

Avaliação laboratorial do efeito antioxidante e anti-inflamatório do Resveratrol na função vascular

Laboratory evaluation of Resveratrol antioxidant and anti-inflammatory effect on vascular function

Ana Margarida Silva^{1*}, Carla Ferreira^{1*}, Beatriz Dias², Isabel Silva¹, Mariana Clemente¹, João Paulo de Figueiredo³, Telmo Pereira^{2,4}, Armando Caseiro^{1,4,5**}

¹Instituto Politécnico de Coimbra, ESTESC-Coimbra Health School, Ciências Biomédicas Laboratoriais, Portugal;

²Instituto Politécnico de Coimbra, ESTESC-Coimbra Health School, Fisiologia Clínica, Portugal;

³Instituto Politécnico de Coimbra, ESTESC-Coimbra Health School, Ciências Complementares, Portugal;

⁴LABINSAÚDE - Laboratório de Investigação em Ciências Aplicadas à Saúde, Instituto Politécnico de Coimbra, ESTeSC, Portugal;

⁵Unidade I&D Química-Física Molecular, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal;

*As autoras contribuíram igualmente para o trabalho.

**✉ armandocaseiro@estescoimbra.pt

Resumo

Introdução: O resveratrol é uma fitoalexina natural cujos principais benefícios devem-se às suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Os seus efeitos sugerem que este é um suplemento útil para a redução da inflamação, podendo desempenhar um papel fundamental na prevenção das doenças cardiovasculares. Este promove a vasodilatação pela indução da síntese de óxido nítrico (NO), possui atividade antitrombótica e evita a agregação plaquetária. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é responsável pela angiogénese, sendo a sua expressão influenciada pelo resveratrol.

Objetivos: Avaliar o efeito do resveratrol no perfil vascular pela determinação da pressão arterial e dos biomarcadores interleucina-6 (IL-6), proteína C reativa (PCR), VEGF e NO. **Material e Métodos:** 27 alunos com idades compreendidas entre os 18 e os 22 anos foram divididos em grupo controlo (GC) e grupo de intervenção (GI), que consumiram placebo e 100 mg de resveratrol por dia, respetivamente, durante 1 mês. A pressão arterial foi medida com aparelho automático validado. Os níveis de PCR foram obtidos por imunoturbidimetria, os de IL-6 e VEGF por slot blot e a quantificação de NO por espectrofotometria. **Resultados:** Entre os grupos observou-se uma diminuição da pressão arterial braquial e central ($p < 0.05$). A variação negativa no NO apresentou-se superior no GC apesar das diferenças não serem significativas ($p > 0.05$). Nos restantes marcadores avaliados não se observaram diferenças significativas. **Conclusões:** A ingestão regular de resveratrol parece ser uma abordagem preventiva a nível vascular, dado que modula positivamente o perfil vascular, reduzindo a pressão arterial. A variação nos níveis de NO poderá ajudar a explicar os benefícios verificados.

Palavras-chave: Interleucina-6, Proteína C Reativa, Pressão arterial, VEGF, Óxido Nítrico.

Summary

Introduction: Resveratrol is a natural phytoalexin whose main benefits are due to its anti-inflammatory and antioxidant properties. Its effects suggest that this is a useful supplement for reducing inflammation and may play a key role in cardiovascular disease prevention. It promotes vasodilation by induction of nitric oxide (NO) synthesis, has antithrombotic activity and prevents platelet aggregation. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is responsible for angiogenesis, and its expression is influenced by resveratrol. **Objectives:** To evaluate the effect of resveratrol on the vascular profile by determining blood pressure and interleukin-6 (IL-6), C-reactive protein (CRP), VEGF and NO biomarkers. **Material and Methods:** 27 students aged 18-22 were divided into control group (CG) and intervention group (GI), who consumed placebo and resveratrol 100 mg per day, respectively, for 1 month. Blood pressure was measured with a validated automatic device. CRP levels were obtained by immunoturbidimetry, IL-6 and VEGF by slot blot and NO quantification by spectrophotometry. **Results:** There was a decrease in brachial and central blood pressure between the groups ($p < 0.05$). The negative variation in NO was higher in the CG although the differences were not significant ($p > 0.05$). In the remaining markers evaluated no significant differences were observed. **Conclusions:** Regular intake of resveratrol seems to be a preventive approach at the vascular level, as it positively modulates the vascular profile, reducing blood pressure. Variation in NO levels may help explain the benefits.

Keywords: Interleukin-6, C-Reactive Protein, Arterial Pressure, VEGF, Nitric Oxide.

1. INTRODUÇÃO

Em organismos aeróbios, a produção de radicais livres é um processo contínuo e fisiológico, na maior parte sob a forma de espécies reativas de oxigénio (ROS) (Valko *et al.*, 2007). O processo de stress oxidativo ocorre quando existe um desequilíbrio entre os compostos oxidantes e antioxidantes no organismo. A produção não controlada de radicais livres está descrita como causa, ou como estando relacionada, com mais de uma centena de doenças, incluindo doenças cardiovasculares (DCVs), diabetes mellitus, obesidade, doenças neurológicas, cancro, entre outras (Green *et al.*, 2004).

O resveratrol (3,5',4-trihidroxiestilbeno) é um dos principais compostos polifenólicos naturais não flavonoide e pode ser encontrado em casca de uva, vinho tinto, amendoim, amêndoa, amora, mirtilo, cacau, entre outros (Pollack *et al.*, 2013). Existe nas formas isoméricas trans e cis, sendo o trans-resveratrol a forma biologicamente ativa (Carrizzo *et al.*, 2013; Agarwal *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018). Tendo uma vasta gama de propriedades biológicas e farmacológicas, esta fitoalexina natural despertou bastante interesse devido aos seus inúmeros benefícios, incluindo o antienvhecimento, anticancerígeno, anti-inflamatório, antidiabético e a prevenção de DCVs (Rauf *et al.*, 2017). Estudos desenvolvidos evidenciaram a capacidade do resveratrol atuar na inibição do crescimento tumoral, bloqueamento da metastização e indução da apoptose de células tumorais (Chen *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2018).

As DCVs são as principais causas de morbidade e mortalidade nos países desenvolvidos (Fontana *et al.*, 2007). Estudos evidenciam uma redução da mortalidade causada por DCVs em grupos de indivíduos com maior ingestão de resveratrol (Pollack *et al.*, 2013). Este induz a vasodilatação presumivelmente através da indução da síntese de óxido nítrico (NO), inibe a endotelina, reduz a ocorrência de arritmias ventriculares, possui atividade antitrombótica e evita a agregação plaquetária (Gurusamy *et al.*, 2010).

O NO é sintetizado a partir de L-arginina, utilizando NADPH e oxigénio como substratos (Xia *et al.*, 2014). Em condições fisiológicas o NO vascular é produzido principalmente pelo óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS), que possui efeitos antihipertensivos, antitrombóticos e antiateroscleróticos (Xia *et al.*, 2017). O resveratrol, para além de diminuir o stress oxidativo, promove a função endotelial, uma vez que ao aumentar a expressão da eNOS e ao inibir a atividade da arginase, causa uma maior disponibilidade da arginina, permitindo um aumento de NO que desencadeia a vasodilatação arterial (Xia *et al.*, 2014).

Quadros de estados inflamatórios crescentes podem ser identificados através da determinação da concentração de mediadores inflamatórios, como é o caso da interleucina-6 (IL-6), do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e da proteína C reativa (PCR). A concentração destes mediadores inflamatórios pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo o desenvolvimento de patologias (Haghighatdoost *et al.*, 2019).

Novas evidências demonstram que o resveratrol pode ser utilizado na prevenção e tratamento da inflamação crónica. Estudos clínicos desenvolvidos indicaram uma redução da expressão dos genes envolvidos no processo inflamatório, após consumo de resveratrol através de extrato de uva (Haghighatdoost *et al.*, 2019).

A inflamação crónica é definida pelo aumento de fatores pró-inflamatórios, podendo promover o aparecimento de patologias como o cancro, diabetes mellitus, DCVs e hipertensão. Durante o processo inflamatório ocorre a libertação de mediadores bioquímicos, propagando a resposta inflamatória (Haghighatdoost *et al.*, 2019).

A IL-6 e o TNF- α são produzidos principalmente em inflamações de baixo e alto grau. A PCR, produzida essencialmente pelo fígado, é secretada em resposta à inflamação. No entanto, a sua secreção também é promovida pelo aumento sérico de IL-6 e TNF- α . O aumento das concentrações de IL-6, PCR e TNF- α pode potenciar o risco de desenvolvimento de doença inflamatória, diabetes mellitus e artrite reumatóide juvenil. Nestes casos, a redução das concentrações destes mediadores em condições inflamatórias pode ser benéfica (Haghighatdoost *et al.*, 2019).

Um estudo desenvolvido demonstra que o resveratrol reduziu significativamente a PCR, no entanto, o seu efeito decrescente na IL-6 e no TNF- α não se demonstrou estatisticamente significativo (Haghighatdoost *et al.*, 2019). Outros estudos evidenciam que, apesar do resveratrol não atuar na redução da IL-6 e TNF- α secretados por linfócitos e macrófagos, este é capaz de reduzir a secreção de PCR do hepatócito devido ao seu efeito antioxidante, limitando assim a fase aguda da inflamação (Chen *et al.*, 2016; Haghighatdoost *et al.*, 2019).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é responsável pela vasculogénese e angiogénese (Gelinas *et al.*, 2002). A angiogénese é o processo de formação de novos vasos através da migração e proliferação de células endoteliais, que desencadeiam uma série de processos que induzem o crescimento de novos vasos sanguíneos (Shi *et al.*, 2018). As alterações nos processos de angiogénese levaram à procura de compostos capazes de auxiliar na prevenção e/ou no controle de complicações que decorrem ao longo de diversas patologias. Estudos demonstram que a ligação do resveratrol ao VEGF suprime a angiogénese pela inibição da sinalização do seu recetor. Várias linhas de evidência deram suporte às atividades inibitórias do resveratrol na angiogénese desencadeada pelo VEGF (Hu *et al.*, 2019).

A utilização da saliva para diagnóstico de diversas patologias está a ganhar cada vez mais popularidade, permitindo a avaliação de drogas, hormonas e anticorpos. Este fluido biológico apresenta a vantagem de ser facilmente colhido com procedimentos não invasivos, tornando-se uma alternativa cada vez mais atraente para as amostras de sangue. Para além de fornecer uma boa abordagem na triagem de doenças orais e sistémicas, torna-se ainda mais atraente em crianças e idosos, onde a colheita de amostras de sangue está associada a uma maior dificuldade e mais riscos (Caseiro *et al.*, 2012).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. População e procedimento do estudo

A população alvo do estudo é constituída por 27 indivíduos voluntários clinicamente saudáveis, alunos da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, com idade entre os 18 e os 22 anos. Os 27 indivíduos foram randomizados em 2 grupos: um grupo controlo (GC, n=13) submetido à ingestão diária de

uma quantidade padronizada de placebo (100mg de farinha) e um grupo de intervenção (GI, n=14) submetido à ingestão diária de 100mg de resveratrol, durante um período de 30 dias consecutivos. O tipo de amostragem foi não probabilístico e a técnica de amostragem de conveniência. De acordo com os critérios de amostragem, foram excluídos indivíduos fumadores, indivíduos portadores de qualquer tipo de patologia, incluindo patologias da cavidade oral, e indivíduos submetidos a algum tipo de fármaco ou suplementação, com exceção do uso de contraceptivo oral. Nenhum participante do estudo praticava exercício físico. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Instituto Politécnico de Coimbra e todos os participantes deram o seu consentimento informado por escrito.

A metodologia compreendeu duas etapas: uma avaliação basal (T0) e uma avaliação após 30 dias (T1) de consumo diário de resveratrol (100 mg) /placebo. Na avaliação em T0 e T1, todos os participantes foram submetidos à medição da pressão arterial e à recolha de amostras de sangue e saliva.

2.2. Avaliação da Pressão Arterial braquial e central

A pressão arterial de repouso foi medida na artéria braquial após um período de repouso de 10 minutos em decúbito dorsal. Utilizou-se um aparelho automático de medição da pressão arterial clinicamente validado (Classe A - Colson MAM BP 3AA1-2^o; Colson, Paris) com braçadeira ajustada à circunferência do braço (Pereira *et al.*, 2005). Obtiveram-se três medições consecutivas no braço direito, com um intervalo de um minuto entre as medições, calculando-se a média das medições efetuadas. Para a análise, consideraram-se a pressão arterial sistólica braquial (bSBP), pressão arterial diastólica braquial (bDBP), pressão arterial média braquial (bMAP) e pressão de pulso braquial (bPP), para além da frequência cardíaca. A bPP foi calculada como a diferença entre a bSBP e a bDBP, e a pressão arterial média braquial foi obtida pela equação $bMAP = bDBP + 1/3 bPP$.

Para a medição da pressão arterial central, procedeu-se a uma análise da onda de pulso (pulse wave analysis – PWA) com o Complior^o Analyse (Alam Medical, Saint-Quentin-Fallavier, France). As medições foram feitas consecutivamente à medição da pressão arterial braquial, com o participante em decúbito dorsal e com o pescoço em ligeira hiperextensão e rodado ligeiramente para a esquerda. Uma sonda piezoelétrica foi colocada ao nível da artéria carótida comum direita, registando-se as ondas de pulso no local de maior amplitude e estabilidade do sinal, por um período de 15 segundos. A onda de pulso carotídea média foi considerada para análise, e calibrada com os valores de bMAP e bDBP previamente recolhidos. Os componentes temporais e morfológicos da curva foram extraídos para análise, incluindo a pressão arterial sistólica central (cSBP), a pressão arterial diastólica central (cDBP), a pressão arterial média central (cMAP) e a pressão diferencial central (cPP). Todas as avaliações foram feitas com o participante livre de ingestão de álcool ou café, ou de consumo tabágico.

2.3. Colheita e Tratamento das Amostras

Aos indivíduos que integraram o estudo foram realizadas colheitas de amostras sanguíneas e de saliva, em jejum, nos momentos T0 e T1, obtendo-se um total de 54 amostras de

sangue venoso e 54 amostras de saliva. A colheita das amostras de sangue venoso foi realizada por punção sanguínea para tubos de gel seco e para tubos contendo ácido etilendiamino tetracético tri-potássico (EDTA K3). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3000g durante 10 min, a 4°C, e armazenadas a -80°C até à sua análise. A colheita das amostras de saliva foi realizada para contentores estéreis e mantidas em gelo até serem processadas. Foram sujeitas a uma centrifugação a 12000g durante 30 minutos, a 4°C, o sobrenadante retirado e armazenado a -80°C até a realização das análises.

2.4. Caracterização bioquímica da população

O doseamento de glicose, colesterol total, colesterol de lipoproteínas de alta densidade (HDL), colesterol de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), triglicerídeos, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), creatinina, ureia e albumina foi realizado no analisador clínico automatizado Prestige 24i, com recurso a kits da Cormay: Prestige 24i GLU, Prestige 24i CHOL, Prestige 24i HDL Direct, Prestige 24i LDL Direct, Prestige 24i TG, Prestige 24i ALAT, Prestige 24i ASAT, Prestige 24i CREA, Prestige 24i UREA, Prestige 24i ALB (PZ Cormay S. A., Poland).

Relativamente à quantificação das proteínas totais, nas amostras de soro foi utilizado o kit LQ total protein (PZ Cormay S. A., Poland,) enquanto nas amostras de saliva foi utilizado o kit DC Protein (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A quantificação foi determinada com recurso ao analisador automático Prestige 24i (PZ Cormay S. A., Poland).

2.5. Determinação dos níveis séricos de NO

As amostras de soro foram filtradas com recurso a filtros moleculares de 10 KDa de 1.5mL (VWR Centrifugal Filters, Avantor, Radnor, USA), a uma centrifugação a 7000g durante 30 minutos, a 4°C. A determinação do NO foi realizada através do kit Total Nitric Oxide and Nitrate/Nitrite (R&D Systems^o, Minnesota, USA). O ensaio tem como princípio a determinação das concentrações de NO com base na conversão enzimática de nitratos em nitritos, pelo nitrato redutase. O ensaio é seguido pela deteção colorimétrica dos nitritos, produtos da reação de Griess. Foram utilizados padrões preparados a partir de uma solução Standard Nitrite/Nitrate (2000µmol/L) em diluições sucessivas com 200 µmol/L, 100 µmol/L, 50 µmol/L, 25 µmol/L, 12,5 µmol/L, 6,25 µmol/L e 3,13 µmol/L para a elaboração de uma curva de calibração do ensaio. Por fim, procedeu-se à leitura por espectrofotometria de padrões e amostras a 540nm no equipamento Thermo ScientificTM MultiskanTM Go Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA).

2.6. Determinação dos níveis séricos de PCR

A determinação dos níveis séricos de PCR foi realizada através da técnica de imunoturbidimetria no analisador clínico automatizado Prestige 24i, utilizando o kit Prestige 24i CRP ULTRA (PZ Cormay S. A., Poland).

2.7. Análise por Slot Blot

A análise por slot blot foi realizada de acordo com Caseiro *et*

al. (Caseiro *et al.*, 2012). As amostras de soro foram diluídas numa solução salina tamponada com Tris Buffered Saline (TBS) (10nM Tris, 500 mM NaCl), com o objetivo de se obter uma concentração proteica final de 0,02 µg/ µL e aplicado um volume de 100µL. No que respeita às amostras de saliva, foram diluídas numa solução salina tamponada com Tris Buffered Saline (TBS) (10nM Tris, 500 mM NaCl), com o objetivo de se obter uma concentração proteica final de 0,01 µg/ µL e aplicado um volume de 100 µL.

As membranas de nitrocelulose – Hybond ECL Nitrocellulose Membrane (GE Healthcare, Pittsburgh, USA) – foram sujeitas a bloqueamento numa solução com 5% (m/v) de leite em pó magro em TBS. De seguida, foram colocadas a incubar durante uma hora e trinta minutos à temperatura ambiente e em agitação constante, com os anticorpos primários anti-IL-6 (Clone 6708, MAB206 R&D Systems, Minneapolis, USA) e anti-VEGF (Clone 26503 R&d Systems, Minneapolis, USA) diluídos a 1:500. Finalizado o referido período de tempo, as membranas foram colocadas a lavar em TBS-Tween (TBS-T) três vezes, durante 10, 15 e 10 minutos, respetivamente, e incubadas durante uma hora e trinta minutos à temperatura ambiente e agitação constante com os anticorpos secundários (Horseradish peroxidase conjugated goat anti mouse, GE Healthcare, Pittsburgh, UK) e (Horseradish peroxidase conjugated goat anti-rabbit, GE Healthcare, Pittsburgh, UK) numa diluição de 1:1000. De seguida, as membranas foram novamente colocadas a lavar, no mesmo processo descrito anteriormente.

A deteção realizou-se por quimioluminescência, de acordo com as instruções do kit Amersham ECL Start Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Pittsburgh, UK), expondo-se a um filme fotográfico Kodak BioMax Light Film (Carestream Health, Rochester, USA) numa cassette Kodak® X-OMAT Cassette (Carestream Health, Rochester, USA) durante 3 minutos. A análise da densidade ótica (D.O.) das bandas efetuou-se com recurso ao sistema de aquisição de imagem GELDOCTM XR+ (Bio-Rad Hercules, USA) e ao software ImageLab® Versão 3.0 (Bio-Rad Hercules, USA).

2.8. Análise Estatística

O tratamento estatístico dos dados foi realizado com recurso ao software GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). A normalidade dos dados e os pressupostos de assimetria e achatamento foram avaliados através dos testes de Shapiro-Wilk ($n \leq 50$), Coeficiente de Skweness e Coeficiente de Kurtosis, respetivamente. Os

resultados obtidos por slot blot apresentam-se como média ± desvio padrão e os valores de D.O. são expressos em unidades arbitrárias. Relativamente às diferenças entre os grupos em estudo, foram avaliadas utilizando os testes T-student para amostras não emparelhadas e o seu equivalente não paramétrico Teste de Mann-Whitney. As variações em cada grupo foram testadas com o T-student para amostras emparelhadas e o seu equivalente não paramétrico T-Wilcoxon. As diferenças/correlação entre os grupos em estudo foram consideradas estatisticamente significativas, quando se assumiu um erro aleatório $p \leq 0,05$ com um nível de confiança a partir de 95%.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização da população em estudo

Os indivíduos em estudo foram caracterizados a nível antropométrico, da pressão arterial e bioquímico, de forma a garantir que todos se encontravam nas mesmas condições para realização da investigação. Como é evidenciado na Tabela 1, não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos nos diversos parâmetros em T0.

3.2. Avaliação da pressão arterial

Em relação aos resultados das pressões arteriais centrais, entre elas a pressão arterial sistólica central (cSBP), pressão arterial diastólica central (cDBP), pressão arterial média central (cMAP) e pressão de pulso central (cPP), comparando os resultados do GC com os do GI nos diferentes momentos não se observaram diferenças estatisticamente significativas em T0 (Tabela 1). No entanto, verificaram-se alterações significativas na cSBP, cDBP e cMAP em T1 ($p < 0,05$), tendo o GC obtido valores médios de 112,29 mmHg, 72,29 mmHg e 85,62 mmHg e o GI obtido valores médios de 105,80 mmHg, 63 mmHg e 77,27 mmHg respetivamente à cSBP, cDBP e cMAP. Em relação à cPP não foram observadas alterações significativas em nenhum momento entre os grupos (Fig. 1).

Nos que respeita aos resultados intra grupos, no GC não foram observadas diferenças significativas em relação à cSBP, cMAP e cPP, à exceção da cDBP que aumentou significativamente ($p < 0,05$). Em relação ao GI, observou-se uma variação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da cSBP, cDBP e cMAP, que diminuíram em média 3,80, 6,80 e 10,53 mmHg, respetivamente. A cPP não apresentou alterações significativas (Fig. 1).

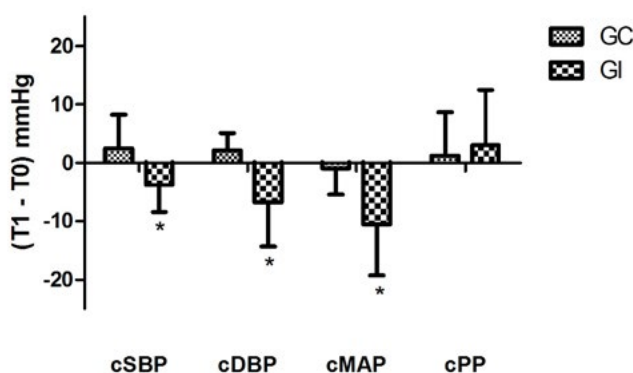


Figura 1: Representação dos valores médios da diferença da cSBP, cDBP, cMAP e cPP nos diferentes grupos (GC e GI) entre o momento T0 e T1. Os dados estão apresentados sob a forma de média ± desvio padrão; * - $p < 0,05$.

Tabela 1: IMC: índice de massa corporal; bSBP: pressão arterial sistólica braquial; bDBP: pressão arterial diastólica braquial; bMAP: pressão arterial média braquial; bPP: pressão de pulso braquial; FC: frequência cardíaca; HDL: lipoproteínas de alta densidade; LDL: lipoproteínas de baixa densidade; ASAT: aspartato aminotransferase; ALAT: alanina aminotransferase. F/M: feminino/masculino; * em %. Os dados estão apresentados sob a forma de média \pm desvio padrão.

	Grupo Controle (n=13)	Grupo Intervenção	P
Idade	20,64 \pm 1,04	20,60 \pm 1,09	0,91
Sexo (F/M)*	92,3/7,7	100/0	1
IMC (Kg/m²)	22.40 \pm 4.20	22.60 \pm 2.89	0.89
Peso (Kg)	60.64 \pm 9.36	62.00 \pm 9.09	0.70
Altura (cm)	164.93 \pm 6.26	165.53 \pm 4.88	0.77
bSBP (mmHg)	119.21 \pm 5.29	117.47 \pm 9.14	0.53
bDBP (mmHg)	70.14 \pm 6.50	70.13 \pm 7.53	1
bMAP(mmHg)	85.86 \pm 6.46	85.80 \pm 7.66	0.98
bPP (mmHg)	49.07 \pm 4.88	47.33 \pm 5.64	0.38
FC (bpm)	71.43 \pm 10.83	72.40 \pm 11.91	0.82
Albumina	4.64 \pm 0.38	4.62 \pm 0.31	0.89
Proteínas	6.78 \pm 0.31	6.66 \pm 0.41	0.37
Colesterol Total	162.5 \pm 24.66	165 \pm 25.91	0.79
Colesterol HDL	51.64 \pm 10.62	53.56 \pm 11.39	0.65
Colesterol LDL	97.11 \pm 23.93	98.37 \pm 23.06	0.89
Glicose	78.11 \pm 7.46	79.48 \pm 5.57	0.59
Creatinina	0.70 \pm 0.08	0.66 \pm 0.08	0.17
Ureia	30.57 \pm 6.19	27.67 \pm 4.28	0.16
Triglicéridos	68.59 \pm 40.43	65.46 \pm 33.50	0.83
ASAT	20.73 \pm 16.16	18.98 \pm 4.36	0.97
ALAT	20.48 \pm 8.51	20.33 \pm 10.03	0.70

3.3. Avaliação dos níveis de NO

Observando os níveis de NO, no grupo controle antes da suplementação com placebo (7,658 \pm 4,002) estes encontravam-se tendencialmente mais elevados, em comparação com o momento após suplementação com placebo (7,384 \pm 1,780). Relativamente ao grupo e intervenção, os níveis de NO após

suplementação com resveratrol (7,420 \pm 2,661) não apresentam diferenças significativas comparativamente aos níveis antes da suplementação (7,442 \pm 2,691) (Fig. 2A). A variação dos níveis de NO entre os grupos em estudo demonstrou ser tendencialmente superior no grupo controle (-0,274 \pm 3,701) em comparação com o grupo de intervenção (-0,022 \pm 3,240) (Fig. 2B).

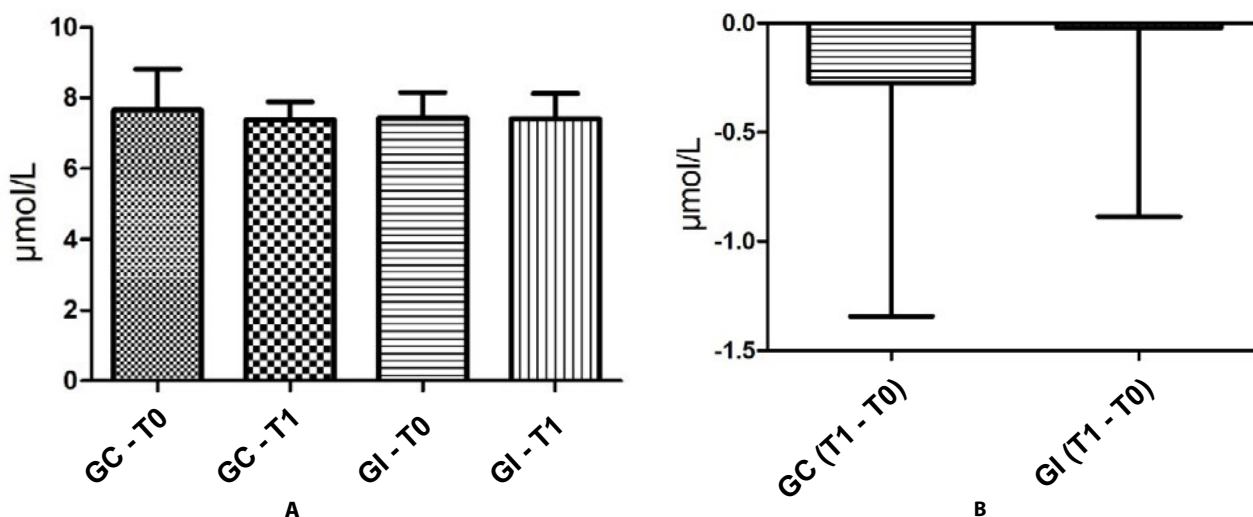
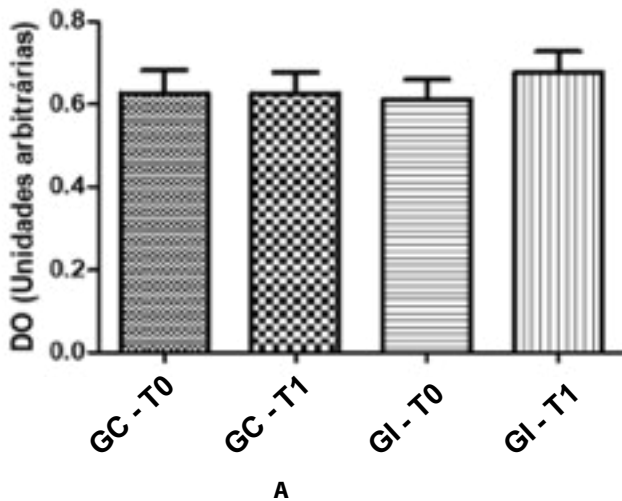


Figura 2: A – Avaliação dos níveis séricos de NO; B – Variação dos níveis séricos de NO.

3.4. Avaliação dos níveis de IL-6

Analizados os níveis séricos de IL-6, verificou-se que não existiam alterações no grupo controlo, uma vez que apresentaram os mesmos níveis de IL-6 antes e após suplementação ($0,627 \pm 0,203$ e $0,627 \pm 0,182$, respetivamente). No que diz respeito ao grupo de intervenção, verificou-se um ligeiro aumento após a suplementação ($0,679 \pm 0,187$) comparativamente ao período sem qualquer tipo de suplementação ($0,611 \pm 0,183$). Contudo, a diferença observada não foi significativa (Fig. 3A). Quanto à variação existente em ambos os grupos, esta foi superior no grupo de intervenção ($0,068 \pm 0,138$) comparativamente ao grupo controlo ($6,21 \times 10^{-10} \pm 0,145$) (Fig. 3B).



No que concerne aos níveis de IL-6 na saliva, verificou-se um ligeiro aumento no grupo controlo após suplementação com placebo ($0,600 \pm 0,223$) comparativamente com o momento antes da suplementação ($0,552 \pm 0,138$). No que diz respeito ao grupo de intervenção, verificou-se um ligeiro aumento após a suplementação ($0,558 \pm 0,220$) comparativamente ao período sem qualquer tipo de suplementação ($0,525 \pm 0,183$). Contudo, a variação observada não foi significativa (Fig. 4A). Quanto à variação existente em ambos os grupos, esta foi tendencialmente inferior no grupo de intervenção ($0,033 \pm 0,215$) comparativamente ao grupo controlo ($0,048 \pm 0,190$) (Fig. 4B).

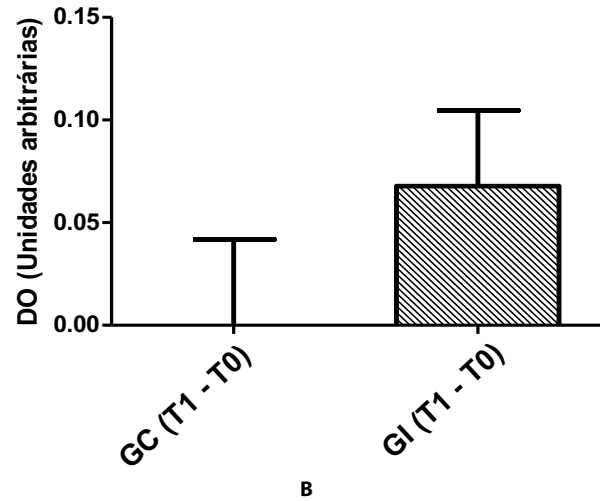


Figura 3: A – Avaliação dos níveis séricos de IL-6; B – Variação dos níveis séricos de IL-6.

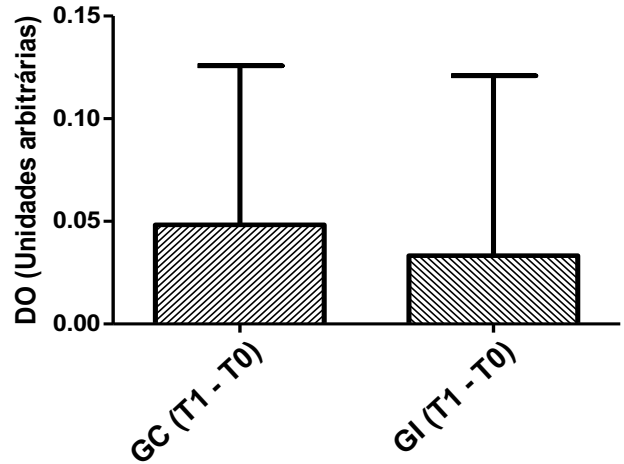
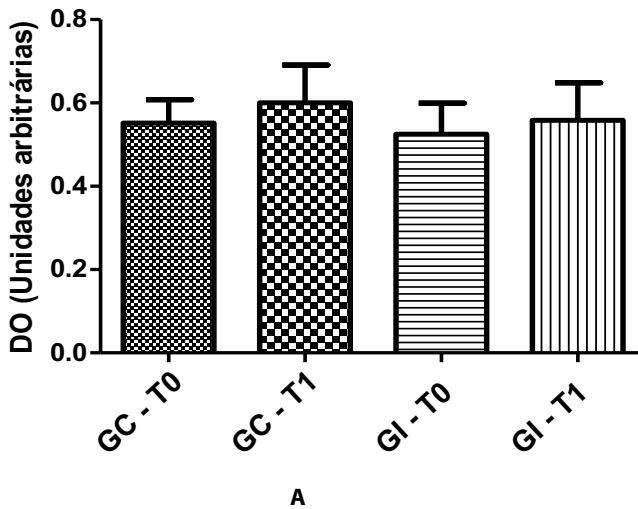


Figura 4: A – Avaliação dos níveis salivares de IL-6; B – Variação dos níveis salivares de IL-6.

3.5. Avaliação dos níveis de PCR

No que diz respeito aos níveis de PCR existentes no soro, verificou-se um ligeiro aumento no grupo controlo que apresenta níveis médios de $0,182 \pm 0,165$ antes da suplementação e de $0,243 \pm 0,223$ após a suplementação com placebo. Analisando o grupo de intervenção, observa-se também um ligeiro aumento após a suplementação com resveratrol ($0,343 \pm 0,247$)

comparativamente ao momento em que não existia qualquer tipo de suplementação neste grupo ($0,320 \pm 0,270$) (Fig. 5A). Quanto à variação existente em ambos os grupos, conclui-se que foi inferior no grupo de intervenção ($0,024 \pm 0,184$) comparativamente ao grupo controlo ($0,061 \pm 0,210$), no entanto as diferenças verificadas não foram significativas (Fig. 5B).

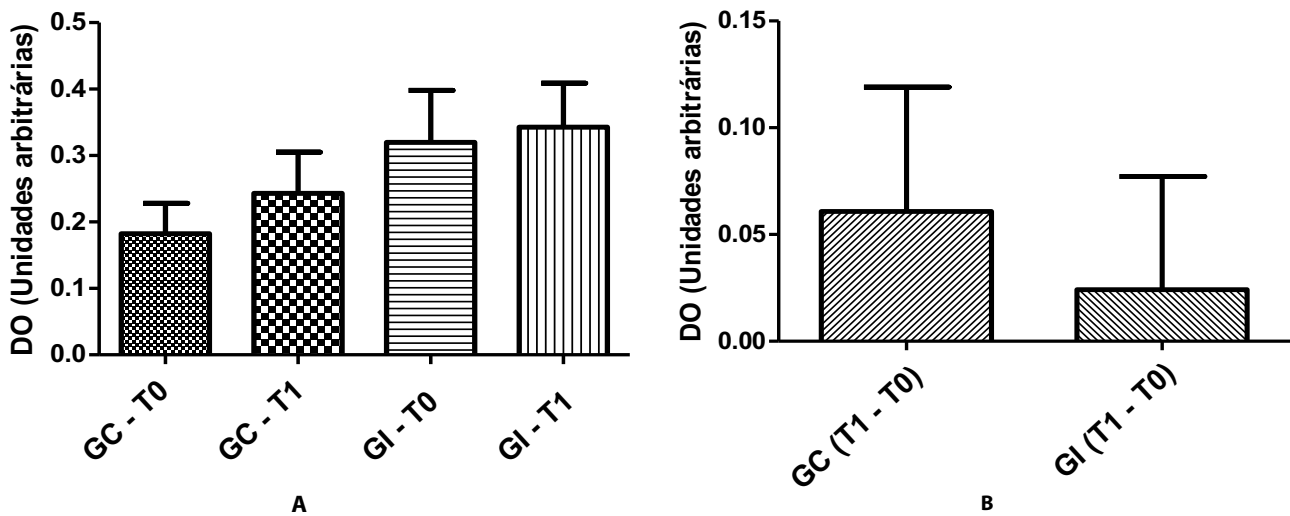


Figura 5: A – Avaliação dos níveis séricos PCR; B – Variação dos níveis séricos de PCR.

3.6. Avaliação dos níveis de VEGF

Relativamente aos níveis séricos de VEGF, não se observaram diferenças significativas no grupo controlo antes da suplementação com placebo (4,089±3,725) em comparação com o momento após suplementação com placebo (3,810±4,098). No grupo de intervenção, os níveis de VEGF também não apresentaram diferenças significativas após suplementação com resveratrol (5,875±4,413) comparativamente aos níveis observados antes da suplementação (5,898±4,427) (Fig. 6A). A variação dos níveis séricos de VEGF entre os grupos em estudo demonstrou ser superior no grupo controlo (-0,280±1,399) comparativamente ao grupo de intervenção (-0,023±1,600) (Fig. 6B).

Na avaliação dos níveis de VEGF na saliva, o grupo controlo antes da suplementação com placebo (6,676±1,988) apresenta valores tendencialmente mais elevados em comparação com o após suplementação com placebo (6,341±1,850). Relativamente ao grupo de intervenção, os níveis séricos de VEGF apresentaram-se tendencialmente mais elevados após suplementação com resveratrol (7,211±3,528) comparativamente aos níveis antes da suplementação (7,083±3,548). Contudo os valores não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Fig. 7A). A variação entre os níveis salivares de VEGF entre os grupos em estudo demonstrou ser superior no grupo controlo (-0,334±1,799) em comparação com o grupo de intervenção (0,128±2,194) (Fig. 7B).

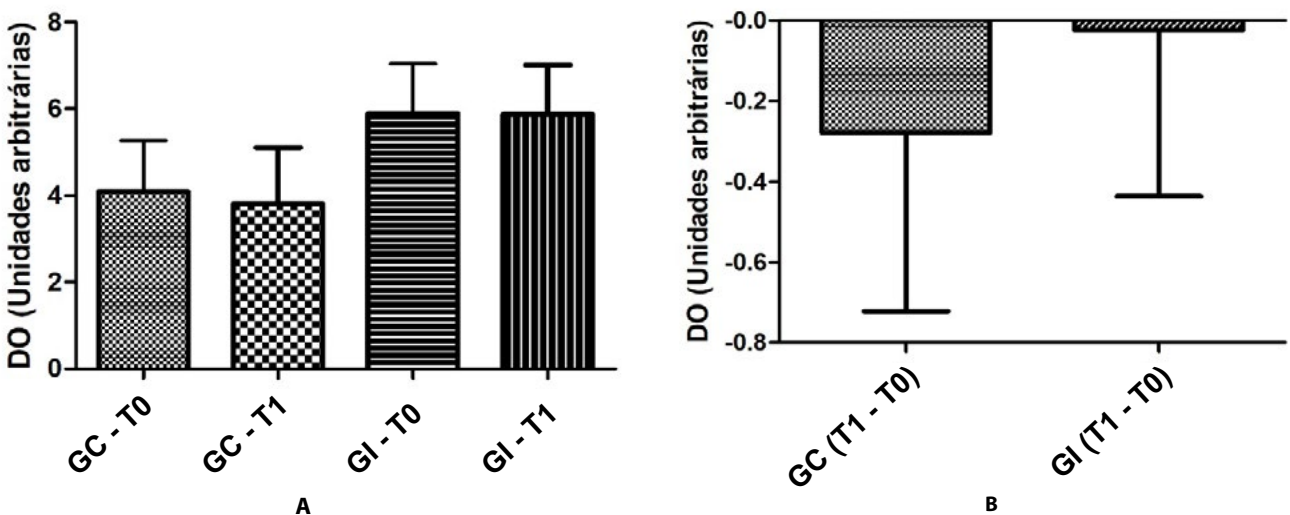


Figura 6: A – Avaliação dos níveis séricos VEGF; B – Variação dos níveis séricos de VEGF.

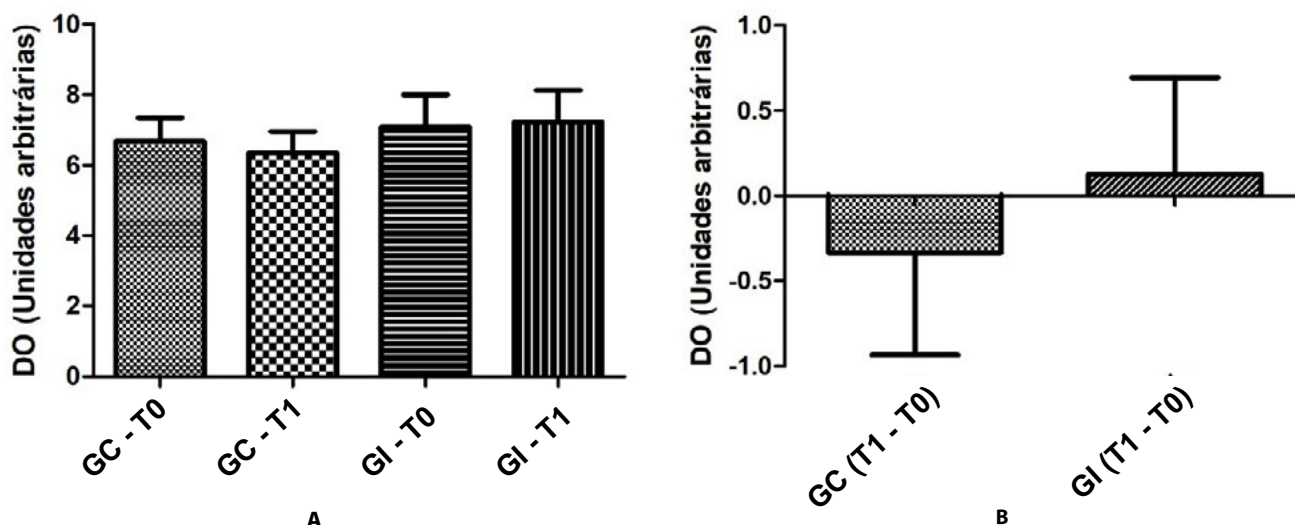


Figura 7: A – Avaliação dos níveis séricos PCR; B – Variação dos níveis séricos de PCR.

4. DISCUSSÃO

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são produtos do metabolismo aeróbio normal que, em concentrações moderadas, desempenham papéis importantes em vários processos de sinalização e regulação celular (Fridovich, 1999; Athar *et al.*, 2009). No entanto, uma produção não controlada pode danificar biomoléculas cruciais, como proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, podendo levar ao aparecimento de vários processos patológicos (Halliwell *et al.*, 1990). As ROS estão implicadas em mais de uma centena de doenças, incluindo doenças cardiovasculares, aterosclerose, hipertensão, obesidade, diabetes mellitus, doenças neurológicas, vários tipos de cancro e, inclusive, no processo de envelhecimento (Green *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2007).

Em condições fisiológicas, o organismo possui mecanismos eficientes de defesa antioxidantes contra os radicais livres e os efeitos das ROS. Nas últimas décadas, compostos de origem natural têm vindo a suscitar interesse na indústria farmacêutica devido aos seus benefícios na saúde humana. O resveratrol tem sido amplamente estudado devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, cardioprotetoras, neuroprotetoras, sendo ainda benéfico para a melhoria de distúrbios metabólicos (Chang *et al.*, 2011; Albertoni *et al.*, 2015; Ghowsi *et al.*, 2018).

A nível vascular, o NO é sintetizado pela eNOS e atua no relaxamento das células musculares lisas vasculares, aumentando o fluxo sanguíneo de modo a prevenir processos trombogénicos e aterogénicos (Dudzinski *et al.*, 2006). Foi demonstrado *in vitro* e *in vivo* que o resveratrol está envolvido no metabolismo do NO (Dudzinski *et al.*, 2007). Desta forma, foram avaliados os níveis séricos de NO com o objetivo de estimar a variação das suas concentrações aquando da suplementação com resveratrol. Verificou-se que, apesar de os níveis de NO não apresentarem diferenças significativas no grupo de intervenção, a variação entre os grupos em estudo demonstrou ser tendencialmente superior no grupo controlo em comparação com o grupo de intervenção. Assim, é possível presumir que apesar da variação existente se apresentar negativa em ambos os grupos, no grupo de intervenção o resveratrol atenuou a diminuição dos níveis de NO (Fig. 2B).

Pela avaliação da pressão arterial braquial e central, este trabalho corroborou que a ingestão de resveratrol modula positivamente o perfil vascular e hemodinâmico em adultos jovens e saudáveis, promovendo o relaxamento vascular e reduzindo a pressão arterial. Num outro estudo, Nicholsan *et al.*, (2010) relataram que a exposição de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) a concentrações nanomolares de resveratrol, por 24 horas, aumentou o nível de mRNA da eNOS, embora a proteínas da eNOS e a produção de NO não tenham sido afetadas.

Haghighatdoost e Hariri, (2018) afirmam que o resveratrol é um suplemento útil para a redução da inflamação, diminuindo a expressão dos genes envolvidos neste processo. No entanto, na perspetiva destes autores, existem ensaios que indicam que o efeito do resveratrol nos biomarcadores IL-6, TNF- α e PCR têm resultados conflitantes.

Em relação aos níveis séricos de IL-6 não se observam diferenças significativas (Fig. 3A), indicando que não houveram alterações significativas do estado inflamatório dos indivíduos, o que era expectável visto que são indivíduos jovens e saudáveis. Os níveis salivares de IL-6 mostraram uma tendência de aumento no grupo controlo após a suplementação, sendo que o mesmo aconteceu no grupo de intervenção (Fig. 4A). No entanto, a variação é superior no grupo controlo, apesar de não existirem dados estatisticamente significativos (Fig. 4B).

Chachay *et al.* (2014), refere que oito semanas de suplementação com resveratrol num conjunto de indivíduos com doença hepática gordurosa não alcoólica não reduzem significativamente os níveis de IL-6, bem como quaisquer características desta patologia. Kjaer *et al.* (2017) também refere que a suplementação com resveratrol não reduziu os níveis de PCR e IL-6 nem alterou a expressão génica inflamatória nos tecidos muscular e adiposo em homens de meia-idade com Síndrome Metabólica. Haghighatdoost e Hariri (2018) constataram a existência de dados controversos no que diz respeito à ação do resveratrol em marcadores inflamatórios, uma vez que existem dados que indicam um efeito decrescente do resveratrol sobre os níveis de IL-6, TNF- α e PCR, enquanto a maioria dos artigos não mostrou nenhum efeito útil nos

mesmos. Os dados referentes a estudos *in vitro* parecem ser mais conclusivos do que os evidenciados *in vivo*, uma vez que Ghowsi *et al.* (2018) detetaram melhorias a nível inflamatório em ratos com síndrome do ovário poliquístico, relatando uma redução da expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6.

Os níveis séricos de PCR do grupo controlo aumentaram após suplementação com placebo, assim como os níveis do grupo de intervenção após suplementação com resveratrol (Fig.5A). Quanto à variação existente em ambos os grupos, verificou-se que é inferior no grupo de intervenção, apesar destes dados não serem estatisticamente significativos (Fig. 5B). De acordo com Haghghatdoost e Hariri (2018), o resveratrol não foi capaz de reduzir os níveis IL-6 e TNF- α por linfócitos e macrófagos, mas o seu papel antioxidante consegue reduzir a síntese e secreção de PCR no hepatócito e reduzir a fase aguda da inflamação. Bo *et al.* (2016) constatou que a suplementação com resveratrol durante um período de seis meses não diminuiu significativamente a concentração de PCR em indivíduos diabéticos (DM2). Do mesmo modo, Sahebkar *et al.* (2015) sugere que não existe nenhum benefício significativo da suplementação de resveratrol na redução dos níveis plasmáticos de PCR. Este resultado negativo pode ser justificado, em parte, pelo facto de se considerarem artigos que referenciam uma baixa dosagem de resveratrol, a curta duração da intervenção e estudos que usaram resveratrol em conjunto com outros suplementos em vez de resveratrol puro.

Existem diferentes razões para o menor efeito do resveratrol sobre mediadores inflamatórios, especialmente IL-6 e TNF- α . Isto pode ser devido à alta bioatividade e baixa biodisponibilidade do resveratrol. Os níveis séricos de resveratrol podem não ser adequados para um efeito benéfico, devido ao rápido metabolismo hepático do resveratrol. Outra razão pode ser o metabolismo rápido e substancial do resveratrol para glucuronil conjugados e sulfato (Haghghatdoost *et al.*, 2018).

Um método para aumentar a biodisponibilidade do resveratrol é a mistura de resveratrol com diferentes substâncias, o que reduz o metabolismo *in vivo* do resveratrol. Os investigadores acreditam que outra maneira de melhorar a biodisponibilidade do resveratrol é o consumo de sumo de uva em vez de cápsulas de resveratrol ou usando estratégias de nanotecnologia para melhorar as propriedades físicas do resveratrol, o que causa sistemas melhorados de entrega de medicamentos. Parece que mais ensaios clínicos são necessários para a comparação do efeito de diferentes formas de resveratrol nas variáveis de saúde (Haghghatdoost *et al.*, 2018).

O aumento da utilização de fatores de crescimento como terapêutica para a indução da regeneração de novos vasos sanguíneos, tem vindo a mostrar cada vez mais potencial. O VEGF é um dos fatores angiogénicos mais importantes, sendo fundamental para a migração e proliferação de células endoteliais (Hu *et al.*, 2019). É capaz de promover a divisão das células endoteliais, aumentar a permeabilidade vascular e induzir a neovascularização (Liu *et al.*, 2016).

Em condições normais, a expressão de VEGF é relativamente baixa (Meyer *et al.*, 2015). No presente estudo não foram observadas diferenças significativas entre os níveis séricos de VEGF, no entanto a variação dos níveis entre os grupos em estudo foi maior no grupo controlo, tanto no soro (Fig. 6B)

como na saliva (Fig. 7B). Vários estudos demonstram que o resveratrol atua diretamente nos níveis de VEGF. De acordo com um estudo recente desenvolvido por Hu *et al.* (2019), a ligação do resveratrol ao VEGF suprime a angiogénese pela inibição da sinalização do seu recetor. O estudo foi desenvolvido em HUVECs, que comparadas com um grupo celular induzido por VEGF, demonstraram que o resveratrol, em alta concentração, suprimiu a proliferação de células endoteliais mediadas por VEGF, bem como a migração e invasão celular.

Neste estudo, os resultados parecem ser inconclusivos, o que pode ser explicado devido ao facto de se estar perante uma população de adultos jovens e também devido à baixa biodisponibilidade do resveratrol quando administrado oralmente. Um estudo desenvolvido por Walle *et al.* (2004) demonstrou que o resveratrol tem uma biodisponibilidade muito baixa, o que pode explicar as baixas concentrações encontradas. No entanto, segundo Bo *et al.* (2016) a ingestão de resveratrol não tem efeitos adversos.

A utilização da saliva demonstrou ser mais sensível na determinação de alguns parâmetros, no entanto, não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre este fluido biológico e o soro. Seriam necessários mais estudos para demonstrar as diferenças de sensibilidade entre os dois fluidos, bem como a possível utilização da saliva em substituição do soro no diagnóstico clínico.

5. CONCLUSÕES

A ingestão regular de resveratrol parece ser uma abordagem preventiva a nível vascular, uma vez que modula positivamente o perfil vascular hemodinâmico, promovendo processos de vasodilatação e conseqüente redução significativa da pressão arterial. A variação nos níveis de NO após suplementação pode estar na origem dos benefícios verificados. Verificou-se que a suplementação com este composto não foi prejudicial ao nível dos restantes parâmetros avaliados e, por isso, a suplementação com resveratrol não deve ser descartada, apresentando-se como potencialmente útil na melhoria da função vascular e na promoção da saúde. Assim, torna-se pertinente desenvolver estudos adicionais com um maior número de participantes de forma a perceber que doses de resveratrol devem ser administradas, qual o período de administração necessário para que existam efeitos e qual a melhor formulação para potenciar o efeito da ingestão deste composto

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal R, Agarwal P. Targeting extracellular matrix remodeling in disease: Could resveratrol be a potential candidate? *Exp Biol Med* (Maywood) 242:374-383, 2017.
- Albertoni G, Schor N. Resveratrol plays important role in protective mechanisms in renal disease--mini-review. *J Bras Nefrol* 37:106-114, 2015.
- Athar M, Back JH, Kopelovich L, Bickers DR, Kim AL. Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 486:95-102, 2009.
- Bo S, Ponzio V, Ciccone G, Evangelista A, Saba F, Goitre I, Procopio M, Pagano GF, Cassader M, Gambino R. Six months of resveratrol supplementation has no measurable effect in type 2 diabetic patients. A randomized, double blind, placebo-controlled trial. *Pharmacol Res* 111:896-905, 2016.

- Carrizzo A, Forte M, Damato A, Trimarco V, Salzano F, Bartolo M, Maciag A, Puca AA, Vecchione C. Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases. *Food Chem Toxicol* 61:215-226, 2013.
- Caseiro A, Vitorino R, Barros AS, Ferreira R, Calheiros-Lobo MJ, Carvalho D, Duarte JA, Amado F. Salivary peptidome in type 1 diabetes mellitus. *Biomed Chromatogr* 26:571-582, 2012. 7.
- Chachay VS, Macdonald GA, Martin JH, Whitehead JP, O'Moore-Sullivan TM, Lee P, Franklin M, Klein K, Taylor PJ, Ferguson M, Coombes JS, Thomas GP, Cowin GJ, Kirkpatrick CMJ, Prins JB, Hickman IJ. Resveratrol Does Not Benefit Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 12:2092-U2383, 2014.
- Chang CC, Chang CY, Wu YT, Huang JP, Yen TH, Hung LM. Resveratrol retards progression of diabetic nephropathy through modulations of oxidative stress, proinflammatory cytokines, and AMP-activated protein kinase. *J Biomed Sci* 18:47, 2011.
- Chen J, Bai Q, Zhao Z, Sui H, Xie X. Resveratrol improves delayed r-tPA treatment outcome by reducing MMPs. *Acta Neurol Scand* 134:54-60, 2016.
- Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46:235-276, 2006.
- Dudzinski DM, Michel T. Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc Res* 75:247-260, 2007.
- Fontana L, Villareal DT, Weiss EP, Racette SB, Steger-May K, Klein S, Holloszy JO. Calorie restriction or exercise: effects on coronary heart disease risk factors. A randomized, controlled trial. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E197-202, 2007.
- Fridovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann N Y Acad Sci* 893:13-18, 1999.
- Gelinas DS, Bernatchez PN, Rollin S, Bazan NG, Sirois MG. Immediate and delayed VEGF-mediated NO synthesis in endothelial cells: role of PI3K, PKC and PLC pathways. *Br J Pharmacol* 137:1021-1030, 2002.
- Ghowsi M, Khazali H, Sisakhtnezhad S. Evaluation of TNF-alpha and IL-6 mRNAs expressions in visceral and subcutaneous adipose tissues of polycystic ovarian rats and effects of resveratrol. *Iran J Basic Med Sci* 21:165-174, 2018.
- Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 1:S110-118, 2004.
- Gurusamy N, Lekli I, Mukherjee S, Ray D, Ahsan MK, Gherghiceanu M, Popescu LM, Das DK. Cardioprotection by resveratrol: a novel mechanism via autophagy involving the mTORC2 pathway. *Cardiovasc Res* 86:103-112, 2010.
- Haghighatdoost F, Hariri M. Can resveratrol supplement change inflammatory mediators? A systematic review and meta-analysis on randomized clinical trials. *Eur J Clin Nutr* 2018.
- Haghighatdoost F, 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.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186:1-85, 1990.
- Hu WH, Duan R, Xia YT, Xiong QP, Wang HY, Chan GK, Liu SY, Dong TT, Qin QW, Tsim KW. Binding of Resveratrol to Vascular Endothelial Growth Factor Suppresses Angiogenesis by Inhibiting the Receptor Signaling. *J Agric Food Chem* 67:1127-1137, 2019.
- Kjaer TN, Ornstrup MJ, Poulsen MM, Stodkilde-Jorgensen H, Jessen N, Jorgensen JOL, Richelsen B, Pedersen SB. No Beneficial Effects of Resveratrol on the Metabolic Syndrome: A Randomized Placebo-Controlled Clinical Trial. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 102:1642-1651, 2017.
- Liu D, Song J, Ji X, Liu Z, Cong M, Hu B. Association of Genetic Polymorphisms on VEGFA and VEGFR2 With Risk of Coronary Heart Disease. *Medicine (Baltimore)* 95:e3413, 2016.
- Meyer S, Neeff H, Thomusch O, Strate T, Tittelbach-Helmrich D, Hopt UT, von Dobschuetz E. Everolimus Improves Microcirculatory Derangements in Experimental Postischemic Pancreatitis Modulating the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor, Interleukin 6, and Toll-Like Receptor 4. *Pancreas* 44:1245-1251, 2015.
- Nicholson SK, Tucker GA, Brameld JM. Physiological concentrations of dietary polyphenols regulate vascular endothelial cell expression of genes important in cardiovascular health. *Br J Nutr* 103:1398-1403, 2010.
- Pereira T, Maldonado J. Performance of the Colson MAM BP 3AA1-2 automatic blood pressure monitor according to the European Society of Hypertension validation protocol. *Rev Port Cardiol* 24:1341-1351, 2005.
- Pollack RM, Crandall JP. Resveratrol: therapeutic potential for improving cardiometabolic health. *Am J Hypertens* 26:1260-1268, 2013.
- Rauf A, Imran M, Suleria HAR, Ahmad B, Peters DG, Mubarak MS. A comprehensive review of the health perspectives of resveratrol. *Food Funct* 8:4284-4305, 2017.
- Sahebkar A, Serban C, Ursoniu S, Wong ND, Muntner P, Graham IM, Mikhailidis DP, Rizzo M, Rysz J, Sperling LS, Lip GY, Banach M, Lipid, Blood Pressure Meta-analysis Collaboration G. Lack of efficacy of resveratrol on C-reactive protein and selected cardiovascular risk factors—Results from a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Cardiol* 189:47-55, 2015.
- Shi C, Zhao Y, Yang Y, Chen C, Hou X, Shao J, Yao H, Li Q, Xia Y, Dai J. Collagen-binding VEGF targeting the cardiac extracellular matrix promotes recovery in porcine chronic myocardial infarction. *Biomater Sci* 6:356-363, 2018.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44-84, 2007.
- Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Jr., Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos* 32:1377-1382, 2004.
- Xia N, Forstermann U, Li H. Resveratrol and endothelial nitric oxide. *Molecules* 19:16102-16121, 2014.
- Xia N, Forstermann U, Li H. Effects of resveratrol on eNOS in the endothelium and the perivascular adipose tissue. *Ann N Y Acad Sci* 1403:132-141, 2017.
- Yang T, Zhang J, Zhou J, Zhu M, Wang L, Yan L. Resveratrol inhibits Interleukin-6 induced invasion of human gastric cancer cells. *Biomed Pharmacother* 99:766-773, 2018.
- Zhao Y, Tang H, Zeng X, Ye D, Liu J. Resveratrol inhibits proliferation, migration and invasion via Akt and ERK1/2 signaling pathways in renal cell carcinoma cells. *Biomed Pharmacother* 98:36-44, 2018.