorsal decubitus. In addition to heart rate, brachial systolic blood pressure (bSBP), brachial diastolic blood pressure (bDBP), brachial mean arterial pressure (bMAP), and brachial pulse pressure (bPP) were considered for analysis. After this procedure, central arterial pressure was measured by pulse wave analysis (PWA) using Complior<sup>o</sup> Analyse (Alam Medical, Saint-Quentin-Fallavier,

além da frequência cardíaca, a pressão arterial sistólica braquial (bSBP), pressão arterial diastólica braquial (bDBP), pressão arterial média braquial (bMAP) e pressão de pulso braquial (bPP), foram consideradas para análise. Após este procedimento, procedeu-se à medição da pressão arterial central, através da análise da onda de pulso (*pulse wave analysis – PWA*), com recurso ao *Complior® Analyse* (Alam Medical, Saint-Quentin-Fallavier, France) (Caseiro et al., 2019).

A pressão arterial sistólica central (cSBP), pressão arterial diastólica central (cDBP), pressão arterial média central (cMAP) e a pressão diferencial central (cPP) foram também consideradas. É de salientar que, em todas as avaliações, o participante estava isento da ingestão de álcool, café, e tabaco (Caseiro et al., 2019).

Foram realizadas colheitas de amostras sanguíneas, em jejum, aos 27 indivíduos em estudo, nos momentos T0 e T1, obtendo-se um total de 54 amostras de sangue venoso. A colheita das amostras foi efetuada por punção sanguínea, em tubos contendo ácido etilenodiamino tetracético tri-potássico ( $K_3EDTA$ ) e em tubos de gel seco. Seguidamente, as amostras foram sujeitas a uma centrifugação de 10 minutos, a 3000g, a 4°C e armazenadas a -80°C até à sua análise (Caseiro et al., 2019).

Utilizando o analisador clínico automatizado *Prestige 24i* e, recorrendo aos kits *Prestige 24i*, da *Cormay* (Varsóvia, Polónia), procedeu-se ao doseamento de colesterol total, colesterol de lipoproteínas de baixa (LDL) e alta (HDL) densidade, glicose, triglicéridos, ureia, creatinina, albumina, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) (Caseiro et al., 2019).

### 2.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

A avaliação laboratorial da atividade enzimática foi conduzida em ambos os grupos (CG e EG) em T0 e T1.

A avaliação da atividade da GPx foi efetuada em amostras de soro utilizando o *kit RANSEL* (Randox® Lab., Crumlin, Reino Unido). O método baseia-se nos princípios propostos por Paglia e Valentine, nos quais a GPx catalisa a oxidação da GSH através do hidroperóxido de cumeno. Na presença de GluRed e NADPH, a GSSH é reduzida a GSH, com a simultânea oxidação de NADPH, resultando na diminuição da absorvância. A leitura espectrofotométrica foi realizada a 340nm, seguida do cálculo da atividade enzimática através da seguinte fórmula:  $U/L = 8412 \times \Delta A_{340nm}/\text{minuto}$  (Kraus and Ganther, 1980; Paglia and Valentine, 1967; Prohaska et al., 1977).

A medição da atividade da GluRed sérica foi realizada com recurso ao *kit GluRed* (Randox® Lab., Crumlin, Reino Unido). O princípio do método baseia-se na medição da diminuição da absorvância quando o NADPH é oxidado a  $NADP^+$ . A leitura espectrofotométrica das amostras foi realizada a 340nm, seguida do cálculo da atividade enzimática através da seguinte fórmula:  $U/L = 4983 \times \Delta A_{340nm}/\text{minuto}$ .

### 2.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS VASCULARES E INFLAMATÓRIOS

A análise de ET-1, TNF- $\alpha$  e IL-6, por *slot blot*, foi realizada de acordo com Caseiro *et al.* (Caseiro et al., 2012a). As amostras de soro foram diluídas em solução salina *Tris-buffered* (TBS) para alcançar uma concentração proteica final de 0,02  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , e um volume de

(France) (Caseiro et al., 2019)

Central systolic blood pressure (cSBP), central diastolic blood pressure (cDBP), central mean arterial pressure (cMAP), and central differential pressure (cPP) were also considered. It should be noted that at all assessments, the participants were free of alcohol intake, coffee, and smoking (Caseiro et al., 2019).

Fasting blood samples were collected from the 27 study subjects at T0 and T1, obtaining a total of 54 venous blood samples. The samples were collected by blood puncture in tubes containing tri-potassium ethylenediaminetetraacetic acid ( $K_3EDTA$ ) and in dry gel tubes. The samples were then centrifuged for 10 minutes at 3000g at 4°C and plasma and serum stored at -80°C until analysis (Caseiro et al., 2019).

Using the *Prestige 24i* automated clinical analyzer and, with the *Prestige 24i* kits from *Cormay* (Warsaw, Poland), total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), glucose, triglycerides, urea, creatinine, albumin, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were determined (Caseiro et al., 2019).

### 2.3 EVALUATION OF THE ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES

Laboratory evaluation of enzyme activity was conducted in both groups (CG and EG) at T0 and T1. The evaluation of GPx activity was performed in serum samples using the *RANSEL* kit (Randox® Lab., Crumlin, UK). The method is based on the principles proposed by Paglia and Valentine, in which GPx catalyzes the oxidation of GSH through cumene hydroperoxide. When GluRed and NADPH are present, GSSH is reduced to GSH, with the simultaneous oxidation of NADPH, resulting in a decrease in absorbance. Spectrophotometric reading was performed at 340nm, followed by calculation of enzyme activity using the following formula:  $U/L = 8412 \times \Delta A_{340nm}/\text{minute}$ . (Kraus and Ganther, 1980; Paglia and Valentine, 1967; Prohaska et al., 1977).

Measurement of GluRed activity in serum was performed using the *GluRed* kit (Randox® Lab., Crumlin, UK). The principle of the method is based on the measurement of the decrease in absorbance when NADPH is oxidized to  $NADP^+$ . Spectrophotometric reading of the samples was performed at 340nm, followed by calculation of the enzyme activity using the following formula:  $U/L = 4983 \times \Delta A_{340nm}/\text{minute}$ .

### 2.4 EVALUATION OF VASCULAR AND INFLAMMATORY PARAMETERS

The slot blot analysis of ET-1, TNF- $\alpha$ , and IL-6 was performed according to Caseiro et al. (Caseiro et al., 2012a). Serum samples were diluted in Tris-buffered saline (TBS) to achieve a final protein concentration of 0.02  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  and a volume of 100, 250, and 300  $\mu\text{L}$  was slot-blotted into a nitrocellulose membrane (Whatman®, Protan®), depending on the required parameter (IL-6, TNF- $\alpha$ , and ET-1, respectively). The membranes were blocked with 5% (w/v) dry nonfat milk in TBS-Tween (TBS-T) and incubated with primary antibodies (anti-IL-6, anti-TNF- $\alpha$ , and anti-ET-1), diluted 1:1000 in blocking solution, for three hours at room temperature, under constant stirring. Once the incubation was complete, the membranes were washed three

100, 250 e 300  $\mu\text{L}$  foi aplicado em membranas de nitrocelulose (*Whatman*<sup>®</sup>, *Protan*<sup>®</sup>), dependendo do parâmetro requerido (IL-6, TNF- $\alpha$ , e ET-1, respectivamente). As membranas foram bloqueadas com 5% (m/v) de leite seco magro em TBS-*Tween* (TBS-T) e incubadas com anticorpos primários (anti-IL-6, anti-TNF- $\alpha$ , e anti-ET-1) diluídos 1:1000 em solução de bloqueio, durante três horas à temperatura ambiente, sob agitação constante. Terminada a incubação, as membranas foram lavadas três vezes, 10 minutos cada, com TBS-T, e incubadas novamente durante três horas com anticorpos secundários (*horseradish-conjugated anti-mouse*, *GE Healthcare, Buckinghamshire, UK*) numa diluição de 1:1000. Seguindo o mesmo procedimento anteriormente mencionado, procedeu-se, de novo, à lavagem das membranas (Caseiro et al., 2012a; Caseiro et al., 2019; Caseiro et al., 2012b).

A detecção foi realizada por quimioluminescência, de acordo com as instruções do fabricante (*GE Healthcare, Pittsburgh, Reino Unido*), expondo o filme fotográfico *Kodak BioMax Light (Carestream Health, Rochester, EUA)* numa cassete *Kodak X-OMAT (Carestream Health, Rochester, EUA)* durante 15 minutos. As imagens do filme foram obtidas utilizando o sistema *GelDoc XR (Bio-Rad)* e a análise quantitativa das bandas foi realizada com o software *ImageLab*<sup>®</sup> Versão 3.0 (*Bio-Rad, EUA*) (Caseiro et al., 2012a; Caseiro et al., 2019; Caseiro et al., 2012b).

## 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tratamento estatístico dos dados foi realizado recorrendo ao software *IBM SPSS*<sup>®</sup> v.27 (*National Opinion Research Center, Chicago, EUA*). Dado o tamanho da população, a normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de *Shapiro-Wilk* ( $n \leq 50$ ). A assimetria e achatamento, foram avaliados pelo coeficiente de *Skewness* (*Skewness/(Skewness Std error)*) e *Kurtosis* (*Kurtosis/(Kurtosis Std error)*), respectivamente. Considera-se uma distribuição simétrica e mesocúrtica na presença de valores contidos no intervalo [-1,96 - +1,96].

As variações internas de cada grupo foram avaliadas usando o teste não paramétrico *T-Wilcoxon* e o seu equivalente paramétrico, *t-Student* para 2 amostras emparelhadas. As diferenças entre os grupos foram estimadas utilizando o teste não paramétrico *Wilcoxon-Mann-Whitney* e o seu equivalente paramétrico, *t-Student* para 2 amostras independentes. Para analisar a correlação entre os parâmetros obtidos, bem como entre outros previamente determinados, foi aplicada a correlação de *Pearson*.

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, expresso em unidades arbitrárias (UA), para resultados obtidos por *slot blot*, e unidades por litro (U/L), para a atividade enzimática, e considerados estatisticamente significativos assumindo um erro aleatório  $p \leq 0,05$ , com um nível de confiança superior a 95%.

## 3. RESULTADOS

### 3.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA GPx

No que respeita à atividade da GPx no GC, observamos um ligeiro decréscimo, não significativo, entre o primeiro ( $\bar{x} = 510,083 \pm 126,932$  U/L) e o segundo momento de avaliação ( $\bar{x} = 423,334 \pm 138,244$  U/L) (DM = 86,749 U/L;  $p = 0,136$ , Tabela 1). No que concerne ao GE, verificamos uma tendência de incremento da atividade enzimática antioxidante de T0 para T1, sem significado

times, 10 minutes each, with TBS-T, and incubated for a further three hours with secondary antibody (*horseradish-conjugated anti-mouse*, *GE Healthcare, Buckinghamshire, UK*) in a dilution of 1:1000. Following the same procedure previously mentioned, the membranes were once again washed (Caseiro et al., 2012a; Caseiro et al., 2019; Caseiro et al., 2012b).

Detection was performed with enhanced chemiluminescence, in agreement with the manufacturer's instructions (*GE Healthcare, Pittsburgh, UK*), by exposing *Kodak BioMax Light* photographic film (*Carestream Health, Rochester, USA*) on a *Kodak X-OMAT Cassette* (*Carestream Health, Rochester, USA*) for 15 minutes. Film images were achieved using *GelDoc XR* system (*Bio-Rad*) and quantitative slot blot analysis was performed with *ImageLab*<sup>®</sup> software Version 3.0 (*Bio-Rad, USA*) (Caseiro et al., 2012a; Caseiro et al., 2019; Caseiro et al., 2012b).

## 2.5 STATISTICAL ANALYSIS

Statistical treatment of data was achieved using *IBM SPSS*<sup>®</sup> v.27 software (*National Opinion Research Center, Chicago, USA*). As the population is composed of 27 individuals, data normality was assessed by the *Shapiro-Wilk* test ( $n \leq 50$ ). Symmetry and flatness were evaluated by the *Skewness* (*Skewness/(Skewness Std error)*) and *Kurtosis* (*Kurtosis/(Kurtosis Std error)*) coefficient, respectively. Distribution tends to be symmetric and mesokurtic in the presence of values within the interval [-1,96 - +1,96].

Internal variations within each group were evaluated using the non-parametric *Wilcoxon's T-test* and its parametric equivalent *Paired-Samples T-Test*. Differences between the groups were estimated using the nonparametric *Wilcoxon-Mann-Whitney Test* and its parametric equivalent *Independent-Samples T-Test*. To analyze the correlation between the obtained parameters, as well as between others previously determined, *Pearson's correlation* was applied.

The results were presented as mean  $\pm$  standard deviation, expressed in arbitrary units (AU), for results obtained by slot blot, or units per liter (U/L), for antioxidant enzyme activity, and considered statistically significant assuming a random error  $p \leq 0.05$ , with a confidence level greater than 95%.

## 3. RESULTS

### 3.1 EVALUATION OF GPx ACTIVITY

Regarding GPx activity in the CG, we observed a slight, non-significant, decrease between the first ( $\bar{x} = 510.083 \pm 126.932$  U/L) and the second moment of evaluation ( $\bar{x} = 423.334 \pm 138.244$  U/L) (mean difference (MD) = 86.749 U/L;  $p = 0.136$ , Table 1).

Concerning the EG, we noticed an increasing tendency of antioxidant enzyme activity from T0 to T1, without statistical significance (MD = -28,461 U/L;  $p = 0,585$ , Table 2).

Analyzing the first moment of evaluation, we found no statistically significant results between the two groups ( $M_{CG} = 510.083 \pm 126.932$  U/L;  $M_{EG} = 542.069 \pm 112.685$  U/L;  $t_{obs} = -0.693$ ;  $df = 25$ ;  $p = 0.495$ ; MD = -31.987 U/L). In contrast, statistically significant results were observed between the two groups, at T1 ( $M_{CG} = 423.334 \pm 138.244$  U/L;  $M_{EG} = 570.530 \pm 136.266$  U/L;  $U = 33.0$ ;  $p = 0.005$ ; MD = -147.196 U/L, Table 3).

estatístico (DM = -28,461 U/L;  $p = 0,585$ , Tabela 2). Analisando o primeiro momento temporal, não observamos diferenças significativas entre os dois grupos ( $M_{GC} = 510,083 \pm 126,932$  U/L;  $M_{GE} = 542,069 \pm 112,685$  U/L;  $tobs = -0,693$ ;  $gl = 25$ ;  $p = 0,495$ ; DM = -31,987 U/L). Ao invés, resultados estatisticamente significativos foram observados entre os dois grupos, em T1 ( $M_{GC} = 423,334 \pm 138,244$  U/L;  $M_{GE} = 570,530 \pm 136,266$  U/L;  $U = 33,0$ ;  $p = 0,005$ ; DM = -147,196 U/L) (Tabela 3).

**Tabela/Table 1:** Resultados estatísticos do GC pré e pós-suplementação/Statistical results of CG before and after supplementation.

	Pré-Suplementação/ Before Supplementation	Pós-Suplementação/ After Supplementation		<	>	=	
	M (DP)/(SD)	M (DP)/(SD)	DM (DP)/MD (SD)	n (%)	n (%)	n (%)	p-value
GPx	510,083 (126,932)	423,334 (138,244)	86,749 (205,790)	9 (75%)	3 (25%)	0	0,136(a)
GluRed	25,053 (10,053)	41,387 (10,177)	-16,333 (15,038)	1 (8,3%)	10 (83,4%)	1 (8,3%)	0,004(a)
ET-1	0,281 (0,141)	0,265 (0,111)	0,016 (0,064)	8 (73%)	3 (27%)	0	0,248(a)
TNF- $\alpha$	0,399 (0,108)	0,397 (0,184)	0,002 (0,161)	5 (42%)	7 (58%)	0	0,937(a)
IL-6	0,091 (0,051)	0,078 (0,043)	0,013 (0,026)	8 (67%)	4 (33%)	0	0,182(a)

a - Teste T de Wilcoxon; DM - Diferença Média; DP - Desvio Padrão; ET-1 - Endotelina 1; GC (n=12); GE (n=15); GluRed - Glutathione Redutase; GPx - Glutathione Peroxidase; IL-6 - Interleucina-6; M- Média; Medição da actividade enzimática antioxidante em U/L e dos parâmetros vasculares e inflamatórios em UA; TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral Alfa/GPx - Glutathione Peroxidase; GluRed - Glutathione Reductase; ET-1 - Endothelin 1; TNF- $\alpha$  - Tumor Necrosis Factor-Alpha; IL-6 - Interleukin-6; M- Mean; SD - Standard Deviation; MD - Mean Difference; a - Wilcoxon's T-Test; Measurement of antioxidant enzyme activity on U/L and of vascular and inflammatory parameters on AU; CG (n=12); EG (n=15)

**Tabela/Table 2:** Resultados estatísticos do GE pré e pós-suplementação/Statistical results of EG before and after supplementation.

	Pré-Suplementação/ Before Supplementation	Pós-Suplementação/ After Supplementation		<	>	=	
	M (DP)/(SD)	M (DP)/(SD)	DM (DP)/MD (SD)	n (%)	n (%)	n (%)	p-value
GPx	542.069 (112.685)	570.530 (136.266)	-28.461 (197, 195)	6 (40%)	9 (60%)	0	0.585(a)
GluRed	34.881 (9.946)	37.649 (7.176)	-2.768 (8.782)	3 (20%)	11 (73.3%)	1 (6.7%)	0.186(b)
ET-1	0.273 (0.157)	0.285 (0.207)	-0.013 (0.176)	6 (40%)	9 (60%)	0	0.910(b)
TNF- $\alpha$	0.405 (0.275)	0.435 (0.416)	-0.030 (0.291)	8 (57%)	6 (43%)	0	0.397(b)
IL-6	0.089 (0.055)	0.088 (0.053)	0.001 (0.019)	8 (53%)	7 (47%)	0	0.733(b)

a - Teste T de Wilcoxon; DM - Diferença Média; DP - Desvio Padrão; ET-1 - Endotelina 1; GC (n=12); GE (n=15); GluRed - Glutathione Redutase; GPx - Glutathione Peroxidase; IL-6 - Interleucina-6; M- Média; Medição da actividade enzimática antioxidante em U/L e dos parâmetros vasculares e inflamatórios em UA; TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral Alfa/GPx - Glutathione Peroxidase; GluRed - Glutathione Reductase; ET-1 - Endothelin 1; TNF- $\alpha$  - Tumor Necrosis Factor-Alpha; IL-6 - Interleukin-6; M- Mean; SD - Standard Deviation; MD - Mean Difference; a - Paired-samples T-Test; b - Wilcoxon's T-Test; Measurement of antioxidant enzyme activity on U/L and of vascular and inflammatory parameters on AU; CG (n=12); EG (n=15).

**Tabela/Table 3:** Comparação entre GC e GE./Comparison between CG and EG.

	CG	GE/EG		
	M ( $\pm$ DP)/( $\pm$ SD)	M ( $\pm$ DP)/( $\pm$ SD)	DM/MD	p-value
GPx_A	510.083 (126.932)	542.069 (112.685)	-31.987	0.495 <sup>(a)</sup>
GPx_B	423.334 (138.244)	570.530 (136.266)	-147.196	0.005 <sup>(b)</sup>
GluRed_A	25.053 (10.053)	34.881 (9.946)	-9.828	0.013 <sup>(b)</sup>
GluRed_B	41.387 (10.177)	37,649 (7.176)	3,737	0,432 <sup>(b)</sup>
ET-1_A	0.281 (0.141)	0,273 (0.157)	0,008	0,697 <sup>(b)</sup>
ET-1_B	0.265 (0.111)	0,285 (0.207)	-0,021	0,659 <sup>(b)</sup>
TNF- $\alpha$ _A	0.399 (0.108)	0,405 (0.275)	-0,006	0,959 <sup>(b)</sup>
TNF- $\alpha$ _B	0.397 (0.184)	0,435 (0.416)	-0,038	0,837 <sup>(b)</sup>
IL-6_A	0.091 (0.051)	0,089 (0.055)	0,002	1,000 <sup>(b)</sup>
IL-6_B	0.078 (0.043)	0,088 (0.053)	-0,010	0,526 <sup>(b)</sup>

a - Teste t-Student para amostras independentes; b - Teste Wilcoxon-Mann-Whitney; A - Pré-Suplementação; B - Pós-Suplementação; DM - Diferença Média; DP - Desvio Padrão; ET-1 - Endotelina 1; GC (n=12); GE (n=15); GluRed - Glutathione Redutase; GPx - Glutathione Peroxidase; IL-6 - Interleucina-6; M- Média; Medição da actividade enzimática antioxidante em U/L e dos parâmetros vasculares e inflamatórios em UA; TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral Alfa/GPx - Glutathione Peroxidase; GluRed - Glutathione Reductase; ET-1 - Endothelin 1; TNF- $\alpha$  - Tumor Necrosis Factor-Alpha; IL-6 - Interleukin-6; B - Before Supplementation; A - After Supplementation; M - Mean; SD - Standard Deviation; MD - Mean Difference; a - Independent-samples T-Test; b - Wilcoxon-Mann-Whitney Test; Measurement of antioxidant enzyme activity on U/L and of vascular and inflammatory parameters on AU; CG (n=12); EG (n=15).

### 3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLURED

Averiguando os dados do GC, concluímos que os indivíduos apresentaram, em média, níveis mais elevados de GluRed em T1 ( $\bar{x}=41,387\pm 10,177$  U/L), comparativamente a T0 ( $\bar{x}=25,053\pm 10,053$  U/L), sendo estes resultados estatisticamente significativos ( $DM=-16,333$  U/L;  $p=0,004$ ). Podemos acrescentar que, da totalidade de indivíduos suplementados com placebo (12), 1 (8,3%) apresentou níveis de GluRed mais baixos após a suplementação, 10 (83,4%), revelaram níveis de GluRed superiores no segundo momento de avaliação e 1 indivíduo (8,3%) manteve os níveis de GluRed em T0 e T1 (Tabela 1).

Relativamente ao GE, verificamos tendência de aumento da atividade enzimática antioxidante após a suplementação com resveratrol, mas não foi estatisticamente significativa ( $p=0,186$ , Tabela 2).

Avaliando cada um dos momentos temporais, resultados estatisticamente significativos foram observados no período basal ( $M_{GC}=25,053\pm 10,053$  U/L;  $M_{GE}=34,881\pm 9,946$  U/L;  $U=39,0$ ;  $p=0,013$ ;  $DM=-9,828$  U/L). O mesmo não se verificou no período pós suplementação ( $M_{GC}=41,387\pm 10,177$  U/L;  $M_{GE}=37,649\pm 7,176$  U/L;  $U=74,0$ ;  $p=0,432$ ;  $DM=3,737$  U/L, Tabela 3).

### 3.3 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ET-1

No que respeita ao GC, não se observaram diferenças significativas em T1 ( $\bar{x}=0,265\pm 0,111$  UA), comparativamente ao período basal ( $\bar{x}=0,281\pm 0,141$  UA) ( $DM=0,016$  UA;  $p=0,248$ , Tabela 1).

Relativamente ao GE, não observamos diferenças significativas entre o primeiro ( $\bar{x}=0,273\pm 0,157$  UA) e o segundo momento de avaliação ( $\bar{x}=0,285\pm 0,207$  UA) ( $DM=-0,013$  UA;  $p=0,91$ , Tabela 2).

Avaliando cada um dos momentos temporais nos grupos em estudo, não registamos diferenças significativas em T0 ( $M_{GC}=0,281\pm 0,141$  UA;  $M_{GE}=0,273\pm 0,157$  UA;  $U=75,0$ ;  $p=0,697$ ;  $DM=0,008$  UA) nem T1 ( $M_{GC}=0,265\pm 0,111$  UA;  $M_{GE}=0,285\pm 0,207$  UA;  $U=74,0$ ;  $p=0,659$ ;  $DM=-0,021$  UA) (Tabela 3).

### 3.4 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE TNF-A

Considerando o GC, verificamos uma ligeira redução, não significativa, em T1 ( $\bar{x}=0,397\pm 0,184$  UA), relativamente a T0 ( $\bar{x}=0,399\pm 0,108$  UA) ( $DM=0,002$  UA;  $p=0,937$ ). Da totalidade de indivíduos suplementados com placebo (12), 5 (42%) apresentaram níveis de TNF- $\alpha$  inferiores após a suplementação com placebo. Porém, 7 (58%), revelaram níveis de TNF- $\alpha$  mais elevados no segundo momento de avaliação (Tabela 1).

No que concerne ao GE, observamos um ligeiro aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  após a suplementação ( $\bar{x}=0,435\pm 0,416$  UA), comparativamente ao período basal ( $\bar{x}=0,405\pm 0,275$  UA). Todavia, a DM não foi significativa ( $DM=-0,030$  UA;  $p=0,397$ ). Podemos inclusive referir que, da totalidade de indivíduos pertencentes ao GE (14), 8 (57%) apresentaram níveis de TNF- $\alpha$  inferiores após a suplementação com resveratrol, e 6 (43%), revelaram níveis de TNF- $\alpha$  mais elevados nesse período (Tabela 2).

Avaliando cada um dos momentos temporais nos grupos em estudo, não constatamos significativas no período basal

### 3.2 EVALUATION OF GLURED ACTIVITY

Observing the CG, we concluded that individuals had, in general, higher GluRed levels at T1 ( $\bar{x}=41.387\pm 10.177$  U/L), when compared to T0 ( $\bar{x}=25.053\pm 10.053$  U/L), being these results statistically significant ( $MD=-16.333$  U/L;  $p=0.004$ ). We can add that of the total number of subjects supplemented with placebo (12), 1 (8.3%) showed lower GluRed levels after supplementation, 10 (83.4%), showed higher GluRed levels at the second time point of evaluation, and 1 subject (8.3%) maintained GluRed levels at T0 and T1 (Table 1).

As for the EG, we found a rising trend in antioxidant enzyme activity after resveratrol supplementation, although it was not statistically significant ( $p=0.186$ , Table 2).

Evaluating each of the time points, statistically significant results were observed in the baseline period ( $M_{CG}=25.053\pm 10.053$  U/L;  $M_{EG}=34.881\pm 9.946$  U/L;  $U=39.0$ ;  $p=0.013$ ;  $MD=-9.828$  U/L). Opposite results were noticed in the post-supplementation period ( $M_{CG}=41.387\pm 10.177$  U/L;  $M_{EG}=37.649\pm 7.176$  U/L;  $U=74.0$ ;  $p=0.432$ ;  $MD=3.737$  U/L, Table 3).

### 3.3 EVALUATION OF SERUM ET-1 LEVELS

Concerning the CG, no significant differences were observed at T1 ( $\bar{x}=0.265\pm 0.111$  AU), compared to the baseline period ( $\bar{x}=0.281\pm 0.141$  AU) ( $MD=0.016$  UA;  $p=0.248$ , Table 1).

Examining the EG, we noted no significant differences between T0 ( $\bar{x}=0.273\pm 0.157$  AU) and T1 ( $\bar{x}=0.285\pm 0.207$  AU) ( $MD=-0.013$  UA;  $p=0.91$ , Table 2).

Assessing each of the time points in the study groups, there were no significant differences at T0 ( $M_{CG}=0.281\pm 0.141$  AU;  $M_{EG}=0.273\pm 0.157$  AU;  $U=75.0$ ;  $p=0.697$ ;  $MD=0.008$  AU) nor at T1 ( $M_{CG}=0.265\pm 0.111$  AU;  $M_{EG}=0.285\pm 0.207$  AU;  $U=74.0$ ;  $p=0.659$ ;  $MD=-0.021$  AU, Table 3).

### 3.4 EVALUATION OF SERUM TNF-A LEVELS

Analyzing the CG, we verified a mild, non-significant, reduction at T1 ( $\bar{x}=0.397\pm 0.184$  AU), compared to T0 ( $\bar{x}=0.399\pm 0.108$  AU) ( $MD=0.002$  AU;  $p=0.937$ ). Out of all placebo-supplemented subjects (12), 5 (42%) had lower TNF- $\alpha$  levels after placebo supplementation. However, 7 (58%), revealed higher TNF- $\alpha$  levels at the second time point of assessment (Table 1).

Regarding the EG, we found a slight increase in TNF- $\alpha$  levels after supplementation ( $\bar{x}=0.435\pm 0.416$  AU), compared to the period before supplementation ( $\bar{x}=0.405\pm 0.275$  AU). Yet, the MD was not significant ( $MD=-0.030$  AU;  $p=0.397$ ). We can also mention that of the total number of participants in the EG (14), 8 (57%) had lower TNF- $\alpha$  levels after resveratrol supplementation, and 6 (43%) had higher TNF- $\alpha$  levels in the same period (Table 2).

Evaluating each of the temporal moments in the study groups, no significant differences were observed between in the baseline ( $M_{CG}=0.399\pm 0.108$  AU;  $M_{EG}=0.405\pm 0.275$  AU;  $U=83.0$ ;  $p=0.959$ ;  $MD=-0.006$  AU) nor in the post-supplementation period ( $M_{CG}=0.397\pm 0.184$  AU;  $M_{EG}=0.435\pm 0.416$  AU;  $U=80.0$ ;  $p=0.837$ ;  $MD=-0.038$  AU, Table 3).

### 3.5 EVALUATION OF SERUM IL-6 LEVELS

Noting the GC results, no significant MD was identified between T0 ( $\bar{x}=0.091\pm 0.051$  AU) and T1 ( $\bar{x}=0.078\pm 0.043$  AU)



( $M_{GC} = 0,399 \pm 0,108$  UA;  $M_{GE} = 0,405 \pm 0,275$  UA;  $U = 83,0$ ;  $p = 0,959$ ;  $DM = -0,006$  UA) nem no período pós-suplementação ( $M_{GC} = 0,397 \pm 0,184$  UA;  $M_{GE} = 0,435 \pm 0,416$  UA;  $U = 80,0$ ;  $p = 0,837$ ;  $DM = -0,038$  UA) (Tabela 3).

### 3.5 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE IL-6

Observando os resultados do GC, não foram identificadas DM significativas entre T0 ( $\bar{x} = 0,091 \pm 0,051$  UA) e T1 ( $\bar{x} = 0,078 \pm 0,043$  UA) ( $DM = 0,013$  UA;  $p = 0,182$ , Tabela 1).

No que refere ao GE, verificamos uma tendência de redução dos níveis de IL-6 após a suplementação ( $\bar{x} = 0,088 \pm 0,053$  UA), comparativamente ao período basal ( $\bar{x} = 0,089 \pm 0,055$  UA). No entanto, a DM não foi estatisticamente significativa ( $DM = 0,001$  UA;  $p = 0,733$ , Tabela 2).

Considerando cada um dos momentos temporais nos grupos em estudo, também não foram verificadas diferenças significativas nos dois momentos de avaliação (Tabela 3).

### 3.6 CORRELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS EM ESTUDO E OS PREVIAMENTE ESTUDADOS

Analisando a figura 1, verificamos uma correlação positiva tendencialmente significativa entre as variáveis GluRed e GPx ( $r_{obs} = 0,327$ ;  $p$ -value =  $0,096$ ).

Considerando os dados, constatamos uma ligeira correlação negativa entre as variáveis ET-1 e bSBP, e bDBP ( $r_{obs} = -0,166$  e  $-0,230$ , respetivamente) (Figs 2 e 3). No entanto, os resultados não foram estatisticamente significativos ( $p = 0,418$  e  $0,259$ , respetivamente).

Observando o diagrama de dispersão referente às variáveis IL-6 e o TNF- $\alpha$ , notamos uma correlação linear moderadamente positiva e significativa entre elas ( $r_{obs} = 0,515$ ;  $p = 0,007$ ) (Fig 4). Em contrapartida, uma fraca correlação positiva, não significativa foi observada entre o TNF- $\alpha$  e a PCR ( $r_{obs} = 0,129$ ;  $p = 0,531$ ) (Fig. 5).

( $DM = 0,013$  UA;  $p = 0,182$ , Table 1).

With regard to EG, we found a decreasing tendency in IL-6 levels after supplementation ( $\bar{x} = 0.088 \pm 0.053$  AU), compared to the basal period ( $\bar{x} = 0.089 \pm 0.055$  AU). However, the MD was not statistically significant ( $MD = 0.001$  AU;  $p = 0.733$ , Table 2).

Considering each of the times in the study groups, there were also no significant differences at both evaluation moments (Table 3).

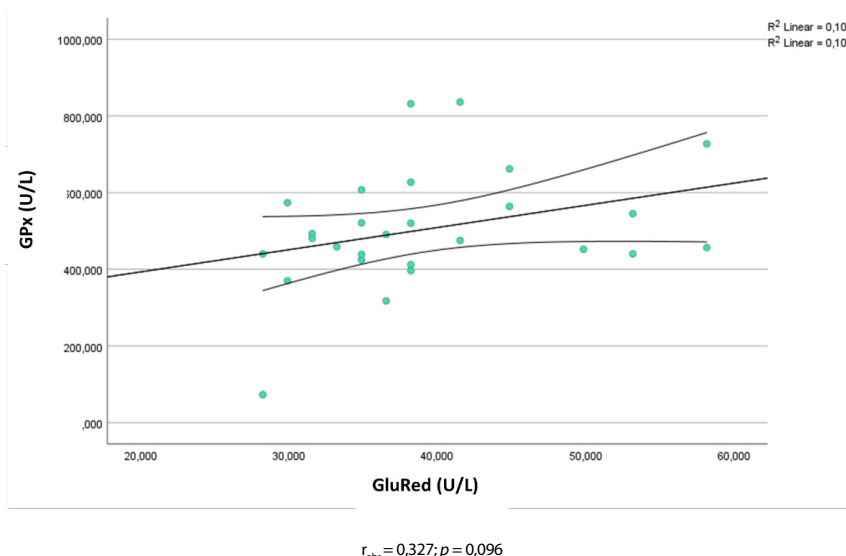
### 3.6 CORRELATION BETWEEN THE PARAMETERS UNDER STUDY AND THOSE PREVIOUSLY STUDIED

Analyzing figure 1, we verified a tendentially significant positive correlation between the variables GluRed and GPx ( $r_{obs} = 0.327$ ;  $p = 0.096$ ).

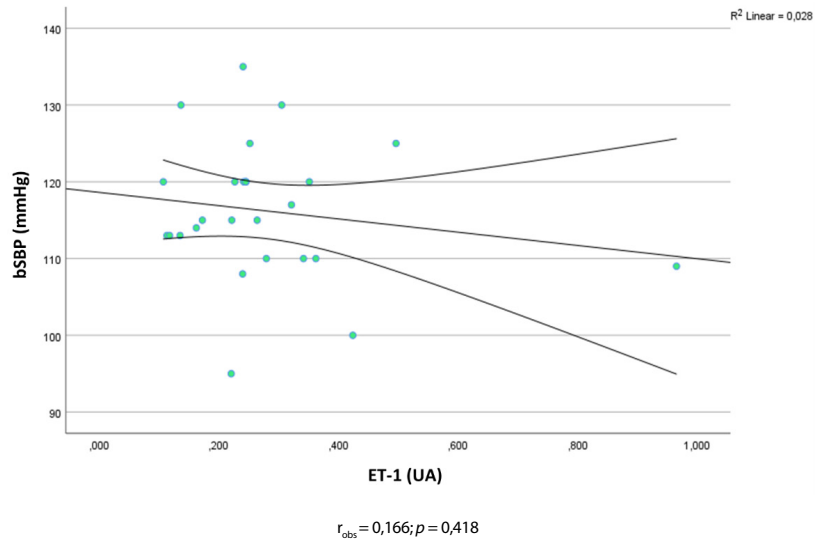
Considering the data, we found a slight negative correlation between the variables ET-1 and bSBP, and bDBP ( $r_{obs} = -0.166$  and  $-0.230$ , respectively) (Figs. 2 and 3). However, the results were not statistically significant ( $p = 0.418$  and  $0.259$ , respectively).

Observing the scatter/dot diagram regarding the variables IL-6 and TNF- $\alpha$  we noticed a moderately positive and significant linear correlation among them ( $r_{obs} = 0.515$ ;  $p = 0.007$ ) (Fig. 4)

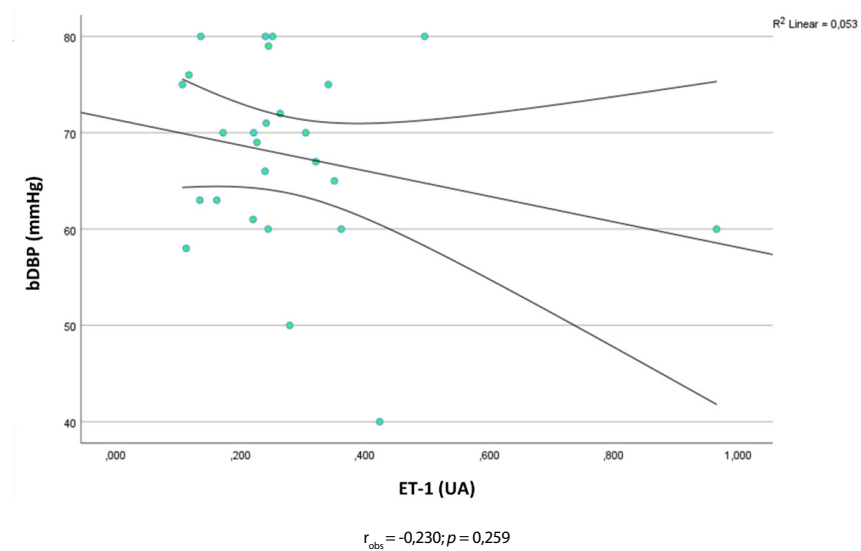
In contrast, a weak positive, non-significant correlation was observed between TNF- $\alpha$  and CRP ( $r_{obs} = 0.129$ ;  $p = 0.531$ ) (Fig. 5).



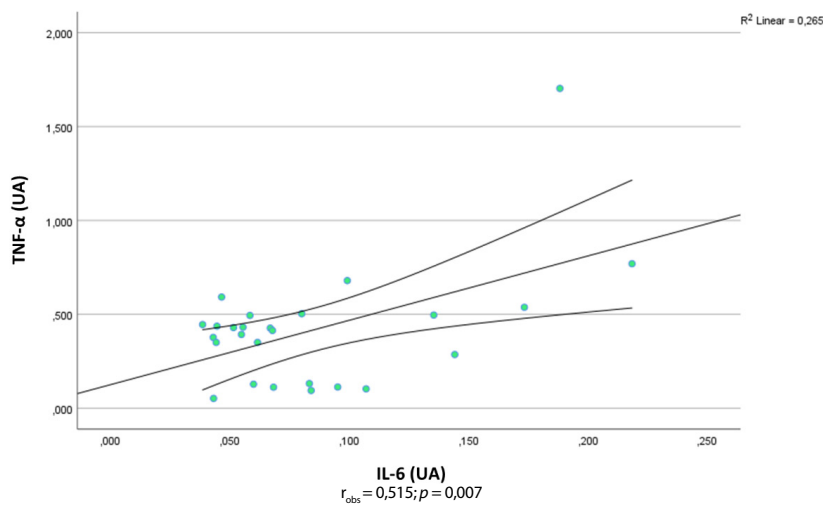
Figura/Figure 1: Correlação entre a atividade da GluRed e GPx/Correlation between GluRed and GPx activities.



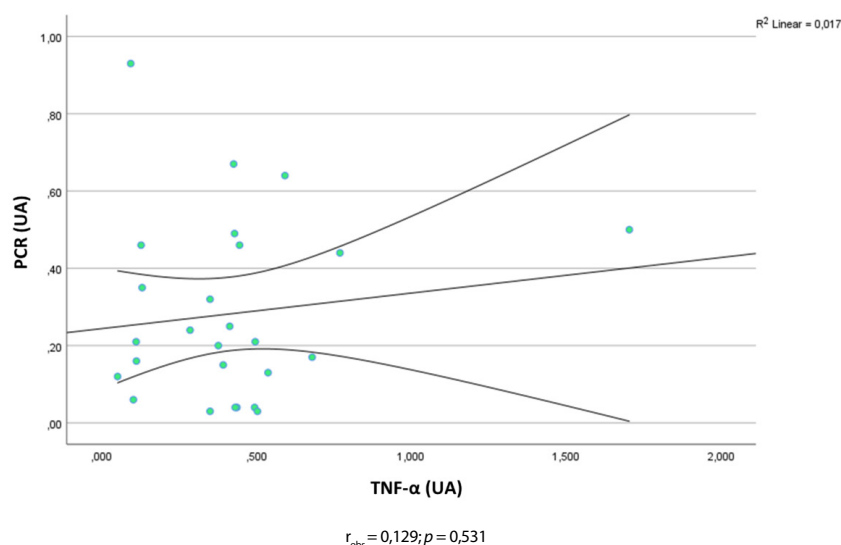
Figura/Figure 2: Correlação entre os níveis de ET-1 e bSBP/Correlation between ET-1 levels and bSBP.



Figura/Figure 3: Correlação entre os níveis de ET-1 e bDBP/Correlation between ET-1 and bDBP.



Figura/Figure 4: Correlação entre os níveis de IL-6 e TNF-α/Correlation between IL-6 and TNF-α levels.



Figura/Figure 5: Correlação entre os níveis de TNF- $\alpha$  e PCR/Correlation between TNF- $\alpha$  and CRP levels.

#### 4. DISCUSSÃO

As ROS são produtos do metabolismo do oxigênio, sendo continuamente produzidas em organismos aeróbios, tanto em condições fisiológicas como patológicas (Pisoschi and Pop, 2015; Pizzino et al., 2017; Rytsyk et al., 2020; Sinha and Dabla, 2015). O SO é um fenômeno que resulta do desequilíbrio entre a produção e eliminação de ROS, promovendo dano celular e molecular, contribuindo assim para o desenvolvimento de diversas doenças (Pisoschi and Pop, 2015; Pizzino et al., 2017; Tan et al., 2018).

Com o objetivo de reduzir os efeitos do SO, vários antioxidantes têm sido estudados (Pizzino et al., 2017). O resveratrol (3,5',4-trihidroxiestilbeno), é um composto antioxidante polifenólico, não flavonoide, de origem natural, que tem despertado interesse devido à sua vasta gama de propriedades, nomeadamente, antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-cancerígenas, anti-envelhecimento, neuro e cardioprotetoras (Colica et al., 2018; Gerszon et al., 2014; Neves et al., 2012).

O efeito antioxidante do resveratrol está associado ao aumento da expressão de enzimas responsáveis pela manutenção do equilíbrio redox na célula, incluindo a GluRed, a GPx e a SOD (Gerszon et al., 2014). A GPx é uma enzima citosólica que participa no sistema de defesa antioxidante, ao catalisar a redução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e hidroperóxidos orgânicos a água (Fanucchi, 2014; Kehrer et al., 2010; Pisoschi and Pop, 2015; Sarıkaya and Doğan, 2020). Na sua forma reduzida, a glutatona atua como antioxidante, eliminando os radicais livres, através da doação de um átomo de hidrogênio. A GluRed é responsável pela manutenção dos níveis de GSH celulares, catalisando a redução de GSSG a GSH, usando o NADPH como cofator (Guller et al., 2021; Kehrer et al., 2010).

Analisando os resultados, verificou-se uma tendência de redução da atividade da GPx no GC. Em oposição, verificou-se uma tendência de incremento da atividade antioxidante após a suplementação com resveratrol, no GE. No entanto, os resultados não foram estatisticamente significativos. Considerando cada um dos momentos temporais nos grupos em estudo, observamos valores significativamente superiores no grupo experimental, em T1. Assim, concluímos que a suplementação com resveratrol conduz a melhores resultados, estando este resultado de acordo

#### 4. DISCUSSION

ROS are by-products of oxygen metabolism, being continuously produced in aerobic organisms, under both physiological and pathological conditions (Pisoschi and Pop, 2015; Pizzino et al., 2017; Rytsyk et al., 2020; Sinha and Dabla, 2015). OS is a phenomenon that results from the imbalance between ROS production and elimination, resulting in cellular and molecular damage, contributing to the development of several diseases (Pisoschi and Pop, 2015; Pizzino et al., 2017; Tan et al., 2018).

Aiming to reduce the effects of OS, several antioxidants have been studied (Pizzino et al., 2017). Resveratrol (3,5',4-trihydroxystilbene), is a natural non-flavonoid antioxidant compound, which has raised attention due to its wide range of health properties, namely antioxidant, anti-inflammatory, anti-cancer, anti-aging, neuro, and cardioprotective properties (Colica et al., 2018; Gerszon et al., 2014; Neves et al., 2012).

The antioxidant effect of resveratrol is associated with increased expression of enzymes responsible for maintaining redox balance in the cell, including GluRed, GPx and SOD (Gerszon et al., 2014). GPx is a cytosolic enzyme that plays a role in the antioxidant defense system by catalyzing the reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and organic hydroperoxides to water (Fanucchi, 2014; Kehrer et al., 2010; Pisoschi and Pop, 2015; Sarıkaya and Doğan, 2020). In its reduced form, glutathione acts as an antioxidant, scavenging free radicals by donating a hydrogen atom. GluRed is responsible for maintaining cellular GSH levels by catalyzing the reduction of GSSG, produced by GPx, to GSH, using NADPH as a cofactor (Guller et al., 2021; Kehrer et al., 2010).

Analyzing the results, a decreased tendency in GPx activity was found in the CG. In contrast, there was a rising trend in antioxidant activity after resveratrol supplementation, in the EG. Nevertheless, the results were not statistically significant. Considering each of the time points in the study groups, we observed significantly higher values in the experimental group at T1. Thus, we conclude that resveratrol supplementation leads to better results, with this result being the expected outcome (AlBasher et al., 2020; Breuss et al., 2019; Kavaz et al., 2013; Wang

com o expectável (AlBasher et al., 2020; Breuss et al., 2019; Kavas et al., 2013; Wang et al., 2017; Yang et al., 2019).

No que respeita à GluRed, ambos os grupos apresentaram níveis séricos superiores no segundo momento de avaliação, comparativamente ao período basal. Contudo, apenas o GC revelou resultados significativos. Deste modo, deduzimos que o resveratrol não interferiu significativamente com a atividade da GluRed, refutando os resultados previamente descritos na literatura (AlBasher et al., 2020; Breuss et al., 2019; Kavas et al., 2013; Wang et al., 2017; Yang et al., 2019).

Observando a figura 1, verificamos uma correlação positiva tendencialmente significativa entre as variáveis GluRed e GPx, sendo este padrão de correlação observado em 10,7% dos participantes.

Das três isoformas, a ET-1 é a mais abundante no sistema cardiovascular humano, sendo maioritariamente produzida pelo endotélio vascular. Intitulada de vasoconstritor mais potente, é regulada positivamente por numerosos fatores, incluindo hipoxia, trombina, glucose e angiotensina II. Por outro lado, o NO é um dos inibidores mais potentes da sua produção (Breuss et al., 2019; Davenport et al., 2016; Houde et al., 2016; Li et al., 2019). Devido aos efeitos cardioprotetores do resveratrol e, de acordo com investigações prévias, é expectável uma redução dos níveis séricos de ET-1 após a suplementação (Breuss et al., 2019; Li et al., 2019).

Os níveis séricos de ET-1 após suplementação com resveratrol não apresentaram diferenças significativas. Estes achados sugerem que o resveratrol não interfere significativamente com os níveis séricos de ET-1, refutando a literatura previamente publicada. Segundo *Gliemann et al.*, estes resultados podem ser explicados pelo efeito atenuante do resveratrol nos parâmetros da função vascular, em indivíduos praticantes de exercício físico. Mais especificamente, o resveratrol mostrou um efeito adverso na redução da pressão arterial nestes participantes, rejeitando a hipótese de uma melhoria na saúde cardiovascular (Gliemann et al., 2013).

Comparando as variáveis em estudo com outras previamente estudadas, verificamos uma relação inversa entre a ET-1 e pressão arterial. Isto é, quando a ET-1 aumenta, a bSBP e bDBP diminui (Figs. 2 e 3, respetivamente).

O incremento do estado inflamatório é identificado pelo aumento da concentração de mediadores inflamatórios, tais como o TNF- $\alpha$  e a IL-6, como resultado da sua libertação extensiva (Haghighatdoost and Hariri, 2019; Koushki et al., 2018). O TNF- $\alpha$  é um dos principais mediadores da inflamação, que integra tanto a imunidade inata como adquirida (Silva et al., 2019; Zelova and Hosek, 2013). Concomitantemente, a IL-6 é considerada uma das citocinas mais importantes, não só na inflamação, mas também na resposta imunitária, hematopoiese e desenvolvimento embrionário. Em resposta a trauma ou infeção, esta citocina é secretada por múltiplos tipos de células, incluindo macrófagos, células T e fibroblastos (Hirano, 2021; Jones and Jenkins, 2018; Velazquez-Salinas et al., 2019). Diversos estudos classificam o resveratrol como suplemento anti-inflamatório, devido à sua capacidade de regular negativamente as vias inflamatórias e sinalização de citocinas, diminuindo a expressão de genes envolvidos neste processo (Akhondzadeh et al., 2020; Banez et al., 2020; Dyck et al., 2019; Haghighatdoost and Hariri, 2019; Neves et al., 2012).

et al., 2017; Yang et al., 2019).

Regarding GluRed, both groups showed higher serum levels at the second moment of evaluation compared to the baseline period. However, only the CG showed significant results. Therefore, we infer that resveratrol did not significantly interfere with GluRed activity, contradicting the results previously described in the literature (AlBasher et al., 2020; Breuss et al., 2019; Kavas et al., 2013; Wang et al., 2017; Yang et al., 2019).

Examining figure 1, we found a tendentially significant positive correlation between the variables GluRed and GPx, with this pattern of correlation being observed in 10.7% of the participants.

Among the three mammalian isoforms, ET-1 is the most abundant in the human cardiovascular system, mainly produced by the vascular endothelium. Entitled the most potent vasoconstrictor, it is positively regulated by numerous factors, including hypoxia, thrombin, glucose, and angiotensin II. On the other hand, NO is one of the most potent inhibitors of its production (Breuss et al., 2019; Davenport et al., 2016; Houde et al., 2016; Li et al., 2019). Due to the cardioprotective effects of resveratrol and, according to prior investigations, a reduction in serum ET-1 levels was expected after supplementation (Breuss et al., 2019; Li et al., 2019).

Serum ET-1 levels after resveratrol supplementation showed no significant differences. These findings suggest that resveratrol does not significantly interfere with serum ET-1 levels, refuting previously published literature. (12,16) According to Gliemann et al., these results may be explained by the attenuating effect of resveratrol on vascular function parameters in exercising individuals. More specifically, resveratrol showed an adverse effect on blood pressure reduction in these participants, rejecting the hypothesis of an improvement in cardiovascular health (Gliemann et al., 2013).

Comparing the different variables under study with those previously studied, we found an inverse relationship between ET-1 and blood pressure. That is, when ET-1 increases, bSBP and bDBP decrease (Fig. 2 and 3, respectively).

The enhancement of the inflammatory state is identified by the increased concentration of inflammatory mediators, such as TNF- $\alpha$  and IL-6, as a result of their extensive release (Haghighatdoost and Hariri, 2019; Koushki et al., 2018). TNF- $\alpha$  is one of the major mediators of inflammation, mainly produced by macrophages, which integrates both innate and adaptive immunities (Silva et al., 2019; Zelova and Hosek, 2013). Along with TNF- $\alpha$ , IL-6 is considered one of the most important cytokines, involved not only in inflammation, but also in immune responses, hematopoiesis, and embryonic development. In response to trauma or infection, this pleiotropic cytokine is secreted by multiple cell types including macrophages, T cells, and fibroblasts (Hirano, 2021; Jones and Jenkins, 2018; Velazquez-Salinas et al., 2019). Several previous studies have appointed resveratrol as an anti-inflammatory supplement due to its capacity to downregulate inflammatory pathways and cytokine signaling, decreasing the expression of genes implicated in this process (Akhondzadeh et al., 2020; Banez et al., 2020; Dyck et al., 2019; Haghighatdoost and Hariri, 2019; Neves et al., 2012).

Regarding serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 after supplementation, the results were not significant. The same

Relativamente aos níveis séricos de TNF- $\alpha$  e IL-6 após a suplementação, os resultados não foram significativos. O mesmo se verificou avaliando cada um dos momentos temporais nos grupos em estudo. Este facto traz à evidência que a suplementação com resveratrol não interfere significativamente com os níveis séricos de TNF- $\alpha$  e IL-6 e, conseqüentemente, com o estado inflamatório dos indivíduos. Por se tratar de uma população saudável e jovem, estes resultados eram expectáveis e encontram-se em concordância com outros previamente descritos (de Sa Coutinho et al., 2018; Haghghatdoost and Hariri, 2019).

Comparando os parâmetros inflamatórios, verificamos uma correlação estatisticamente significativa entre o aumento dos níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$ , isto é, quando mais elevados forem os níveis de IL-6, mais elevados serão os níveis de TNF- $\alpha$ , sendo este padrão de correlação observado em 26,5% dos indivíduos em estudo (Fig. 4). Em contrapartida, observamos uma ligeira relação proporcional, não significativa, entre o TNF- $\alpha$  e a PCR (Fig. 5).

Os resultados inconclusivos e contraditórios podem dever-se às baixas doses de resveratrol administradas, à curta duração da intervenção e à baixa biodisponibilidade do resveratrol quando administrado oralmente, mas também à idade e estado clínico dos participantes.

## 5. CONCLUSÕES

A ingestão regular de resveratrol pode ser capaz de reduzir o SO através do aumento da atividade de enzimas antioxidantes. No entanto, não foi possível provar o seu papel anti-inflamatório e cardioprotetor. Realçamos o facto dos indivíduos participantes no estudo, serem indivíduos jovens saudáveis e, de alguma forma, biologicamente otimizados. Ainda assim, verificou-se que a suplementação não foi prejudicial em nenhum dos parâmetros avaliados e, portanto, não deve ser descartada.

As limitações do estudo incluem a curta duração da intervenção e o reduzido tamanho da população.

Assim, torna-se pertinente a realização de estudos adicionais, de modo a perceber qual a dose adequada e o intervalo de suplementação necessário para aumentar o efeito de este composto.

## AGRADECIMENTOS

A todos os participantes, colegas e professores que tornaram possível a realização deste projeto de investigação.

## CONFLITOS DE INTERESSE

Sem conflitos de interesse a declarar.

## CONTRIBUIÇÕES AUTORIAIS

Conceptualização, C.F., A.C. e T.P.; metodologia, C.F., A.L., M.T. e M.S.; software, C.F. e J.F.; validação, A.C. e T.P.; análise formal, C.F. e A.C.; investigação, C.F., A.C.; recursos, A.C.; curadoria de dados, C.F., A.C.; redação - preparação do draft original, C.F.; redação - revisão e edição, A.C.; visualização, A.C.; supervisão, A.C.; coordenação do projeto, A.C. e T.P. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS/REFERENCES

Akhondzadeh F, Astani A, Najjari R, Samadi M, Rezvani ME, Zare F,

was observed when evaluating each of the time points in the study groups. This fact leads to evidence that resveratrol supplementation does not significantly interfere with the serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 and, consequently, with the inflammatory status of the participants. Considering the young and healthy population, these results were expected and are in agreement with others previously described (de Sa Coutinho et al., 2018; Haghghatdoost and Hariri, 2019).

Comparing the inflammatory parameters, we found a statistically significant correlation between increased levels of IL-6 and TNF- $\alpha$ , which means that the higher the levels of IL-6, the higher the levels of TNF- $\alpha$ , and this correlation pattern was observed in 26.5% of the study subjects (Fig. 4). On the other hand, we observed a slight proportional, non-significant correlation between TNF- $\alpha$  and CRP (Fig. 5).

The inconclusive and conflicting results found may be due to the low doses of resveratrol, short duration of intervention and the low bioavailability of resveratrol when administered orally, but also to the fact that this was a healthy young population.

## 5. CONCLUSION

Regular intake of resveratrol might be able to reduce OS by increasing the activity of endogenous antioxidant enzymes. Moreover, it was not possible to prove its role as an anti-inflammatory and cardioprotective agent. We emphasize the fact that the participants in the study were young, healthy, and somewhat biologically optimized. Nevertheless, it was found that supplementation was not detrimental in any of the parameters evaluated and therefore should not be discarded.

Study limitations include the short duration of intervention and the small population.

Thus, it becomes relevant to conduct further studies, to understand which is the proper dose and supplementation interval needed to enhance the effect of this compound.

## ACKNOWLEDGMENTS

To all the participants, colleagues and teachers who made this research project possible.

## CONFLICTS OF INTEREST

No conflicts of interest to declare.

## AUTHORIAL CONTRIBUTIONS

Conceptualization, C.F., A.C. and T.P.; methodology, C.F., A.L., M.T. and M.S.; software, C.F. and J.F.; validation, A.C. and T.P.; formal analysis, C.F. and A.C.; research, C.F., A.C.; resources, A.C.; data curation, C.F., A.C.; writing - preparation of original draft, C.F.; writing - proofreading and editing, A.C.; visualization, A.C.; supervision, A.C.; project coordination, A.C. and T.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

- Ranjbar AM and Safari F. Resveratrol suppresses interleukin-6 expression through activation of sirtuin 1 in hypertrophied H9c2 cardiomyoblasts. *J Cell Physiol* **235**:6969-6977, 2020
- AlBasher G, Abdel-Daim MM, Almeer R, Ibrahim KA, Hamza RZ, Bungau S and Aleya L. Synergistic antioxidant effects of resveratrol and curcumin against fipronil-triggered oxidative damage in male albino rats. *Environ Sci Pollut Res Int* **27**:6505-6514, 2020
- Banez MJ, Geluz MI, Chandra A, Hamdan T, Biswas OS, Bryan NS and Von Schwarz ER. A systemic review on the antioxidant and anti-inflammatory effects of resveratrol, curcumin, and dietary nitric oxide supplementation on human cardiovascular health. *Nutr Res* **78**:11-26, 2020
- Barton M and Yanagisawa M. Endothelin: 30 Years From Discovery to Therapy. *Hypertension* **74**:1232-1265, 2019
- Bruss JM, Atanasov AG and Uhrin P. Resveratrol and Its Effects on the Vascular System. *Int J Mol Sci* **20**, 2019
- Caseiro A, Ferreira R, Quintaneiro C, Pereira A, Marinheiro R, Vitorino R and Amado F. Protease profiling of different biofluids in type 1 diabetes mellitus. *Clinical Biochemistry* **45**:1613-1619, 2012a
- Caseiro A, Silva AM, Ferreira C, Dias B, Silva I, Clemente M, De Figueiredo JP and Pereira T. Avaliação laboratorial do efeito antioxidante e anti-inflamatório do Resveratrol na função vascular. *RevSALUS - Revista Científica da Rede Académica das Ciências da Saúde da Lusofonia* **1**:37-46, 2019
- Caseiro A, Vitorino R, Barros AS, Ferreira R, Calheiros-Lobo MJ, Carvalho D, Duarte JA and Amado F. Salivary peptidome in type 1 diabetes mellitus. *Biomed Chromatogr* **26**:571-582, 2012b
- Colica C, Milanović M, Milić N, Aiello V, De Lorenzo A and Abenavoli L. A Systematic Review on Natural Antioxidant Properties of Resveratrol. *Natural Product Communications* **13**:1934578X1801300923, 2018
- Couto N, Wood J and Barber J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic Biol Med* **95**:27-42, 2016
- Davenport AP, Hyndman KA, Dhaun N, Southan C, Kohan DE, Pollock JS, Pollock DM, Webb DJ and Maguire JJ. Endothelin. *Pharmacol Rev* **68**:357-418, 2016
- de Sa Coutinho D, Pacheco MT, Frozza RL and Bernardi A. Anti-Inflammatory Effects of Resveratrol: Mechanistic Insights. *Int J Mol Sci* **19**, 2018
- Dyck GJB, Raj P, Zieroth S, Dyck JRB and Ezekowitz JA. The Effects of Resveratrol in Patients with Cardiovascular Disease and Heart Failure: A Narrative Review. *Int J Mol Sci* **20**, 2019
- Fanucchi MV. Development of Antioxidant and Xenobiotic Metabolizing Enzyme Systems, in *The Lung* pp 223-231, 2014
- Gerszon J, Rodacka A and Puchała M. Antioxidant Properties of Resveratrol and its Protective Effects in Neurodegenerative Diseases. *Advances in Cell Biology* **4**:97-117, 2014
- Gliemann L, Schmidt JF, Olesen J, Bienso RS, Peronard SL, Grandjean SU, Mortensen SP, Nyberg M, Bangsbo J, Pilegaard H and Hellsten Y. Resveratrol blunts the positive effects of exercise training on cardiovascular health in aged men. *J Physiol* **591**:5047-5059, 2013
- Guller P, Karaman M, Guller U, Aksoy M and Kufrevioglu OI. A study on the effects of inhibition mechanism of curcumin, quercetin, and resveratrol on human glutathione reductase through in vitro and in silico approaches. *J Biomol Struct Dyn* **39**:1744-1753, 2021
- Haghighatdoost F and Hariri M. Can resveratrol supplement change inflammatory mediators? A systematic review and meta-analysis on randomized clinical trials. *Eur J Clin Nutr* **73**:345-355, 2019
- Hirano T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. *Int Immunol* **33**:127-148, 2021
- Houde M, Desbiens L and D'Orleans-Juste P. Endothelin-1: Biosynthesis, Signaling and Vasoreactivity. *Adv Pharmacol* **77**:143-175, 2016
- Jones SA and Jenkins BJ. Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer. *Nat Rev Immunol* **18**:773-789, 2018

- Kavas GO, Ayrál PA and Elhan AH. The effects of resveratrol on oxidant/antioxidant systems and their cofactors in rats. *Adv Clin Exp Med* **22**:151-155, 2013
- Kehrer JP, Robertson JD and Smith CV. 1.14 - Free Radicals and Reactive Oxygen Species, in *Comprehensive Toxicology (Second Edition)* (McQueen CA ed) pp 277-307, Elsevier, Oxford, 2010
- Koushki M, Dashatan NA and Meshkani R. Effect of Resveratrol Supplementation on Inflammatory Markers: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Clin Ther* **40**:1180-1192 e1185, 2018
- Kraus RJ and Ganther HE. Reaction of cyanide with glutathione peroxidase. *Biochem Biophys Res Commun* **96**:1116-1122, 1980
- Li H, Xia N, Hasselwander S and Daiber A. Resveratrol and Vascular Function. *Int J Mol Sci* **20**, 2019
- Moreira-Pinto B, Costa L, Felgueira E, Fonseca BM and Rebelo I. Low Doses of Resveratrol Protect Human Granulosa Cells from Induced-Oxidative Stress. *Antioxidants* **10**, 2021
- Neves AR, Lucio M, Lima JL and Reis S. Resveratrol in medicinal chemistry: a critical review of its pharmacokinetics, drug-delivery, and membrane interactions. *Curr Med Chem* **19**:1663-1681, 2012
- Paglia DE and Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* **70**:158-169, 1967
- Phaniendra A, Jestadi DB and Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem* **30**:11-26, 2015
- Pisoschi AM and Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem* **97**:55-74, 2015
- Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D and Bitto A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev* **2017**:8416763, 2017
- Prohaska JR, Oh SH, Hoekstra WG and Ganther HE. Glutathione peroxidase: inhibition by cyanide and release of selenium. *Biochem Biophys Res Commun* **74**:64-71, 1977
- Rytsyk O, Soroka Y, Shepet I, Vivchar Z, Andriichuk I, Lykhatskyi P, Fira L, Nebesna Z, Kramar S and Lisnychuk N. Experimental Evaluation of the Effectiveness of Resveratrol as an Antioxidant in Colon Cancer Prevention. *Natural Product Communications* **15**:1934578X2093274, 2020
- Sarikaya E and Doğan S. Glutathione Peroxidase in Health and Diseases, in *Glutathione System and Oxidative Stress in Health and Disease*, IntechOpen, 2020
- Silva LB, dos Santos Neto AP, Maia SMAS, dos Santos Guimarães C, Quidute IL, Carvalho AdAT, Júnior SA and Leão JC. The Role of TNF- $\alpha$  as a Proinflammatory Cytokine in Pathological Processes. *The Open Dentistry Journal* **13**:332-338, 2019
- Sinha N and Dabla PK. Oxidative stress and antioxidants in hypertension-a current review. *Curr Hypertens Rev* **11**:132-142, 2015
- Tan BL, Norhaizan ME, Liew W-P-P and Sulaiman Rahman H. Antioxidant and Oxidative Stress: A Mutual Interplay in Age-Related Diseases. *Front Pharmacol* **9**:1162-1162, 2018
- Velazquez-Salinas L, Verdugo-Rodriguez A, Rodriguez LL and Borca MV. The Role of Interleukin 6 During Viral Infections. *Front Microbiol* **10**:1057, 2019
- Wang X-L, Li T, Li J-H, Miao S-Y and Xiao X-Z. The Effects of Resveratrol on Inflammation and Oxidative Stress in a Rat Model of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Molecules* **22**:1529, 2017
- Yang Y, Wu ZZ, Cheng YL, Lin W and Qu C. Resveratrol protects against oxidative damage of retinal pigment epithelium cells by modulating SOD/MDA activity and activating Bcl-2 expression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **23**:378-388, 2019
- Zelova H and Hosek J. TNF-alpha signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflamm Res* **62**:641-651, 2013