

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DE CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL, DO ESTRESSE
OXIDATIVO E DA EXPRESSÃO DE SIRTUÍNAS EM
CÉLULAS HEK-293 TRATADAS COM
PROANTOCIANIDINAS DE SEMENTE DE UVA

MARINA RIGOTTI

CAXIAS DO SUL

2018

MARINA RIGOTTI

**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL, DO ESTRESSE
OXIDATIVO E DA EXPRESSÃO DE SIRTUÍNAS EM
CÉLULAS HEK-293 TRATADAS COM
PROANTOCIANIDINAS DE SEMENTE DE UVA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Biotecnologia da
Universidade de Caxias do Sul, visando a
obtenção de grau de Mestre em
Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Mirian Salvador

CAXIAS DO SUL

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

R572a Rigotti, Marina

Avaliação da função mitocondrial, do estresse oxidativo e da expressão de sirtuínas em células HEK-293 tratadas com proantocianidinas de semente de uva / Marina Rigotti. – 2018.

85 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2018.

Orientação: Mirian Salvador.

1. Proantocianidinas. 2. Mitocôndrias. 3. Estresse oxidativo. 4. Apoptose. 5. Sirtuínas. I. Salvador, Mirian, orient. II. Título.

CDU 2. ed.: 634.84:542.943'78

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Ana Guimarães Pereira - CRB 10/1460

MARINA RIGOTTI

**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL, DO ESTRESSE
OXIDATIVO E DA EXPRESSÃO DE SIRTUÍNAS EM
CÉLULAS HEK-293 TRATADAS COM
PROANTOCIANIDINAS DE SEMENTE DE UVA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Biotecnologia da
Universidade de Caxias do Sul, visando a
obtenção de grau de Mestre em
Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Mirian Salvador

DISSERTAÇÃO APROVADA EM:28/11/2018

Profa. Dra. Gilsane Lino von Poser

Profa. Dra. Jaqueline Picada

Profa. Dra. Joséli Schwambach

Profa. Dra. Suelen Osmarina Paesi

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, **Marivaine Gazzi Rigotti e André Luiz Rigotti**, que sempre deixam a si mesmo e suas vontades de lado para me apoiar em meus sonhos e vontades, por todo amor, carinho e incentivo. Vocês são minha base, e eu amo muito e eu tenho muito orgulho de vocês. Essa conquista também é de vocês.

Ao meu namorado, **José Guilherme S. Andreazza**, por ser meu parceiro de vida, e dividir comigo todos os momentos bons e ruins, minhas derrotas e conquistas. Agradeço por todo incentivo, paciência, compreensão, carinho e apoio em toda esta caminhada. Te amo muito!

Agradeço a minha orientadora, professora **Mirian Salvador**, por ter acreditado em mim, exigido meu melhor, por todos os ensinamentos transmitidos. Com toda certeza você tem um grande papel em meu crescimento pessoal e profissional.

A toda a equipe do Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes, pela parceria, amizade, pelos bons momentos de convivência. Por tornarem a rotina tão descontraída. A **Luciana Touguinho**, por todo incentivo e amizade desde o processo de seleção. A **Cátia Braco**, por todas as contribuições e por me transmitir conhecimento e auxiliar desde minha época de graduação. A minha bolsista de iniciação científica, **Iohana dos Reis da Silva**, por toda a dedicação e auxílio na execução do meu trabalho.

Aos meus professores da banca de acompanhamento **Prof^ª Dr^ª Joséli Schwambach** e **Prof^ª Dr^ª Suelen Osmarina Paesipelas** importantes sugestões e contribuições para este trabalho.

Aos **professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**, por contribuírem com o meu crescimento e com minha formação acadêmica.

Às agências de fomento **CAPES, FAPERGS e CNPq** e à **Universidade de Caxias do Sul** pelo apoio e suporte financeiro que possibilitaram a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a Deus por toda a luz e graças em minha vida...**MUITO OBRIGADA A TODOS!**

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
RESUMO.....	XI
ABSTRACT... ..	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
1.1 Espécies reativas, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial	13
1.2 Estresse oxidativo leva a apoptose	18
1.3 Sirtuínas e controle da homeostase redox	20
1.4 Defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas	23
1.5 Proantocianidinas	25
3. OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral.....	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
4. RESULTADOS	34
5. DISCUSSÃO GERAL	60
6. CONCLUSÕES.....	66
7. PERSPECTIVAS.....	67
10. REFERÊNCIAS	68
11. ANEXOS	85
11.1 Anexo I.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Localização intracelular e funções das sirtuínas.....	21
Tabela 2. Fontes de flavonoides e estrutura química básica.....	26
Tabela 3. Atividade antioxidante <i>in vitro</i> do GSPE.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e formação de espécies reativas.....	15
Figura 2. Produção de espécies reativas e suas consequências.....	16
Figura 3. Apoptose via proteína p53.....	19
Figura 4. Proteínas alvo e funções da sirtuína 1 e da sirtuína 3.....	22
Figura 5. Defesas enzimáticas.....	24
Figura 6. Estrutura básica de um monômero de flavan-3-ol.....	27
Figura 7. Estrutura química das proantocianidinas B.....	28
Figura 8. Órgãos envolvidos na absorção e metabolismo das proantocianidinas.....	29
Figura 9. Atividades biológicas das proantocianidinas.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS+	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
AKT	Serina / treonina quinase AKT 1
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
AP-1	Ativador de proteína-1
Apaf-1	Fator de ativação de apoptose
ATP	Trifosfato de adenosina
ADP	Bifosfato de adenosina
CI	Complexo I da cadeia de transporte de elétrons
CII	Complexo II da cadeia de transporte de elétrons
CIII	Complexo III da cadeia de transporte de elétrons
CIV	Complexo IV da cadeia de transporte de elétrons
CAT	Catalase
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CoQ	Coenzima Q
DPPH[•]	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ERK1 / 2	Quinase 1 / 2 regulada por sinal extracelular
eNOS	Óxido nítrico sintases endotelial
ER	Espécies Reativas
GLUT4	Transportador de glicose tipo 4
GSH	Glutationa oxidada
GPx	Glutationa peroxidase
GS-SG	Glutationa dissulfeto
HEK-293	Célula embrionária de rim humano

IL-1β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
iNOS	NOS indutível
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
MTT	((3 - [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio)
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotideo
NDUFS7	NADH: subunidade central do oxidoreductase ubiquinona S7
NF-kβ	Fator nuclear kB
NOS	Óxido nítrico sintases
PARP	Poly (ADP-ribose) polimerase
PGC1-α	Coativador do receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama 1- α
RL	Radicais livres
RO\cdot	radical alcóxil
RO₂\cdot	radical peróxil
ROOH	Hidroperóxido orgânico
SIRT 1	Sirtuína 1
SIRT 3	Sirtuína 3
SOD	Superóxido dismutase
SOD 1	Superóxido dismutase 1
SOD 2	Superóxido dismutase 2
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF-α	Fator de necrose tumoral
UCP1	proteína desacopladora mitocondrial 1

RESUMO

A uva possui uma quantidade abundante de proantocianidinas, as quais se encontram localizadas principalmente em sua semente. Estudos têm demonstrado que as proantocianidinas da semente de uva atuam na diminuição do estresse oxidativo e da inflamação e, ainda, na modulação da disfunção mitocondrial. No entanto, não se sabe ao certo o mecanismo pelo qual as proantocianidinas promovem estes efeitos. Respostas ao estresse gerado pela mitocôndria e a atividade dos complexos da cadeia transportadora de elétrons podem ser coordenados por uma família de proteínas chamada sirtuínas. Desta forma, as sirtuínas são um alvo terapêutico importante em doenças que possuem em sua fisiopatologia a disfunção mitocondrial, tais como o câncer, doenças neurodegenerativas (Parkinson e Alzheimer), aterosclerose e diabetes. Neste intuito, os produtos naturais emergem como uma estratégia para modular o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade das proantocianidinas da semente de uva em modular os efeitos do H_2O_2 quanto ao estresse oxidativo, a função mitocondrial, a apoptose e a expressão da sirtuína 1 e da sirtuína 3 em células embrionárias de rim humano HEK-293. Para os testes, as células HEK-293 foram tratadas com diferentes concentrações de proantocianidinas (25, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$) por 30 minutos, seguida por um tratamento por 24 horas com o H_2O_2 (100 μM), um conhecido indutor de dano oxidativo celular. Os resultados mostraram que o tratamento com proantocianidinas foi capaz de prevenir a morte celular e a ocorrência do dano oxidativo a lipídios e proteínas em células HEK-293. As proantocianidinas também evitaram a depleção da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase, causada pelo H_2O_2 . A atividade da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (complexos I, III, IV), bem como a expressão da subunidade 7 do complexo I mitocondrial e os níveis de ATP, que haviam sido diminuídos pelo H_2O_2 , foram preservados com o tratamento com

proantocianidinas. Para o complexo II, as proantocianidinas diminuíram sua atividade, que havia sofrido um aumento com o tratamento com o H₂O₂. As proantocianidinas também preveniram a ocorrência de apoptose induzida pelo H₂O₂, via diminuição da expressão das proteínas PARP, p53 e BAX. A expressão das sirtuínas 1 e 3 também foi modulada com o tratamento com proantocianidinas, através do aumento da expressão da sirtuína 1 e diminuição da expressão da sirtuína 3. Estes dados demonstram que as proantocianidinas são moléculas capazes de reduzir o estresse oxidativo, a disfunção mitocondrial e a apoptose em células HEK-293. A modulação destes marcadores ocorreu em virtude do aumento da expressão da sirtuína 1 pelas proantocianidinas, demonstrada pela primeira vezem nosso trabalho.

Palavras-chave: Proantocianidinas, Mitocôndrias, Estresse Oxidativo, Apoptose, Sirtuina 1, Sirtuina 3, HEK-293.

ABSTRACT

The grape has an abundant quantity of proanthocyanidins, which are located inside the seeds. Researches has shown proanthocyanidins of the grape seeds act by reducing the oxidative stress, inflammation and act in the modulation of the mitochondrial dysfunction as well. However, it is not known exactly how the proanthocyanidins mechanism foster these effects. Answers to the stress provided by the mitochondria and by the complex electron transport chain activity can be coordinated by a protein family called sirtuins. This way, sirtuins are an important therapeutic target in diseases, which has in their physiopathology, the mitochondrial dysfunction, as cancer, neurodegenerative diseases (Parkinson e Alzheimer), atherosclerosis and diabetes. For this purpose, natural products emerge as a strategy to modulate the oxidative stress and the mitochondrial dysfunction. Thus, the study purpose was to evaluate the grape seed proanthocyanidins capacity to modulate the H₂O₂ effects in terms of oxidative stress, the mitochondrial function, the apoptosis and the sirtuin 1 and sirtuin 3 manifestation in the HEK-293 human kidney's embryonic cells. In the tests, the HEK-293 cells were treated with different proanthocyanidins concentrations (25, 50 e 100 µg/ml) by 30 minutes, followed by a 24 hour H₂O₂ (100µM) treatment, known as an oxidative cellular damage inductor. Results reveal that the proanthocyanidins treatment was capable to prevent the cellular death and the oxidative damage occurrence to lipids and proteins into HEK-293 cells. The proanthocyanidins also avoided the depletion of the antioxidant enzyme superoxide dismutase activity, caused by the H₂O₂. The mitochondrial electron transport chain activity (complexes I, III and IV), as the expression of the 7-subunit of the mitochondrial I complex and the ATP levels, decreased by H₂O₂, were preserved with the proanthocyanidins treatment. To the complex II, proanthocyanidins reduced its activity, which had suffered an increase due the H₂O₂ treatment. Proanthocyanidins also avoided

the apoptosis occurrence induced by H₂O₂ by reducing the PARP, p53 e BAX proteins expression. Sirtuins 1 and 3 expression was also modulated with the proanthocyanidins treatment, through the enhancement of sirtuin 1 expression and the sirtuin 3 depletion. These data points appoint that proanthocyanidins are cells capable to reduce the oxidative stress, the mitochondrial dysfunction and the apoptosis in HEK-293 cells. These markers increase occurred due to the sirtuin 1 expression regulation made by the proanthocyanidins, attested for the first time in our work.

Keywords: Proanthocyanidins, Mitochondria, Oxidative Stress, Apoptosis, Sirtuin 1, Sirtuin 3, HEK-293.

1. INTRODUÇÃO

As proantocianidinas são formadas a partir da polimerização de unidades de flavan-3-ol, através do acoplamento de monômeros de catequina e epicatequina. As proantocianidinas representam um grupo de flavonoides amplamente ingerido na dieta, e estão presentes em alimentos como o chocolate, vegetais, frutas como o caqui, a maçã, a uva e seus derivados. Na uva, as proantocianidinas são encontradas em maior quantidade em suas sementes.

As proantocianidinas da semente da uva vêm sendo bem documentadas como importantes antioxidantes e reguladoras das vias de sinalização relacionadas ao estresse oxidativo, e também como moléculas capazes de promover ações anti-inflamatória, anti-obesidade, anti-apoptótica, capazes de aumentar a expressão de enzimas antioxidantes e também, capazes de prevenir a disfunção dos complexos I a IV da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. Porém, o mecanismo pelo qual as proantocianidinas promovem estes efeitos ainda não é conhecido.

Mitocôndrias são organelas celulares encontradas em células eucarióticas, com função de gerar energia celular na forma de adenosina trifosfato, através da fosforilação oxidativa. A mitocôndria é considerada a maior fonte endógena de geração de espécies reativas de oxigênio, pois durante o transporte de equivalentes redutores, os elétrons podem escapar, reagindo com o oxigênio para formar espécies reativas de oxigênio. A desregulação na atividade dos complexos mitocondriais (disfunção mitocondrial) pode conduzir a uma maior produção destas espécies reativas. A disfunção mitocondrial, e consequente aumento na produção das espécies reativas, somados a um sistema antioxidante que é incapaz de promover a detoxificação ou neutralização das mesmas, ocasiona o estresse oxidativo; o estresse oxidativo conduz a danos a macromoléculas celulares, como lipídeos, proteínas e DNA. A acumulação de danos oxidativos às

moléculas podem levar a um agravamento dos níveis normais de apoptose. A disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo estão associadas a doenças como o câncer, doenças neurodegenerativas (Parkinson e Alzheimer), aterosclerose e diabetes.

Proteínas da família das sirtuínas têm sido estudadas por serem capazes de coordenar as respostas celulares e a homeostase redox. A sirtuína 1 e sirtuína 3 são as mais amplamente estudadas. A sirtuína 1 possui relação com a diminuição da expressão de proteínas pró-apoptóticas, como também com o aumento da resposta anti-inflamatória e da biogênese mitocondrial. Já a sirtuína 3 está associada a regulação dos complexos mitocondriais I, II e adenosina trifosfato sintase (V), garantindo assim os níveis de adenosina trifosfato. Sua expressão também está relacionada ao estímulo da expressão e atividade da enzima superóxido dismutase 2.

Polifenóis como o resveratrol e a (-)-epigallocatequina-3-galato já demonstraram serem capazes de promoverem efeito reguladores das sirtuínas 1 e 3. Portanto, o estudo de compostos fenólicos se torna interessante para verificação de sua atividade sobre a expressão de sirtuínas e coordenação da função mitocondrial. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi de avaliar a capacidade das proantocianidinas da semente da uva em reduzir o estresse oxidativo, modular a função mitocondrial, a expressão de proteínas apoptóticas e a expressão de sirtuínas em células embrionárias de rim humano HEK-293 tratadas com H₂O₂. Este trabalho demonstra o possível papel farmacológico das proantocianidinas, e pode colaborar para o desenvolvimento de coadjuvantes para o tratamento de doenças relacionadas a disfunção mitocondrial e ao estresse oxidativo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Espécies reativas, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial

Radicais livres (RL) são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados na camada de valência, o que os torna altamente instáveis e capazes de reagir com diversas moléculas da estrutura celular. Os RL podem ser originados do oxigênio e do nitrogênio (Halliwell 2012). São exemplos de RL o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (HO^{\bullet}), radical alcóxil (RO^{\bullet}), radical peróxil (RO_2^{\bullet}) e óxido nítrico (ON^{\bullet}). O $O_2^{\bullet-}$ é o radical mais abundante, e é formado a partir da cadeia de transporte de elétrons. O HO^{\bullet} , é extremamente reativo, pode ser formado a partir da reação de Haber-Weiss, através da reação entre o $O_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 , ou por meio da Reação de Fenton, na qual a formação se dá a partir da reação de H_2O_2 com metais de transição, como o Fe^{2+} (Halliwell 2012). Já, o ON^{\bullet} , é um RL sintetizado por um grupo de enzima denominadas óxido nítrico sintases (NOS), sendo a sua expressão associada a respostas imunológicas (O'Donnell 2001).

As espécies reativas (ER) não radicalares não possuem elétrons desemparelhados, no entanto, são capazes de gerar RL. Dentre estas espécies não radicalares, encontram-se o oxigênio molecular singlete (1O_2), hidroperóxidos orgânicos (ROOH), ozônio (O_3) e ânion peroxinitrito ($ONOO^-$). A formação do $ONOO^-$ se dá através da reação entre o ânion ON^- e o $O_2^{\bullet-}$ (Lü *et al.* 2010; Sies *et al.* 2017). O H_2O_2 também é uma ER e quando produzido de forma exacerbada, está vinculado a ocorrência do estresse oxidativo e a sinalização apoptótica (Wittmann *et al.* 2012).

As ER são produtos de diversas vias metabólicas do organismo humano (Kehrer & Kloz 2015). Células de organismos aeróbicos são continuamente expostas a ER como parte do metabolismo normal. Em níveis baixos, as ER podem contribuir para a resposta

celular a infecções, reconhecimento intercelular e transdução de sinal, e até mesmo para o controle da proliferação e diferenciação celular (Chiu & Dawes 2012).

As ER são advindas de fontes endógenas e exógenas (Georgieva *et al.* 2017). As fontes exógenas de ER englobam irradiação (UV, raios X, raios gama), poluentes atmosféricos e produtos químicos. As fontes endógenas incluem microssomas e os peroxissomos, células imunes como os neutrófilos e macrófagos, NAD (P) H oxidase, citocromo c oxidase e xantina oxidase, como também através de isoenzimas específicas da sintase do óxido nítrico - como mtNOS, NOS endotelial (eNOS) e NOS indutível (iNOS)-, mas principalmente através da disfunção dos complexos mitocondriais da cadeia de transporte de elétrons (Trachootham *et al.* 2008).

As mitocôndrias são organelas celulares encontradas em células eucarióticas, com função de gerar energia celular na forma de adenosina trifosfato (ATP) através da fosforilação oxidativa. Este processo é dependente da dinâmica da cadeia de transporte de elétrons, a qual é composta pelos complexos I, II, III e IV, e ATP-sintase (Yu & Pekkurnaz 2018). Os complexos mitocondriais possuem também subunidades, sendo que o complexo I é o maior e mais complicado complexo enzimático, sendo composto por 45 subunidades (El-Hattab & Scaglia 2016). Dentre estas subunidades, a subunidade 7, denominada *NADH: ubiquinona oxidoreductase core subunit S7* (NDUFS7), que contém o último grupamento ferro-enxofre, e é responsável pela redução da ubiquinona a ubiquinol (Janssen *et al.* 2006). Prejuízos a subunidade (NDUFS7) já foram descritos no córtex pré-frontal de pacientes com desordens bipolares (Andreazza *et al.* 2010).

A mitocôndria é considerada a maior fonte endógena de geração de espécies reativas de oxigênio (Murphy 2009). Durante o processo de transporte de elétrons, elétrons podem escapar (Figura 1), mais especificamente dos complexos I (NADH: ubiquinona redutase) e III (Citocromo-c redutase) da cadeia de transporte de elétrons para

a matriz mitocondrial ou para o espaço inter-membrana, reagindo com o oxigênio para formar radicais como o $O_2^{\cdot-}$. O $O_2^{\cdot-}$ pode ser dismutado pela enzima superóxido dismutase 1 (SOD1) no espaço inter-membrana e superóxido dismutase 2 (SOD2) na matriz mitocondrial, formando H_2O_2 , que será posteriormente dismutado pela enzima glutatona peroxidase (GPx) (Kussmaul & Hirst 2006; Georgieva *et al.* 2017).

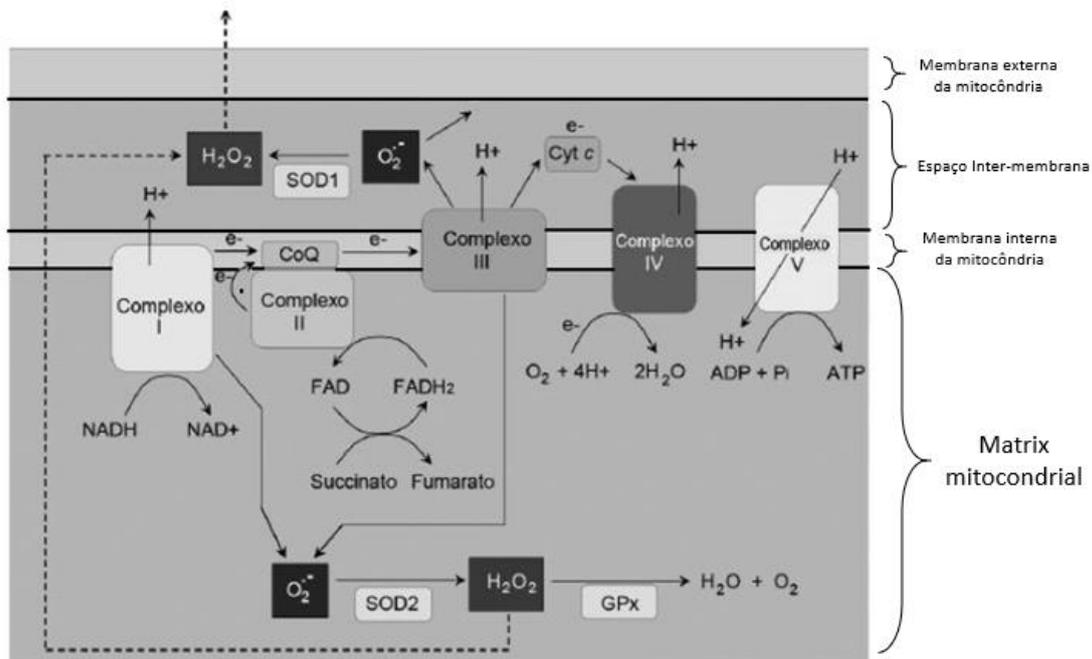


Figura 1. Cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e formação de espécies reativas. SOD 1 e SOD2, Isoenzimas de superóxido dismutase; GPx, glutatona peroxidase; CoQ, coenzima Q; Cit c, citocromo c. Fonte: adaptado de Georgieva *et al.* 2017.

Têm-se demonstrado que a redução da atividade dos complexos I e III acarreta em um aumento de Ca^{2+} intracelular, a ruptura do potencial de membrana mitocondrial e despolarização da membrana mitocondrial, bem como um aumento na geração de $O_2^{\cdot-}$ (Carrasco-Pozo *et al.* 2012; Sandoval-Acuña *et al.* 2014).

Em condições fisiológicas normais, as células mantêm sua homeostase redox através da produção e eliminação das ER (Sies *et al.* 2017). Porém, quando ocorre uma produção exacerbada de ER somados a um sistema antioxidante que é incapaz de

promover a detoxificação ou neutralização dos mesmos, o estresse oxidativo acontece (Trachootham *et al.* 2008). O estresse oxidativo gerado em virtude da disfunção mitocondrial e como consequência de diferentes fatores estimulantes (biológicos, químicos, físicos), conduz a uma superprodução de ER, causando assim danos a biomoléculas celulares, como lipídios, proteínas e DNA. Conforme os níveis de ER se elevam, as células podem ser conduzidas a apoptose (Figura 2) (Kehrer & Kloz 2015; Georgieva *et al.* 2017).

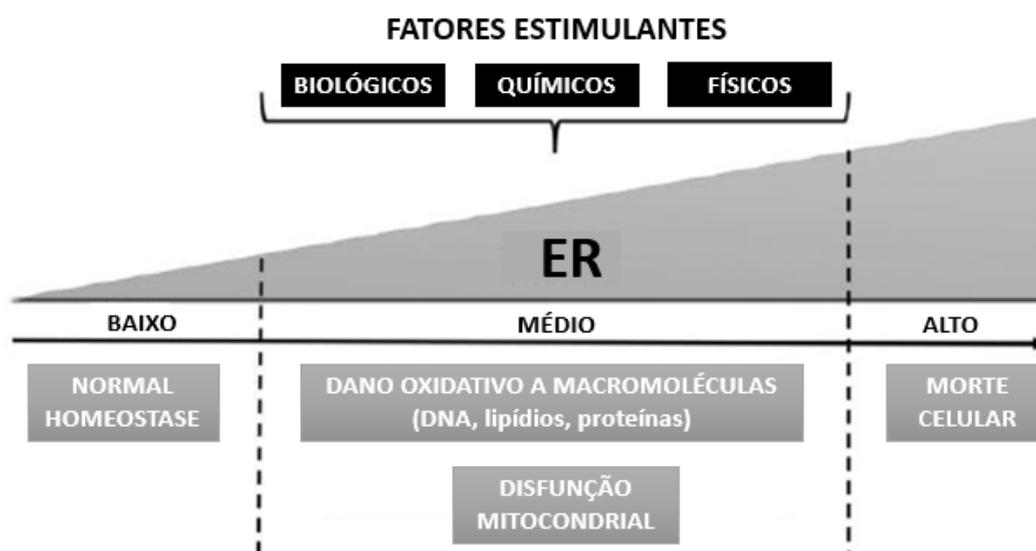


Figura 2. Produção de espécies reativas e suas consequências. Fonte: adaptado de Georgieva *et al.* 2017

A peroxidação lipídica é um dos principais danos causados por ER, visto que os lipídios são as moléculas mais suscetíveis à modificação oxidativa. Os fosfolipídios da membrana celular são particularmente suscetíveis a esses danos devido à sua natureza poli-insaturada, ou seja, maior presença de duplas ligações. As ER reagem com hidrogênio no lipídio levando à formação de um radical lipídico, o qual pode formar um outro radical lipídico via um intermediário, e assim, ocasionando a uma reação em cadeia. Estes danos à membrana celular e organelas podem ocasionar graves disfunções (Farmer

& Mueller 2013). Os produtos finais da peroxidação lipídica podem ser avaliados através da metodologia de TBARS (Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbiturico), que quantifica os produtos capazes de reagir com o ácido tiobarbitúrico, um valioso indicador de níveis de danos oxidativos aos lipídeos (Tsikas, 2017).

Além de atuar sobre os lipídios, as ER podem conduzir a carbonilação de proteínas. A carbonilação de proteínas é uma modificação pós-translacional irreversível. As ER podem oxidar aminoácidos, e assim, conduzir a produção de uma porção carbonila, como um aldeído ou uma cetona. Isto pode perturbar a função fisiológica da proteína afetada, como a função de receptores, enzimas e anticorpos, como também, ativar vias de morte celular (Crabtree 2003; Dalle-Donne *et al.* 2003; Mangialasche 2009). A mensuração dos níveis de danos oxidativos a proteínas pode ser avaliado através da quantificação dos grupos carbonil (Levine *et al.* 1990).

As ER representam uma das fontes mais importantes de dano oxidativo ao DNA. Esta oxidação pode conduzir a oxidação das bases purina e pirimidina e quebras de fita simples de DNA, desta forma, afetando vias de transcrição e tradução celular (Breen & Murphy 1995; Carochó & Ferreira 2013).

Os danos a mitocôndrias, associados com um aumento da geração de espécies reativas de oxigênio vêm sendo amplamente associados à fisiopatologia de diversas doenças crônico-degenerativas, hiperproliferativas (Forbes-Hernández *et al.* 2015) e relacionadas à idade, como câncer (Pokorný, *et al.* 2015), neurodegeneração como Parkinson e Alzheimer (Lane *et al.* 2015; Larsen *et al.* 2018), aterosclerose (Yu & Bennett 2014) e diabetes (Kim *et al.* 2008; Blake & Ian 2013).

1.2 Estresse oxidativo leva a apoptose

A apoptose é um processo normal e constante de renovação celular do nosso organismo, caracterizado por alterações morfológicas e bioquímicas. É também um mecanismo de defesa contra agressões celulares, como a exposição a ER (Georgieva *et al.* 2017). A acumulação de danos oxidativos as células pode conduzir a um aumento da ocorrência da apoptose (Phaniendra *et al.* 2015).

A apoptose é executada pelas caspases, consideradas as reguladoras centrais da apoptose. Elas podem ser divididas em caspases iniciadoras de apoptose (caspase-2, -8, -9 e -10) e caspases efetoras da apoptose (caspase-3, -6 e -7). As caspases iniciadoras ativam as caspases efetoras, por dimerização, as quais executam a apoptose (Sinha *et al.* 2013). As caspases podem ser ativadas por diferentes mecanismos (Gabai *et al.* 2000; Sinha *et al.* 2013):

1. ligação por receptor (via extrínseca): pode ser iniciada via ativação por TNF- α , ativando a caspase-8 e caspase-10.

2. mecanismos dependentes da mitocôndria (via intrínseca): pode ser ativada via danos intracelulares, por ativação da caspase-9.

3. ativação de Akt (via intrínseca/extrínseca): reguladas por sinais intracelulares (mitocôndria) e extracelulares (ERK1 / 2), levando a ativação de proteínas p38 e c-Jun (quinases terminais -JNK).

Dentre as proteínas que são reguladas pela via Akt, está a proteína p53. A proteína p53 é um fator regulador de diversos mecanismos necessários para o bom funcionamento celular. Sua função está relacionada a manutenção da estabilidade genômica, homeostase celular e ao reparo do DNA (Wawryk-Gawda *et al.* 2014). Também tem sido descrito o papel pró-apoptótico da proteína p53 no caso da exposição a altos níveis de ER, como ocorre no processo de senescência celular, e também em casos de danos genéticos

impossíveis de serem reparados (Wawryk-Gawda *et al.* 2014). Além dos danos ao DNA, a proteína p53 também pode ser ativada via JNK (Johnson & Nakamura 2007; Sinha *et al.* 2013). As quinases terminais -JNK pertencem à família de MAP-quinases, e executam sua sinalização apoptótica por dois mecanismos distintos: por meio da migração para o núcleo ou por meio da expressão de genes pró-apoptóticos, como a proteína p53 (Dhanasekaran & Reddy 2008).

A exposição celular às ER podem levar a um aumento da expressão da proteína p53 (Figura 3), conduzindo assim a uma diminuição da expressão de proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 e a um aumento da expressão gênica de proteínas pro-apoptóticas como BAX, BBC3 (Puma) e PIG3. O aumento da expressão destas proteínas pró-apoptóticas conduz a uma maior produção de ER e assim, a ocorrência da apoptose (Fridman & Lowe, 2003).

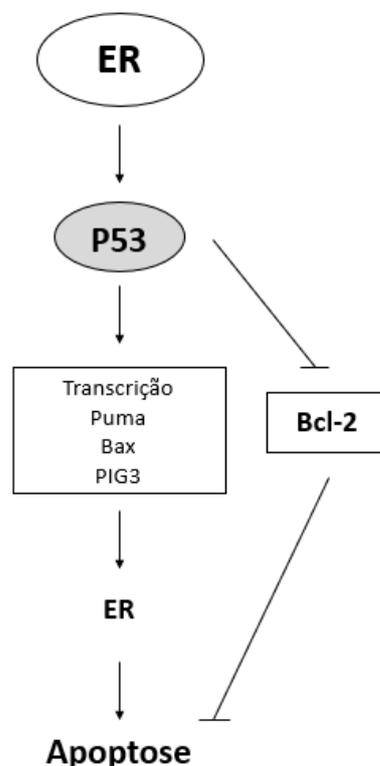


Figura 3. Apoptose via proteína p53. ER, espécies reativas. Fonte: adaptado de Trachootham *et al.* 2008.

A proteína BAX é uma proteína pró-apoptótica da família Bcl-2, e é considerada uma proteína chave na via mitocondrial de apoptose e pode ser ativada via p53, como também em casos de danos mitocondriais. Na superfície mitocondrial, ela promove um aumento na permeabilidade da membrana mitocondrial e a liberação de citocromo c (Ma *et al.* 2014), ativando o fator de ativação de apoptose (Apaf-1) e a caspase 9 (Fridman & Lowe 2003; Sumbayev & Yasinska 2005).

As caspases, quando ativadas, conduzem a clivagem proteolítica de substratos, como PARP, a fragmentação do DNA, a perda da integridade da membrana e morte celular, e desta forma, conduzem a apoptose (Morales *et al.* 2014). A PARP-1 clivada facilita o desmembramento celular e assegura a conclusão e irreversibilidade da apoptose (Shih & Cherng 2012). Além de estar relacionada a execução final da apoptose, a proteína PARP também se apresenta elevada em casos de danos ao DNA (Hocsak *et al.* 2017).

1.3 Sirtuínas e controle da homeostase redox

As sirtuínas são desacetilases de histona da classe III altamente conservadas, e são proteínas que dependem de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) para a sua atividade. Em mamíferos, as sirtuínas constituem uma família de 7 proteínas (sirtuína 1 a sirtuína 7), sendo distribuídas em diferentes compartimentos celulares (Favero *et al.* 2015). As sirtuínas promovem suas ações através de desacetilação e ribosilação de ADP, demalonização e desuccinação das proteínas alvo (Lin *et al.* 2018; Morigi *et al.* 2018), conforme demonstra a Tabela 1.

As sirtuínas têm sido estudadas devido à sua capacidade de identificar alterações no metabolismo energético e na homeostase redox, bem como em coordenar as respostas celulares para manter a integridade genômica (Bosch-Presegué & Vaquero 2015; Kupis *et al.* 2016; Lin *et al.* 2018).

Tabela 1. Localização intracelular e funções das sirtuínas. SIRT, sirtuína. Fonte: adaptado de Lin *et al.* 2018.

Sirtuína	Localização intracelular	Funções
SIRT 1	Núcleo e citosol	Desacetilase
SIRT 2	Citosol, núcleo e mitocôndria	Desacetilase
SIRT 3	Mitocôndria e núcleo	Desacetilase
SIRT 4	Mitocôndria	Ribosiltrasnferase de ADP
SIRT 5	Mitocôndria e citosol	Desacetilase, demalonilase e desuccinase
SIRT 6	Núcleo	Desacetilase e ribosiltrasnferase de ADP
SIRT 7	Núcleoolo	Desacetilase

Entre as 7 sirtuínas existentes, as sirtuínas 1 (SIRT 1) e sirtuína 3 (SIRT 3) são as mais amplamente estudadas. A expressão da SIRT1 possui relação com a diminuição da expressão de proteínas pró-apoptóticas como p53 e FoxO, bem como ao aumento de proteínas BCL2, relacionadas a resposta anti-apoptótica. A regulação das proteínas p53 e FoxO também é descrita como preventiva do processo de senescência celular. A SIRT1 também possui um papel central na resposta anti-inflamatória, impedindo duas distintas vias de sinalização pro-inflamatória - via Nfk β e da proteína STAT3. A via Nfk β é responsável pela propagação do estímulo pró-inflamatório, via aumento da expressão de proteínas como TNF- α e IL-1 β , e a proteína STAT3 está relacionada ao aumento da expressão de IL-6. Além disto, a biogênese mitocondrial também possui associação com a SIRT1, via estímulo da proteína PGC-1 α (Morigi *et al.* 2018, Yuan *et al.* 2016).

No que se refere a SIRT3, sua resposta está associada a regulação dos complexos mitocondriais I, II e ATP sintase (V), garantindo assim os níveis de ATP. Sua expressão também está relacionada ao estímulo da expressão e atividade da enzima SOD2 (Parihar

et al. 2015; Morigi *et al.* 2018; Cheung *et al.* 2015). A figura 4 demonstra as proteínas alvo e as funções da SIRT1 e da SIRT3.

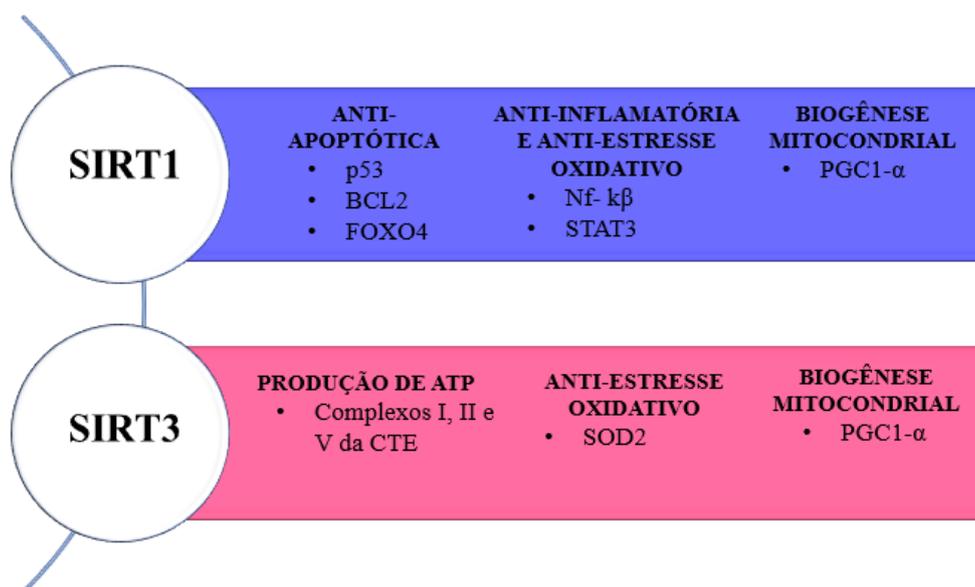


Figura 4. Proteínas alvo e funções da sirtuínas 1 e da sirtuína 3. Fonte: adaptado de Morigi *et al.* 2018.

Alguns polifenóis já foram demonstrados como capazes de regular as sirtuínas, como a SIRT 1 e SIRT 3, como é o caso do resveratrol e da (-)-epigallocatequina-3-galato. Os efeitos do resveratrol sobre a SIRT 1 tem sido demonstrado em diversos estudos, e dentre eles, no estudo de He *et al* (2015), conduzido em células de osteoblastos de ratos MC3T3-E1 tratadas com resveratrol e com H₂O₂. O resveratrol foi capaz de aumentar a expressão da SIRT 1, que havia sido reduzida pelo H₂O₂, e desta forma, prevenir a morte apoptótica induzida pelo aumento da expressão da proteína pro-apoptótica p53.

Em pesquisa conduzida com células normais HGF-1 (célula de fibroblasto de gengiva) e células cancerígenas SCC-25 e SCC-9 (células orais de carcinoma escamoso de humanos), a (-)-epigallocatequina-3-galato causou o bloqueio da expressão da SIRT 3, conduzindo a um aumento na acumulação de ER, e a consequente perda do potencial

de membrana mitocondrial, ocasionando, desta maneira, a apoptose de células cancerígenas. No entanto, em células normais, a (-)-epigallocatequina-3-galato aumentou a expressão da SIRT 3, promovendo aumento na expressão dos genes antioxidantes glutaciona peroxidase 1 e FoxO3 e a diminuição da ocorrência de ER (Tao *et al.* 2015).

1.4 Defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas

No intuito de prevenir os danos causados pelas ER, as células buscam manter um equilíbrio entre a produção e a eliminação de ER, através dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Sies *et al.* 2017).

A linha de defesa antioxidante enzimática é composta pelas enzimas GPx, a catalase (CAT) e a SOD, as quais detoxificam ER (Carocho & Ferreira 2013; Liguori *et al.* 2018). Existem três classes de SOD: Cu/Zn-SOD (SOD1 e SOD3), Fe-SOD e Mn-SOD (SOD2). Destes, a SOD1 encontra-se no citoplasma, a SOD2 encontra-se nas mitocôndrias e SOD3 no líquido extracelular (Perry 2010).

Conforme demonstra a Figura 5, a enzima SOD catalisa a dismutação de superóxido em O_2 e em H_2O_2 . O H_2O_2 se torna substrato para detoxificação pelas enzimas CAT ou GPx. A enzima CAT dismuta o H_2O_2 em H_2O e O_2 , já a enzima GPx atua doando elétrons para reduzir peróxidos – com oxidação da glutaciona (GSH) ao dissulfeto (GSSH). A enzima CAT apresenta um maior KM para H_2O_2 do que a GPx, a qual opera em concentrações mais baixas de H_2O_2 (Halliwell & Guterige 2000).

Existe ainda uma linha de defesa antioxidante secundária. Esta é composta por enzimas como a glutaciona redutase (GSR), que converte a glutaciona da sua forma dissulfeto (GS-SG) para a forma reduzida (GSH). A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase é responsável por manter os níveis de NADPH (nicotinamida adenina

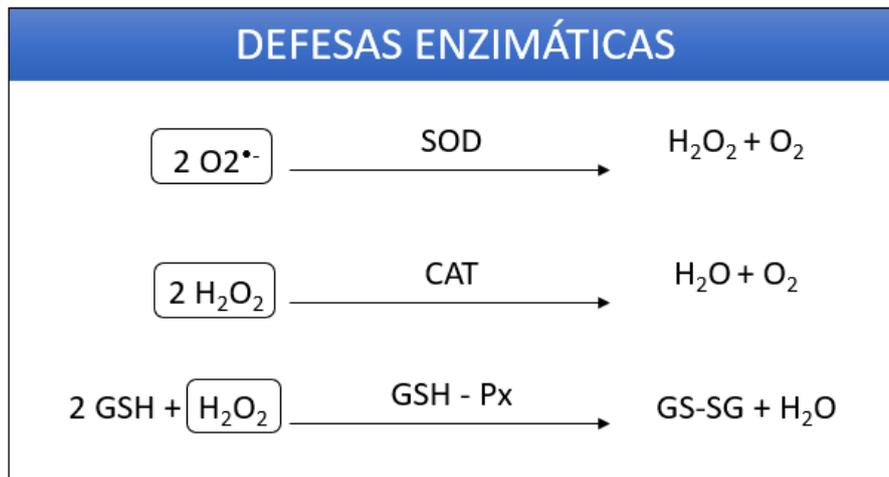


Figura 5. Defesas enzimáticas. SOD, Superóxido dismutase; CAT, catalase; GSH, glutaciona oxidada; GS-SG, glutaciona reduzida; GPx, glutaciona peroxidase. Fonte: adaptado de Walker *et al.* 2014.

dinucleotídeo fosfato) para a redução da glutaciona oxidada (Rahman 2007; Carochó & Ferreira 2013).

Assim como nosso sistema de defesa enzimático, as defesas não enzimáticas advindas da dieta também são cruciais para a detoxificação das espécies reativas. Dentre os antioxidantes não enzimáticos, encontram-se o β -caroteno, as vitaminas C (ácido L-ascórbico) e E, e os compostos fenólicos (Bouayed & Bohn 2010). O β -caroteno encontra-se presente em alimentos como cenoura, espinafre, couve, batata doce e óleo de palma (Thakur *et al.* 2017). A vitamina C é encontrada em vegetais, frutos e tubérculos (Jia *et al.* 2018), e a vitamina E (família tocoferol e tocotrienol) está presente em alimentos como nozes e sementes (Shahidi & Camargo 2016).

Os compostos fenólicos são os antioxidantes não enzimáticos mais abundantes e estudados. Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas e são amplamente encontrados em frutas, verduras e seus derivados. Estes compostos são conhecidos por apresentarem atividade antioxidante, isto é, capacidade de reduzir radicais

livres e assim evitar e/ou diminuir os danos causados pelo estresse oxidativo (Del Rio 2015; Croft 2016).

Os polifenóis podem ser divididos em flavonoides e não flavonoides. Os flavonoides são o grupo mais amplamente estudado (Tsao 2010). A Tabela 2 apresenta a lista de alguns dos principais grupos de flavonoides, entre eles, flavonas, flavonóis, flavanonas, flavan-3-óis, isoflavonas, antocianinas, chalconas, monômeros de flavan-3-óis e oligômeros e polímeros de flavan-3-ol. Os flavonoides podem ocorrer na sua forma livre (agliconas), e também na forma glicosilada, acilada, ou como oligômeros e estruturas polimerizadas, como é o caso dos derivados de flavan-3-ol (González-Paramás *et al.* 2011).

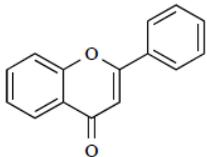
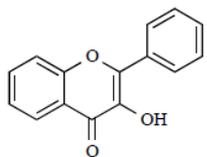
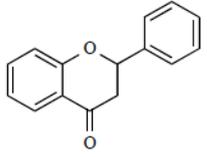
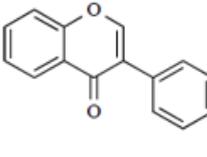
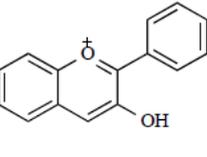
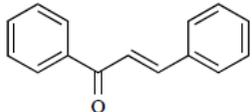
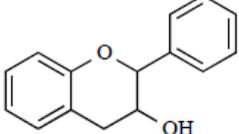
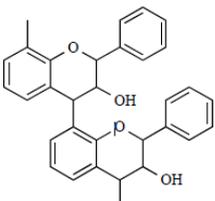
Os polifenóis, como o resveratrol, a curcumina, e a epigallocatequina-3-galato vem sendo relacionados a regulação da função mitocondrial, por meio do aumento da expressão de SIRT 1, e consequente estímulo a proteína PGC1- α , relacionada a biogênese mitocondrial, e também através da eliminação de ER e aumento das enzimas antioxidantes endógenas (Teixeira *et al.* 2018).

O consumo de polifenóis está associado a diminuição da ocorrência de uma série de doenças associadas ao estresse oxidativo, como câncer (Mocanu *et al.* 2015), diabetes (Dragan 2015), aterosclerose, doenças cardiovasculares (Cheng *et al.* 2017) e doenças neurodegenerativas (Bhullar & Rupasinghe 2013).

1.5 Proantocianidinas

As proantocianidinas pertencem a uma subclasse mais complexa de flavonoides (Del Rio *et al.* 2013). Elas são encontradas em alimentos como chocolate, vegetais e frutas como caqui, maçã, uva e derivados, como o vinho (Espley *et al.* 2014; Cádiz-Gurrea *et al.* 2017).

Tabela 2. Fontes de flavonoides e estrutura química básica. Fonte: adaptado de González-Paramás *et al.* 2011.

Classe de flavonoides	Estrutura Básica	Principais Compostos
Flavonas		Apigenina e luteolina
Flavonol		Quercetina, canferol e miricetina
Flavanona		Hesperidina e naringenina
Isoflavonas		Genisteína e daidzeína
Antocianidinas		Cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, petunidina e peonidina
Chalcona		Floretina, arbutina e buteina
Monômeros de Flavan-3-ol		(Epi)catequina e (epi)galocatequina
Oligômeros e Polímeros de Flavan-3-ol (Proantocianidinas)		Procianidinas e prodelfidininas

As proantocianidinas são formadas a partir da polimerização de unidades de flavan-3-ol e são naturalmente encontradas na forma de oligômeros e polímeros (Ou & Gu 2014). Fazem parte dos derivados de flavan-3-ol monômeros simples, como a catequina, epicatequinas e galocatequinas, ou unidades mais complexas, as poliméricas e oligoméricas, constituídas por duas ou mais unidades de monômeros de flavan-3-ol (Del Rio *et al.* 2013). A principal característica química dos flavan-3-ol é a presença de um centro quiral adicional em C4, além dos dois centros quirais em C2 e C3 do flavan-3-ol monomérico (Figura 6).

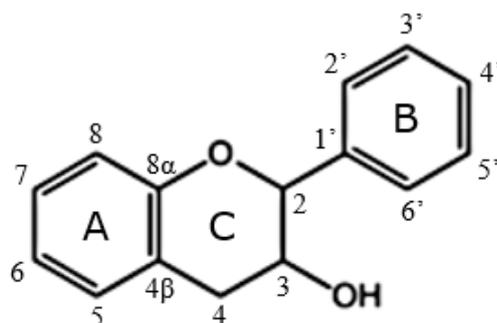
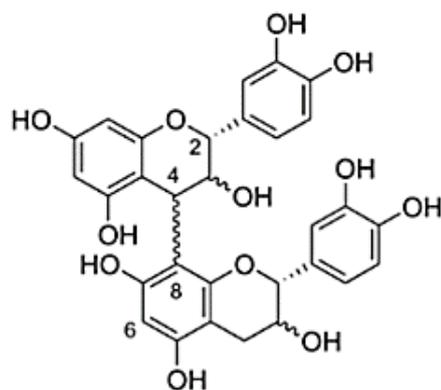


Figura 6. Estrutura básica de um monômero de flavan-3-ol.

Dentre as proantocianidinas, já foram descritas para extratos de sementes de uva as procianidinas B1, B2, B3, B4 e B5 (Figura 7) (Ky *et al.* 2015; Cádiz-Gurrea *et al.* 2017; Levy *et al.* 2017). As proantocianidinas do tipo B são formadas a partir de (+) - catequina e (-) – epicatequina, através de acoplamento oxidativo entre o C- 4 do monômero superior e o C - 6 ou C - 8 do lado inferior ou unidade de extensão, para criar oligômeros ou polímeros (Pascual-Teresa *et al.* 2000; Kennedy 2008; Del Rio *et al.* 2013).

As procianidinas B2, as de maior ocorrência na semente da uva, apresentam diversas atividades biológicas, tais como: indução de apoptose em células de câncer de

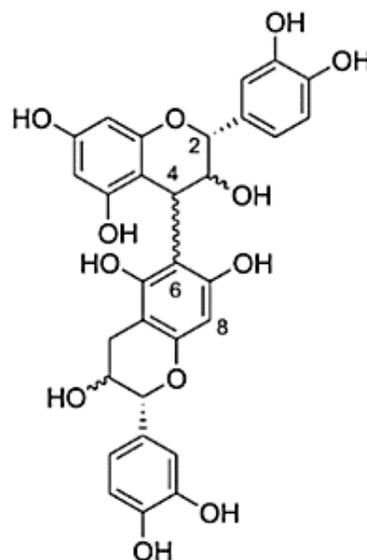


Procianidina **B1**: EC-(4 β →8)-C

Procianidina **B2**: EC-(4 β →8)-EC

Procianidina **B3**: C-(4 α →8)-C

Procianidina **B4**: C-(4 α →8)-EC



Procianidina **B5**: EC-(4 β →6)-EC

Figura 7. Estrutura química das proantocianidinas B. Fonte: adaptado de Bansode *et al.* 2016.

próstata (Gopalakrishnan *et al.* 2018), melhora do metabolismo de lipídios hepáticos em ratos (Yin *et al.* 2017), redução do estresse oxidativo e da apoptose de células de cultura primária de neurônios do grânulo cerebelar de ratos (Sutcliffe *et al.* 2017), diminuição da apoptose em células epiteliais de retina humana (Li *et al.* 2016) e ainda, aumento da expressão das enzimas antioxidantes SOD e GPx, e de SIRT 1 e de PGC1- α em células em condição de alta glicose (Bao *et al.* 2015).

As proantocianidinas são absorvidas no intestino via difusão passiva (Figura 8). Dímeros, trímeros e tetrâmeros de proantocianidinas são absorvidos no intestino em sua forma intacta, porém as proantocianidinas maiores que tetrâmeros, não. A taxa média de absorção dos dímeros de proantocianidina, como a procianidina B2, é de cerca de 10%.

(Ou & Gu 2014). Os principais órgãos que envolvem a absorção e o metabolismo das proantocianidinas estão demonstrados na Figura 8. Dímeros, trímeros e tetrâmeros de proantocianidinas são destinados ao fígado, onde sofrem a fase II de detoxificação. Passada esta fase, são distribuídos pelo organismo ou excretados pela urina. Já as proantocianidinas com grau de polimerização superior a 4, quando atingem o cólon, de forma intacta, são degradados pela microbiota local em fenilvalerolactonas e ácidos fenólicos (Ou & Gu 2014).

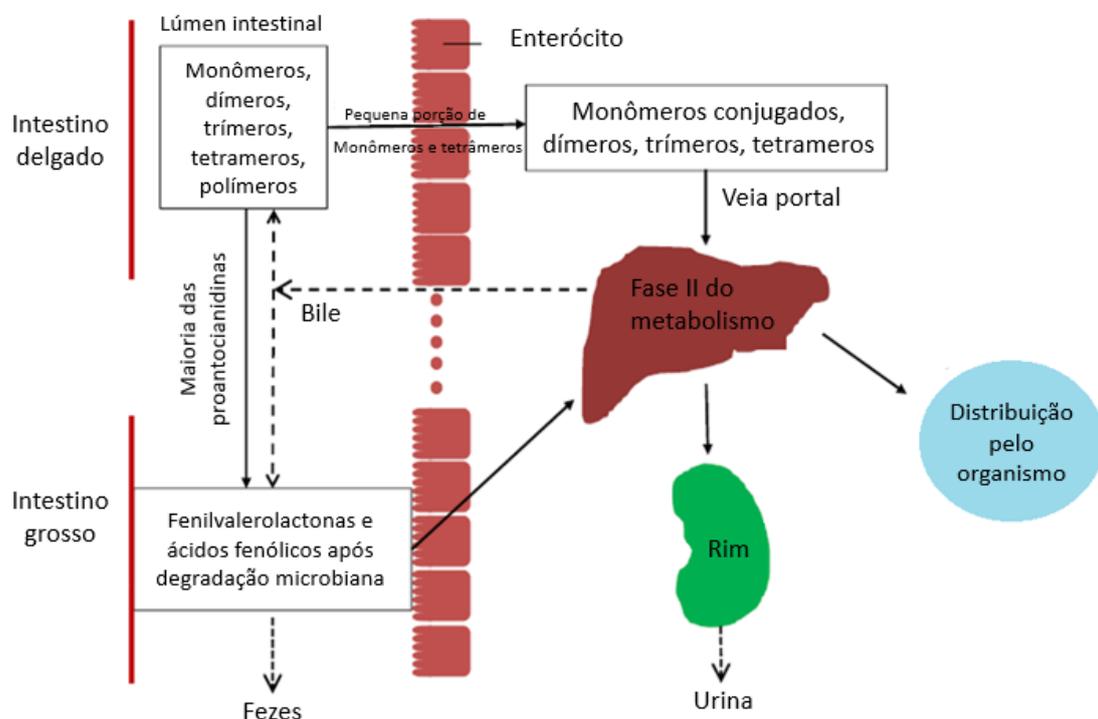


Figura 8. Órgãos envolvidos na absorção e metabolismo das proantocianidinas. Fonte: adaptado de Ou & Gu 2014.

As proantocianidinas vem sendo bem documentadas como importantes antioxidantes e moléculas reguladoras das vias de sinalização relacionadas ao estresse oxidativo. Li *et al.* (2015), em meta-análise com 29 estudos utilizando ratos tratados com proantocianidinas e com substâncias indutoras de dano oxidativo, verificaram a eficácia das proantocianidinas na redução do estresse oxidativo e melhora da atividade das

enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx). As proantocianidinas foram capazes de reduzir os níveis de danos oxidativos a lipídios, bem como, de aumentar a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx de forma significativa.

O potencial anti-inflamatório das proantocianidinas também já foi descrito na literatura. Em estudo realizado em cultura de células de macrófagos (Raw 246.7), nas quais a inflamação foi induzida com lipopolissacarídeos, as proantocianidinas, provenientes do extrato de arroz vermelho, foram capazes de inibir a produção de óxido nítrico, IL-6, TNF- α , COX-2 e iNOS, sendo que estes efeitos foram mediados via AP-1 e NF- κ B (Limtrakul et al. 2016). Günay *et al.* (2016) também avaliaram os efeitos anti-inflamatórios das proantocianidinas isoladas do tipo B2 em linhagem celular de epitélio celular distal A549 (pneumócitos tipo II) tratadas com benzo(α)pireno, um hidrocarboneto aromático policíclico. As células submetidas ao tratamento com proantocianidinas (50 μ g/ml) demonstraram uma diminuição significativa nos níveis de IL-1 β e TNF- α , bem como, nos níveis de interferon- γ .

Os efeitos anti-obesidade das proantocianidinas estão relacionados a um aumento do gasto de energia, em que as proantocianidinas causam uma regulação positiva de genes relacionados ao gasto energético, como a proteína UCP1 do tecido adiposo marrom, promovendo desta forma, um aumento na termogênese. Sua ação também se baseia em uma melhora da resposta hormonal, tendo a capacidade de reduzir a hiperinsulinemia, pois promove um aumento da adiponectina e eleva a expressão de GLUT4 no músculo esquelético. A regulação destas respostas está diretamente relacionada a ativação da proteína AMPK promovida pelas proantocianidinas. A AMPK é uma proteína reguladora do metabolismo energético no músculo esquelético, fígado e tecido adiposo, regulando positivamente a expressão de UCPs e PGC1- α , proteínas relacionadas ao aumento da termogênese e do metabolismo energético. Somado a estes

efeitos, as proantocianidinas também estão relacionada a inibição das enzimas digestivas lipase e amilase, desta forma, diminuindo a absorção de gordura e glicose no intestino (Salvadó *et al.* 2015).

Estudos também demonstraram a atividade biológica de proantocianidinas da semente da uva, em relação ao câncer. Um estudo conduzido em linhagens celulares de câncer do colo do útero humano (SiHa e HeLa) demonstrou que as proantocianidinas promoveram a apoptose de células cancerígenas de forma dose-dependente. A indução da apoptose aconteceu por meio perda do potencial de membrana mitocondrial, levando a um aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas (BAX) e diminuição das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, bem como liberação da caspase-3 e perda do potencial de membrana mitocondrial (Chen *et al.* 2014).

Estudos relacionados a atividade mitocondrial também já foram descritos para as proantocianidinas da semente da uva. As proantocianidinas, em concentração de 0,1 e 1 μM foram capazes de prevenir a ocorrência da disfunção mitocondrial induzida pelo H_2O_2 em células osteoblásticas MC3T3-E1, via melhora do potencial de membrana mitocondrial e melhora da atividade do complexo IV da cadeia de transporte de elétrons. A melhora da atividade mitocondrial foi capaz de prevenir a morte celular por apoptose induzida pelas proteínas apoptóticas p53, BAX, PARP e caspase-3 (Zhang *et al.* 2014).

A melhora da disfunção mitocondrial promovida pelas proantocianidinas da semente de uva também já foi descrita em linhagem de fibroblasto de pulmão. A melhora da função mitocondrial impediu a diferenciação celular e foi capaz de prevenir a ocorrência da fibrose pulmonar induzida por radiação. A fibrose pulmonar induzida por radiação é um efeito adverso a longo prazo da radioterapia curativa, sendo a diferenciação de miofibroblastos em fibroblásticos uma característica fundamental. O estudo foi conduzido com a linhagem celular de fibroblastos de pulmão fetal humano (HFL1), a qual

foi tratada com proantocianidinas (10 µg/ml) e submetida a um dano induzido por radiação. A irradiação induziu uma disfunção no complexo I mitocondrial e conduziu a uma aceleração na produção de ER. No entanto, as proantocianidinas foram capazes de melhorar a dinâmica mitocondrial (aumentando a atividade do complexo mitocondrial I) e de reduzir a produção de ER, inibindo assim a diferenciação celular de fibroblastos para miofibroblastos induzida por irradiação (Yang *et al.* 2017).

A procianidina B2 de semente de uva também foi relatada como tendo efeitos protetores na nefropatia diabética (DN). O estudo foi conduzido com células clonais de podócito de camundongo condicionalmente imortalizadas (MPC5), sendo estas submetidas a uma alta concentração de glicose. A apoptose induzida por altas concentrações de glicose ocorreu em virtude da disfunção mitocondrial, avaliada por meio da estrutura da mitocôndria (microscopia eletrônica), da expressão de RNA do fator respiratório nuclear 1 (NRF-1) e do fator de transcrição mitocondrial A (TFAM). No entanto, as proantocianidinas protegeram os podócitos contra a disfunção mitocondrial e apoptose induzida por glicose através da ativação do eixo AMPK-SIRT1-PGC-1 α . Os autores justificam que a ativação deste eixo promove o aumento de PGC-1 α e assim a biogênese mitocondrial (Cai *et al.* 2015).

Tendo em vista os efeitos benéficos das proantocianidinas já escritos na literatura, torna-se necessária uma avaliação mais aprofundada das proantocianidinas, para ampliar a compreensão de suas atividades biológicas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade do extrato de proantocianidina da semente de uva em reduzir o estresse oxidativo, modular a função mitocondrial, a expressão de proteínas apoptóticas e a expressão de sirtuínas em células embrionárias de rim humano HEK-293 tratadas com H₂O₂.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade celular da linhagem HEK-293 tratada com proantocianidina, em presença e ausência de H₂O₂.
- Verificar os níveis de marcadores de danos oxidativos a lipídios (TBARS) e proteínas (proteínas carboniladas), em células HEK-293 tratadas com proantocianidinas, em presença e ausência de H₂O₂.
- Verificar a atividade dos complexos mitocondriais (I, II, III, IV) da cadeia de transporte de elétrons em células HEK-293 tratadas com proantocianidinas, em presença e ausência de H₂O₂.
- Verificar a expressão da subunidade 7 do complexo I mitocondrial (NDUFS7) em células HEK-293 tratadas com proantocianidinas, em presença e ausência de H₂O₂.
- Quantificar a produção de ATP da linhagem HEK-293 tratada com proantocianidinas, em presença e ausência de H₂O₂.
- Avaliar a expressão de marcadores de apoptose (PARP, p53 e Bax) nas células tratadas com proantocianidinas, em presença e ausência de H₂O₂.
- Avaliar a expressão de Sirtuínas 1 e Sirtuína 3 em células tratadas com proantocianidinas, em presença e ausência de H₂O₂.

4. RESULTADOS

Os resultados dessa dissertação estão apresentados na forma de artigo científico intitulado “Grape seed proanthocyanidins prevent H₂O₂-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis via SIRT 1 activation in embryonic kidney cells”, que será submetido à revista Molecular Nutrition and Food Research.

**Grape seed proanthocyanidins prevent H₂O₂-induced mitochondrial dysfunction
and apoptosis via SIRT 1 activation in embryonic kidney cells**

Marina Rigotti, Aline Fagundes Cerbaro, Iohana dos Reis da Silva, Catia Santos

Branco, Mirian Salvador

Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes, Instituto de Biotecnologia,
Universidade de Caxias do Sul, RS 95070560, Brazil

*Corresponding author:

Professor: Mirian Salvador, Dr.

Tel & Fax: +55-54-32182149

E-mail address: msalvado@ucs.br

Abbreviations:

ATCC, American Type Culture Collection; **BSA**, bovine serum albumin; **DMEM**, Dulbecco's modified Eagle medium; **DMSO**, dimethyl sulfoxide; **DNPH**, dinitrophenylhydrazine; **ETC**, electron transport chain; **FBS**, fetal bovine serum; **GSPE**, grape seed proanthocyanidins extract; **NDUFS7**, NADH: ubiquinone oxidoreductase core subunit S7; **PARP**, Poly-(ADP-ribose) polymerase; **ROS**, reactive oxygen species; **rpm**, rotations per minute; **SIRT 1**, sirtuin 1; **SIRT 3**, sirtuin 3; **SOD**, superoxide dismutase; **TMP**, hydrolyzed 1,1,3,3-tetramethoxypropane.

Keywords: Apoptosis, Grape, Mitochondria, Proanthocyanidins, Sirtuins

Abstract

Scope: Natural products have attracted attention due to their ability to reduce the incidence of diseases associated with oxidative stress and mitochondrial dysfunction. Grape seed proanthocyanidins are a group of flavonoids widely ingested in the diet and present diverse biological effects. The aim of this study was to examine the capacity of grape seed proanthocyanidins to modulate oxidative stress, mitochondrial dysfunction, apoptosis, and sirtuins expression in human cells.

Methods and results: The molecular effects of grape seed proanthocyanidins were evaluated in HEK-293 cells challenged with H₂O₂. Results showed that proanthocyanidins were able to prevent H₂O₂-induced oxidative damage to lipids and proteins and the depletion of the enzymatic antioxidant defense superoxide dismutase. Moreover, proanthocyanidins were able to prevent mitochondrial electron transport chain (I, II, III, IV) dysfunction, regulate the expression of NDUF53 subunit, and prevent ATP depletion and apoptosis induced by H₂O₂. These effects can be explained by the ability of grape seed proanthocyanidins to increase the expression of sirtuin 1 and decrease the expression sirtuin 3, which are important proteins regulating mitochondrial function and oxidative stress.

Conclusion: Grape seed proanthocyanidins are able to target mitochondrial proteins averting mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis in human cells.

1 Introduction

Proanthocyanidins are formed from the polymerization of flavan-3-ol units and are naturally found in the form of oligomers or polymers (Ou & Gu 2014). Proanthocyanidins are a group of flavonoids widely ingested in the diet (Wang *et al.* 2011) and are mainly found in chocolate, vegetables, and fruits such as persimmon, apple and grape (Espley *et al.* 2014; Cádiz-Gurrea *et al.* 2017). The grape is particularly rich in proanthocyanidins, which concentrates abundant amount of proanthocyanidins is in its seeds (Kennedy 2008).

Several studies have demonstrated the biological activities promoted by grape seed proanthocyanidins, such as their potential to reduce oxidative damage (Long *et al.* 2016), reduce inflammation (Günay *et al.* 2016), and induce apoptosis in cancer cells (Chen *et al.* 2014). Moreover, grape seed proanthocyanidins displayed the ability to modulate the dysfunction of mitochondrial membrane potential and the complex IV activity of mitochondrial electron transport chain (ETC) induced by H₂O₂ in mouse pre-osteoblasts cells (Zhang *et al.* 2014). Grape seed proanthocyanidins were also able to modulate ETC I complex activity in human fetal lung fibroblast (HFL1) cells (Yang *et al.* 2017).

The maintenance of adequate mitochondrial function is essential to avoid oxidative stress and apoptosis as well as maintain cell viability. Sirtuins are a family of histone deacetylases responsible for regulation of the mitochondrial function, oxidative stress, and apoptosis (Parihar *et al.* 2014). Sirtuin 1 (SIRT 1) and sirtuin 3 (SIRT 3) are the most studied. SIRT 1 is mainly found in the nucleus and cytosol, and SIRT 3, mainly in the mitochondria (Favero *et al.* 2015). SIRT 1 is related to the prevention of cell senescence via decreased p53 activity (Liu *et al.* 2018). SIRT 3 is related to the regulation of the mitochondrial ETC through the acetylation of mitochondrial complexes and their

subunits (Verdin *et al.* 2010; Finley *et al.* 2011). SIRT1 and SIRT3 are also involved in the maintenance of genomic stability (Bosch-Presegué & Vaquero 2015) and modulation of cellular response to oxidative stress (Merksamer *et al.* 2013).

Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production is primarily related to mitochondrial ETC dysfunction (Yamamori *et al.* 2012). In high levels, ROS may cause oxidative stress, which has been linked with damage of biological molecules (proteins, lipids and DNA), and with a high levels of age-related diseases such as cancer (Pokorný *et al.* 2015), neurodegeneration (Parkinson and Alzheimer) (Lane *et al.* 2015; Larsen *et al.* 2018), atherosclerosis (Emma *et al.* 2014), and diabetes (Blake & Trounce, 2013; Kim *et al.* 2008). Thus, there is growing evidence that the mitochondria are a significant therapeutic target to treat diseases related to mitochondrial dysfunction, as well as, the aging process itself. Understanding the cell signaling that operates the mitochondrial activity is a crucial point. In this sense, natural products appear to be a valuable strategy. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the capacity of grape seed proanthocyanidins to modulate oxidative stress, mitochondrial dysfunction, apoptosis, and SIRT 1 and SIRT 3 expression in HEK-293 cells challenged with H₂O₂.

2 Experimental Section

2.1 Chemicals and reagents

Complete DMEM medium, Fetal Bovine Serum (FBS), trypsin–EDTA, and penicillin–streptomycin were purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY, USA). Thiobarbituric and trichloroacetic acids, hydrolyzed 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, and hydrogen peroxide (H₂O₂) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Apoptosis antibody sampler kits Poly-(ADP-ribose) polymerase (CS9915), p53 (CS9917) and Bax

(CS9942), and the control β -tubulin (CS4670) were acquired from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). NDUFS7 (sc-98644), SIRT 1 (sc-74504), and SIRT 3 (sc-365175) antibodies sampler kits were acquired from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). The Cell Titer Glo Luminescent Cell Viability Assay Kit was from Promega (Madison, WI, USA). Low-melting point agarose and normal agarose were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). The Acrylamide kit was acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Other reagents and solvents were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). All chemicals were of analytical grade.

2.2 Grape seed proanthocyanidin extract (GSPE)

The grape seed proanthocyanidins, constituting of 98.39% of proanthocyanidins was provided by Active Pharmaceutica (SC, Brazil). According the high performance liquid chromatography, we identify in the extract $2,41 \pm 0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ of procyanidin B2, $4,00 \pm 0,04 \mu\text{g mL}^{-1}$ of catechin, $5,82 \pm 0,06 \mu\text{g mL}^{-1}$ of epicatechin, $1,73 \pm 0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ of epigallocatechin and $2,66 \pm 0,08 \mu\text{g mL}^{-1}$ of gallic acid. To obtain the extract, grape seed proanthocyanidins were dissolved in Mili-Q® water and then filtered with a sterilized syringe filter (pore size, $0.22 \mu\text{m}$; PES) immediately before use.

2.3 Cell culture and treatments

The human kidney embryonic stem cells (HEK-293) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC®). The cell line was cultivated in complete DMEM medium, which was supplemented with heat inactivated 10% FBS, penicillin (100 UI mL^{-1}), and streptomycin ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Cells were maintained at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ under an atmosphere of 5% CO_2 with 90% relative humidity and detached with 0.15% trypsin

solution. Studies were conducted when the cells reached 80–90% confluency. In this study, HEK-293 cells were treated with GSPE for 30 min, and after the GSPE was removed, the cells were challenged with H₂O₂ (100 μM) for 24 h. For the assays of oxidative stress, superoxide dismutase activity, mitochondrial ETC activities, and immunoblotting analysis, HEK-293 cells were seeded at a density of 5×10^6 in 75 cm² flasks.

2.4 Cell lysate preparation

The cell lysate preparation was conducted according to the methodology of Spinazzi *et al.* (2012). Cells were detached using trypsin 0.15% and adding in the medium previously removed. The suspension was centrifuged at 2620 rpm for 5 min at 4 °C. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 3 ml of PBS. Once again, the cells were centrifuged at 2620 rpm and the supernatant was discarded. The cells pellets were suspended in 0.4 mL of 20 mM hypotonic potassium phosphate buffer (pH 7.5), and homogenized with a Hamilton syringe (50 μL). To obtain the cell lysate, cells were snap-frozen in liquid nitrogen and thawed at 37 °C three times. Protein concentration was determined via the Bradford (1976) method, using BSA as the standard.

2.5 Cell viability assay

Cell viability was evaluated through 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay (Denizot 1986). Cells were seeded in 96 well plates at a density of 1×10^5 cells/well and were grown for 48 h in supplemented DMEM medium. Cells were exposed to 1 mg mL⁻¹ per well of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide solution and cultured for 3 h. The supernatant was removed, resulting in formazan violet product. These precipitates were dissolved in 100 μL of

DMSO per well and agitated for 15 min. Absorbance was measured using a microplate reader (Victor-X3, Perkin Elmer, Finland) at 517 nm. Viability of the cells in each well was expressed as a percentage of the control.

2.6 Oxidative stress assessment

Oxidative stress was evaluated through the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (Wills 1966) and protein carbonylation (Levine *et al.* 1990) in cell lysates. Lipid peroxidation was measured by the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) during an acid-heating reaction, in which samples containing 400 μL of cell lysates were combined with 600 μL of 15% trichloroacetic acid and 0.67% thiobarbituric acid. The mixture was heated at 100 °C for 20 min. After being cooled to room temperature, samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The supernatant fraction was isolated, and its absorbance was measured at 532 nm. TMP was used as the standard, and the results were expressed as nmol of TMP per mg of protein. Oxidative damage to proteins were evaluated according the reaction of protein carbonyl groups, with 2,4-dinitrophenylhydrazine. For the assays, 200 μL of 2,4-dinitrophenylhydrazine (10 mM) or 200 μL of HCl (2 M) were added to 50 μL of cell lysate. The reaction mixture was incubated in the dark for 30 min, and vortexed every 10 min. Then, 250 μL of 20% trichloroacetic acid was added to each reaction mixture, and centrifuged at 4000 rpm for 8 min. The supernatants from each sample were discarded and the pellets were washed 3 times with ethanol–ethyl acetate (1:1) to remove free reagent. Samples were centrifuged, and the pellets were resuspended in 1000 μL of urea solution (8 M) at 37 °C for 15 min. Absorbance was read at 365 nm, and results were expressed as nmol DNPH/mg protein.

2.7 Superoxide dismutase activity

Superoxide dismutase (SOD) activity of the cell lysate was evaluated through the inhibition of self-catalytic adrenochrome formation rate at 480 nm, in a reaction medium containing 1 mmol/L adrenaline (pH 2.0) and 50 mmol/L glycine (pH 10.2) at 30° C for 3 min (Bannister, & Calabrese, 1987). Absorbance was measured in spectrophotometer Shimadzu model UV-1700. Results were expressed as USOD (units of enzyme activity)/mg protein. One unit of SOD is the amount of enzyme that inhibits the adrenochrome formation by 50%.

2.8 Mitochondrial chain electron transport activities

Mitochondrial chain complexes I, II, III, and IV activities were assayed in the cell lysate according to the methodology proposed by Spinazzi *et al.* (2012). The complex I activity was measured at 340 nm for 2 min and the positive control was obtained with cells exposed to I-specific inhibitor rotenone. The complex II activity was measured at 600 nm for 3 min, and the positive control was obtained with cells exposed to II-specific inhibitor 2-thenoyltrifluoroacetone. The complex III activity was measured at 550 nm for 2 min, and the positive control was obtained with cells exposed to III-specific inhibitor antimycin A. The complex IV activity was measured at 550 nm for 3 min, and the positive control was obtained with cells exposed to IV-specific inhibitor potassium cyanide. Enzymatic activities were evaluated at 37 °C in spectrophotometer (Shimadzu model UV-1700). Results were presented as percentage of control.

2.9 ATP quantification

ATP levels were measured with the Cell-Titer-Glo® Assay Kit, according to the manufacturer's instructions. Luminescence was recorded using a multi-mode microplate

reader (Victor-X3, Perkin Elmer, Finland). Results were expressed as percentage of control.

2.10 Immunoblotting analysis

The cell lysate was mixed with Laemmli sample buffer and denatured by boiling (100 °C) for 5 min. Briefly, 3 µg/µL (10 µL) were loaded and the proteins were separated on 10–12.5% SDS–PAGE gels. Next, the proteins were electro-transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Membranes were blocked with 5% nonfat milk and were incubated with primary antibodies against NDUFS7 (1:1000), SIRT 1 (1:1000), SIRT 3 (1:1000), Poly- (ADP-ribose) polymerase (1:1000), p53 (1:1000) and Bax (1:1000) for 2 h, followed by a secondary goat anti-Rabbit IgG or anti-Mouse IgG antibody conjugated to horseradish peroxidase (1:2000) for 1 h. For loading control, β -tubulin rabbit mAb (HRP conjugate) (1:2000) was used. Protein band images were captured using molecular Imager ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Life Sciences), and pairwise comparisons of the protein bands were performed using Image-J 1.45 software. Results were normalized by β -tubulin protein expression (Branco *et al.* 2015).

2.11 Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS, version 21.0) for Windows (Illinois, USA). Kolmogorov-Smirnov test was used to assess the parametric or non-parametric distribution of data. Statistical significance was evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's *post hoc* test for parametric data and Kruskal-Wallis for non-parametric data. Results from at least three independent experiments are deemed significant if p-value was ≤ 0.05 .

3 Results

3.1 Protective effects of GSPE in H₂O₂-induced cytotoxicity

The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay was conducted on HEK-293 cells to assess the highest non-cytotoxicity concentration of GSPE. GSPE treatment did not display cytotoxic effect at concentrations of 25 and 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, but at higher concentration (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), a decrease in cell viability was observed (Figure 1A). The highest non-cytotoxic concentration of GSPE (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was chosen to perform further experiments. Then, the protective effect of GSPE was investigated against the oxidative damage induced by H₂O₂. Figure 1B shows that when cells were exposed only to H₂O₂, cell viability decreased about 35% compared to the control. However, when cells were treated with GSPE, the viability was similar to the control, thus demonstrating the cytoprotective effect of GSPE against H₂O₂-induced cytotoxicity.

3.2 GSPE maintain redox homeostasis

To evaluate effects of GSPE in H₂O₂-induced oxidative damage, markers of oxidative stress to lipids (TBARS) and proteins (carbonyl proteins), and enzymatic activity of SOD were evaluated. As shown in Table 1, GSPE was able to decrease oxidative damage induced by H₂O₂ to proteins and lipids, restoring the levels observed in the control cells. The enzymatic activity of SOD was decreased by H₂O₂; however, when cells were exposed to GSPE treatment, SOD activity was restored to basal levels. In addition, when cells were exposed only to GSPE treatment, no oxidative damage to lipids or proteins, or alteration of the enzymatic activity of SOD were observed.

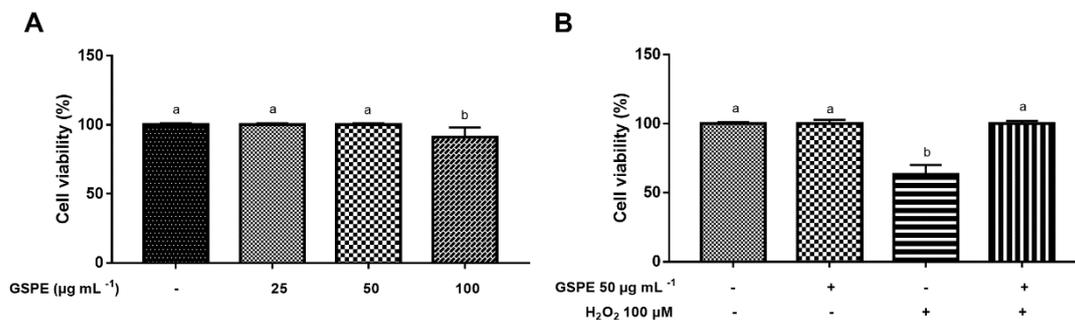


Figure 1. Effect of GSPE and H₂O₂ on the viability of HEK-293 cells. (A) HEK-293 cells treated with different concentrations of GSPE (25, 50, 100 µg mL⁻¹) for 30 minutes; (B) HEK-293 cells treated with GSPE (50 µg mL⁻¹) for 30 min and/or H₂O₂ (100 µM) for 24 h. Results are expressed as mean ± SD from at least three independent experiments. Different letters indicate significantly different values among the treatments according to the analysis of variance (ANOVA) followed by Kruskal-Wallis (A) or Tukey's *post-hoc* (B) tests. Statistical significance was determined at $p \leq 0.05$.

Table 1. Redox stress markers in HEK-293 cells pretreated with GSPE (50 µg mL⁻¹) for 30 minutes and/or H₂O₂ (100 µM) for 24 hours

	TBARS (nmol TMP/mg protein)	Carbonyl protein (nmol DNPH/ mg protein)	Sod activity (USOD/mg protein)
Control	2.96 ± 0.46 ^a	1.96 ± 0.47 ^a	0.85 ± 0.04 ^a
GSPE 50 µg mL ⁻¹	3.24 ± 0.13 ^a	1.90 ± 0.09 ^a	0.84 ± 0.16 ^a
H ₂ O ₂ 100 µM	6.68 ± 0.52 ^b	3.38 ± 0.32 ^b	0.41 ± 0.05 ^b
GSPE 50 µg mL ⁻¹ + H ₂ O ₂ 100 µM	2.26 ± 0.21 ^a	2.11 ± 0.14 ^a	0.67 ± 0.08 ^a

TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; TMP, hydrolyzed 1,1,3,3-tetramethoxypropane; DNPH, 2,4-dinitrophenylhydrazine; USOD, units of enzyme activity; GSPE, grape seed proanthocyanidin extract; SOD, superoxide dismutase. Results are expressed as mean ± SD. Different letters indicate statistically different values among the treatments according to the analysis of variance (ANOVA) and Tukey's *post hoc* test. Statistical significance was determined at $p \leq 0.05$.

3.3 GSPE prevent mitochondrial dysfunction

The mitochondrial function of HEK-293 cells was evaluated by the activities of mitochondrial complexes I, II, III, and IV, expression of NDUFS7 subunit, and production of ATP. When cells were exposed to the H₂O₂, activity of complexes I, III, and IV was significantly reduced (Fig. 3A, D, and E). Expression of the NDUFS7 subunit decreased when the cells were exposed to H₂O₂, indicating a possible target of H₂O₂ in complex I (Fig. 2B). ATP production was also reduced when cells were exposed to H₂O₂ (Fig. 3F). On the other hand, H₂O₂ caused an exacerbated increase in the activity of complex II (Fig. 2C). When cells were treated with GSPE prior to H₂O₂ exposure, the activity increased for complexes I, III and IV, as well as, NDUFS7 expression and ATP production. Treatment with GSPE also promoted the modulation of complex II, reducing its activity compared those observed in the H₂O₂ treatment. Cells treated only with GSPE, showed no changes in mitochondrial complex activities, NDUFS7 subunit expression, or ATP levels, similarly to the control.

3.4 GSPE exhibit antiapoptotic effects

The involvement of GSPE in proapoptotic signaling molecules were evaluated through the PARP, p53, and Bax expression levels. It was observed that H₂O₂ caused a significant increase in the expression levels of PARP (Fig. 3A), p53 (Fig. 3B), and Bax (Fig. 3C). However, the GSPE treatment prevented the upregulation of these proteins, indicating that GSPE has ability to modulate PARP, p53, and Bax proteins expressions in a manner similar to the cell control. When cells were treated only with GSPE, the expression of the apoptotic proteins PARP, p53, and Bax remained the same as observed to the control group.

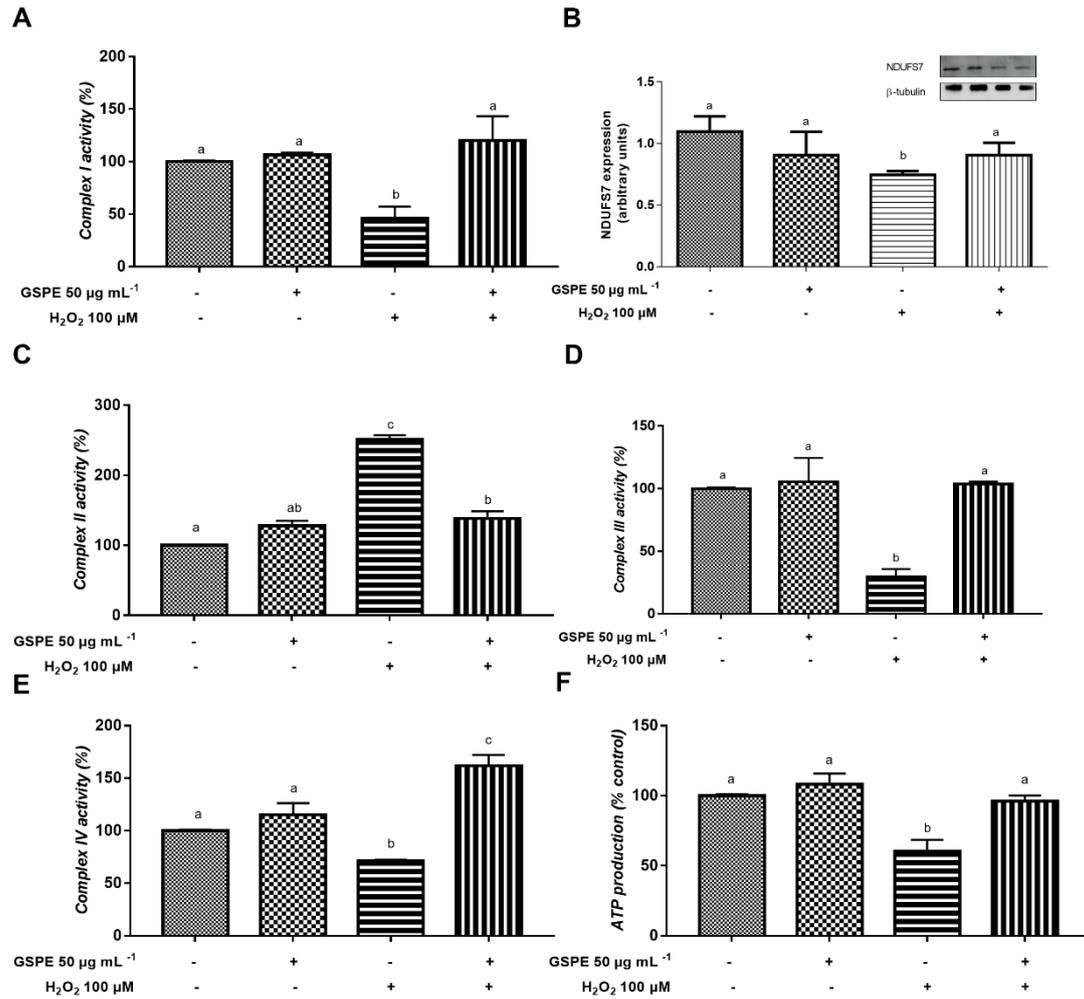


Figure 2. Mitochondrial complex activity of complex I (A), protein expression of subunit NDUF57 (B), mitochondrial complex activity of complex II (C), complex III (D), complex IV (E) and ATP levels (F) of HEK-293 cells treated with GSPE ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 30 minutes and/or H_2O_2 ($100 \mu\text{M}$) for 24 hours. The results are expressed as mean \pm SD from at least three independent experiments. Western blot data are quantified using β -tubulin as an internal control. Expression levels of proteins are expressed as the relative intensity of the bands. Different letters indicated significantly different values among the treatments according to the analysis of variance (ANOVA) and Tukey's *post hoc* test. Statistical significance was determined at $p \leq 0.05$.

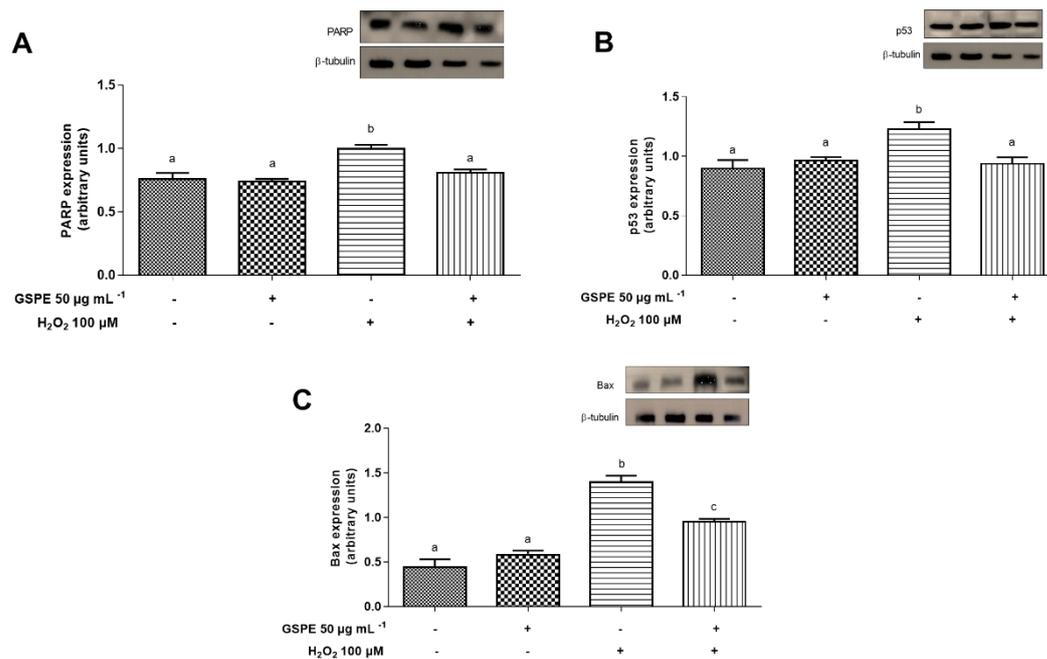


Figure 3. Effect of GSPE and/or H₂O₂ on protein expression of PARP (A); p53 (B), and Bax (C) in HEK-293 cells. Cells were treated with GSPE (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for 30 minutes and/or H₂O₂ (100 μM) for 24 hours. Western blot data were quantified using β -tubulin as an internal control. Expression levels of proteins are expressed as the relative intensity of the bands. Different letters indicated significantly different values among the treatments according to the analysis of variance (ANOVA) and Tukey's *post hoc* test. Statistical significance was determined at $p \leq 0.05$.

3.5 GSPE modulate sirtuin signaling

To establish whether the sirtuins are a target for GSPE, the expression levels of SIRT 1 and SIRT 3 in HEK-293 cells were examined. The exposure to H₂O₂ resulted in reduced levels of SIRT 1 expression (Fig. 4A) along with an increased SIRT 3 expression (Fig. 4B). When the cells were exposed to the treatment with GSPE *plus* H₂O₂, the expressions of the SIRT 1 was increased and the SIRT 3 was decreased, indicating that GSPE is able to modulate nuclear/mitochondrial sirtuin signaling. Moreover, cells treated only to GSPE did not alter the expression of SIRT 1 and 3, remained equal to the control group.

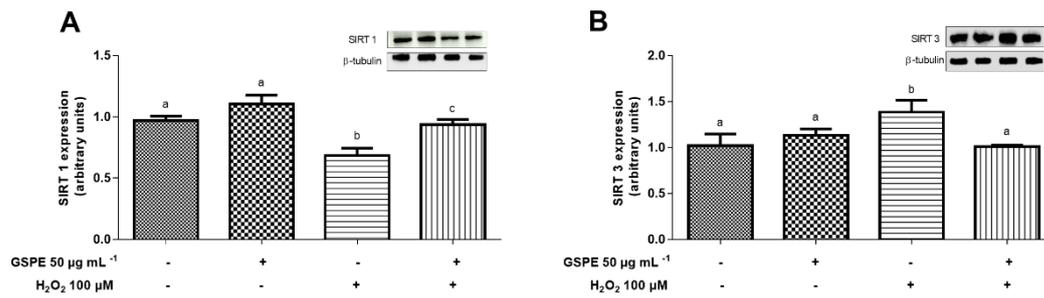


Figure 4. Effect of GSPE and/or H₂O₂ on protein expression of SIRT 1 (A) and SIRT 3 (B) in HEK-293 cells. Cells were pretreated with GSPE (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for 30 minutes and/or H₂O₂ (100 μM) for 24 hours. Western blot data were quantified using β -tubulin as an internal control. Expression levels of proteins are expressed as the relative intensity of the bands. Different letters indicated significantly different values among the treatments according to the analysis of variance (ANOVA) and Tukey's *post hoc* test. Statistical significance was determined at $p \leq 0.05$.

4 Discussion

Over the years, a wide range of studies has attempted to demonstrate the role of polyphenols to prevent or reduce metabolic dysfunctions involved with several diseases (Cory *et al.* 2018). Among polyphenols, the proanthocyanidins have been gaining prominence due to their biological activities, such as the modulation of inflammation (Limtrakul *et al.* 2016), oxidative stress (Ma *et al.*, 2018) and apoptosis (Cai *et al.* 2015). However, the specific molecular mechanisms that explain the biological effects of proanthocyanidins have not yet been fully elucidated. Therefore, in this study, we investigated the effects of GSPE in cytosolic, mitochondrial and nuclear markers of HEK-293 cells under redox unbalance.

Our results showed that GSPE inhibit H₂O₂-induced cytotoxicity and prevent oxidative damage to proteins and lipids promoted by H₂O₂. The GSPE were also

responsible for attenuated H₂O₂-impaired SOD activity. Similar results were described in the meta-analysis by Li *et al.* (2015), which found that proanthocyanidins were able to reduce levels of oxidative damage to lipids and increase the activity of the SOD antioxidant enzyme in rats. The ability of GSPE to maintain SOD antioxidant defense at adequate levels prevents the damage caused by ROS to biomolecules, contributing to the maintenance of cell viability observed in the present study.

Studies have already described that the mitochondria are the main endogenous source of ROS, particularly the complexes I and III of the ETC (Georgieva *et al.* 2017). Mitochondrial dysfunction generates excessive ROS production and decreases the production of ATP (Kehrer & Klotz 2015; Georgieva *et al.* 2017; Bhatti *et al.* 2017). In this context, our study evaluated mitochondrial function and ATP production in cells treated with GSPE in the presence or absence of H₂O₂. H₂O₂ promoted decreased activity of complexes I, III, and IV, decreased NDUFS7 subunit expression, decreased ATP production, and increased activity of complex II of the ETC. High levels of H₂O₂ may change the mitochondrial homeostasis and the dynamics of the electron transport chain, leading to mitochondrial dysfunction and decreased ATP production (Baeri *et al.*, 2018). Our study showed that GSPE is able to reestablish the homeostasis of mitochondrial complexes I, II, III and IV, the expression of the subunit 7 of the mitochondrial complex I (NDUFS7), as well as the production of ATP. Previous studies have demonstrated the ability of grape seed proanthocyanidins to modulate mitochondrial dysfunction, by increasing the activities of the complexes I in human fetal lung fibroblasts cells (Yang *et al.*, 2017) and complex IV in MC3T3-E1 mouse osteoblast cells (Zhang *et al.*, 2014). Our study is the first to demonstrate a specific mitochondrial target for GSPE in the electron transport chain, the NDUFS7. This subunit contains the last iron-sulfur group of complex

I and is responsible for reduction of ubiquinone to ubiquinol, through transferring the electrons of complex I to Coenzyme Q (Janssen *et al.* 2006).

High levels of ROS as well as mitochondrial dysfunction may lead the cells to apoptosis (Branco *et al.*, 2015; Branco *et al.*, 2015 b; Scola *et al.*, 2014; Georgieva *et al.* 2017). Our study demonstrated that the expression of the apoptotic proteins PARP, p53, and Bax were upregulated when the cells were exposed to H₂O₂. This is in accordance with study of Zhang *et al.* (2014) who also found an increase in the expression of the apoptotic proteins p53, BAX, PARP and caspase 3 in cells submitted to H₂O₂ treatment. We also demonstrated that when cells were treated with GSPE *plus* H₂O₂ there was no increase in apoptotic proteins expression. This effect may be due to the normalization of the activity of the electron transport complexes and consequent maintenance of the redox homeostasis promoted by GSPE. Similar results have been described for MC3T3-E1 osteoblastic cells (Zhang *et al.* 2014) and in HFL1 human fetal lung fibroblast cells (Yang *et al.* 2017) in which grape seed proanthocyanidins were able to prevent apoptosis induced by H₂O₂.

Sirtuins have been studied because of their ability to identify alterations in energy metabolism and homeostasis, as well as coordinate cellular responses (Lin *et al.* 2018). In HEK-293 cells, H₂O₂ caused significant reduction in the expression of SIRT 1 and increased expression of SIRT 3. H₂O₂ has already been shown to inhibit SIRT 1 (Xu *et al.* 2011; He *et al.* 2015) and increase SIRT 3 expression (Dai *et al.* 2014). Our study show, for the first time, that SIRT1 and SIRT 3 are targets of GSPE against H₂O₂-induced sirtuin dysregulation. This finding is important because SIRT 1 is involved in regulating the response of other sirtuins, such as SIRT3. Carnevale *et al.* (2017) found that when SIRT 1 is silenced, SIRT 3 increases its expression as a compensatory defense mechanism for the cell. This fact may explain the opposite expression of SIRT1 and SIRT3 observed

in our study. Furthermore, SIRT 3, located in the mitochondria, is related to the upregulation of the enzyme SOD2 (Liu *et al.* 2015), which maintains redox homeostasis and avoids oxidative damage, as observed in our study.

In conclusion, the data obtained in our work shows that GSPE is able to prevent H₂O₂ –induce changes the expression of SIRT1. The downregulation of SIRT1 could be explained to an increase in SIRT3 expression, as a compensatory mechanism. SIRT3 alteration is associated with mitochondrial dysfunction, leading to oxidative stress and apoptosis. The apoptosis signaling pathway occurs via p53 activation, along with Bax and PARP. The upregulation of SIRT1 by GSPE can prevent mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and consequent apoptosis of HEK-293 cells, as shown in Figure 6. Therefore, it is possible to suggest that GSPE has a selective ability to modulate the expression of SIRT 1, which is a powerful cell mechanism to modulate other related pathways. Regulation of SIRT 1 may represent an important target for the treatment of diseases associated with mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis. Our results provide a scientific basis for development and utilization of GSPE based resources.

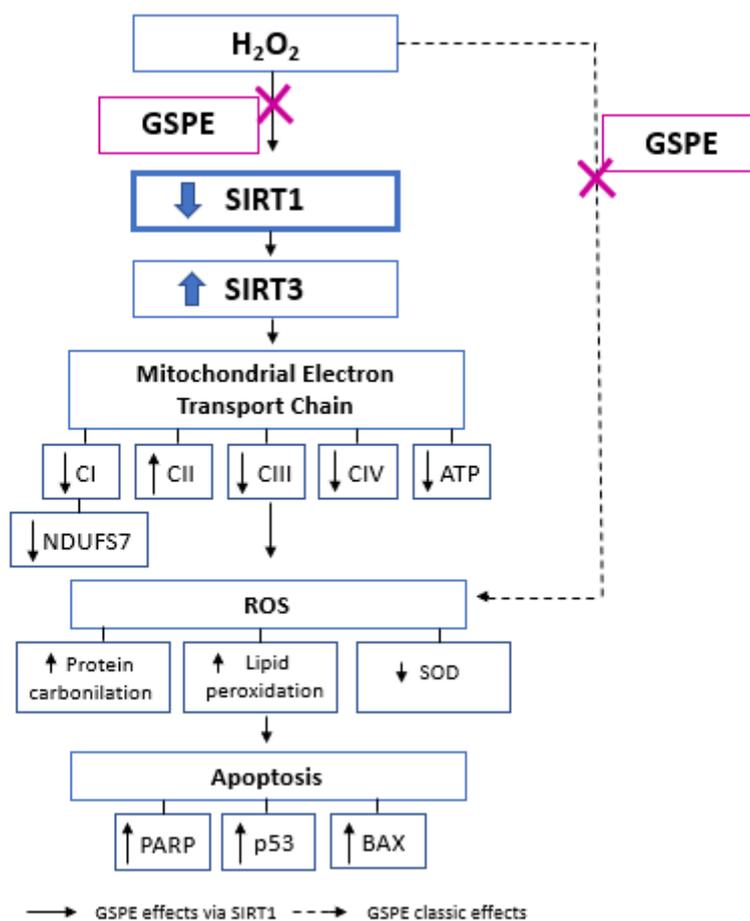


Figure 6. Proposed mechanism of action for the modulatory effects of GSPE. GSPE, grape seed proanthocyanidin extract; SIRT1, sirtuin 1; SIRT3, sirtuin 3; CI, complex I; CII, complex II; CIII, complex III; CIV, complex IV; ATP, adenosine triphosphate; PARP, poly- (ADP-ribose) polymerase.

Acknowledgements

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and from Coordenação de Apoio de Pessoal de Nível Superior (CAPES). M.R. is the recipient of a CNPq Research Fellowship (155850/2016-4) and M.S. is recipient of a CNPq Research Fellowship. Special thanks to L.A.B for technical support.

Author contributions:

M.S. established the study, interpreted the data, and contributed to reviewed/edited the manuscript. M.R., A.F.C., C.S.B. and I.R.S performed the research. M.R., C.S.B. M.S. analyzed data. M.R. and M.S wrote the manuscript. All authors revised the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Conflict of Interest statement: The authors declare that they have no conflicts of interest.

5 References

M. Baeri, S. Mohammadi-Nejad, M. Rahimifard, M. Navaei-Nigjeh, S. Moeini-Nodeh,

J. S. Bhatti, G. K. Bhatti, P. H. Reddy. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis. Dis.* **2017**, *1863*, 1066.

Cdos S. Branco, É. D. de Lima, T. S. Rodrigues, T. B. Scheffel, G. Scola, C. C. Laurino, S. Moura, M. Salvador. *Chem. Biol. Interact.* **2015**, *231*, 108.

Cdos S. Branco, T. S. Rodrigues, É. D. Lima, M. Salvador. *Cancer Cell Microenviron.* **2015b**, *1*.

R. Khorasani, M. Abdollahi. *Mol. Cell. Biochem.* **2018**, *441*, 21.

J. V. Bannister, L. Calabrese, *Methods Biochem. Anal.* **1987**, *32*, 279.

- R. Blake, I. A. Trounce, *Biochim. Biophys. Acta.* **2013**, 1840,1804.
- L. Bosch-Presegú, A. Vaquero, *FEBS J.* **2015**, 282, 1745.
- M. M. Bradford, *Anal Biochem.* **1976**, 7, 248.
- C. S. Branco, E. D. Lima, T. S. Rodrigues, T. B. Scheffel, G. Scola, C. C. Laurino, S. Moura, M. Salvador, *Chem. Biol. Interact.* **2015**, 231, 108.
- M. L. Cádiz-Gurrea, I. Borrás-Linares, J. Lozano-Sánchez, J. Joven, S. Fernández-Arroyo, A. Segura-Carretero, *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18, 1.
- X. Cai, L. Bao, J. Ren, Y. Li, Z. Zhang, *Food Funct.*, **2015**. 7, 805.
- I. Carnevale, L. Pellegrini, P. D'Aquila, S. Saladini, E. Lococo, L. Polletta, E. Vernucci, E. Foglio, S. Coppola, S. Sansone, G. Passarino, D. Bellizzi, M. A. Russo, M. Fini, M. Tafani, *J. Cell. Physiol.* **2017**, 232, 1835.
- Q. Chen, X.F. Liu, P. S, Zheng, *PLOS One.* **2014**. 9, 1.
- H. Cory, S. Passarelli, J. Szeto, M. Tamez, J. Mattei. *Front. Nutr.* **2018**, 5, 1.
- S. H. Dai, T. Chen, Y. H. Wang, J. Zhu, P. Luo, W. Rao, Y. F. Yang, Z. Fei, X. F. Jiang, *Int. J. Mol. Med.* **2014**, 34, 1159.

F. Denizot, R. Lang, *J. Immunol. Methods*. 1986, 89, 271.

P.K. Emma, E. P. Yu, M. R. Bennett, *Trends. Endocrinol. Metab.* **2014**, 25, 481.

R. V. Espley, C. A. Butts, W. A. Laing, S. Martell, H. Smith, T. K. McGhie, J. Zhang, G. Paturi, D. Hedderley, A. Bovy, H. J. Schouten, J. Putterill, A. C. Allan, R. P. Hellens, *J. Nutr.* **2014**, 144,146.

G. Favero, L. Franceschetti, L. F. Rodella, R. Rezzani, *Age (Dordr).* **2015**, 37, 1.

L. W. Finley, W. Haas, V. Desquret-Dumas, D. C. Wallace, V. Procaccio, S. P. Gygi, M. C. Haigis, *PLoS One.* **2011**, 6, 1.

E. Georgieva, D. Ivanova, Z. Zhelev, R. Bakalova, M. Gulubova, I. Aoki, *Anticancer Res.* **2017**, 37, 5373.

zxE. Günay, S. Celik, S. Sarinc-Ulasli, A. Özyürek, Ö. Hazman, S. Günay, M. Özdemir, M. Ünlü, *Inflammation.* **2016**, 39, 744.

N. He, X. Zhu, W. He, S. Zhao, W. Zhao, C. Zhu, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2015**, 79, 1779.

R. J. Janssen, L.G. Nijtmans, L.P. van den Heuvel, J.A. Smeitink, *J. Inherit. Metab. Dis.* **2006**, 26, 526.

J. P. Kehrer, L. O. Klotz, *Crit. Rev. Toxicol.* **2015**, *45*, 765.

J. A. Kennedy, *Cienc. Invest. Agrar.* **2008**, *35*, 107.

J. Kim, Y. Wei, J. R. Sowers, *Circ. Res.* **2008**, *102*, 401.

R. K. Lane, T. Hilsabeck, S. L. Rea, *Biochim. Biophys. Acta.* **2015**, *1847*, 1387.

S. B. Larsen, Z. Hanss, R. Krüger, *Cell and Tissue Res.* **2018**, *373*, 21.

R. L. Levine, D. Garland, C. N Oliver, A. Amici, I. Climent, A. G. Lenz, B. W. Ahn, S. Shaltiel, E. R. Stadtman, *Methods in Enzymol.* 1990, *186*, 464.

P. Limtrakul, S. Yodkeeree, P. Pitchakarn, W. Punfa, *Nutr. Res. Pract.* **2016**, *10*, 251.

S. Li, M. Xu, Q. Niu, S. Xu, Y. Ding, Y. Yan, S. Guo, F. Li, *PLoS One.* **2015**, *10*, 1.

S. Lin, H. Xing, T. Zang, X. Ruan, L. Wo, M. He, *Ageing. Res. Rev.* **2018**, *44*, 32.

G. Liu, M. Cao, Y. Xu, Y. Li. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 353.

T. Liu, X. Ma, T. Ouyang, H. Chen, J. Lin, J. Liu, Y. Xiao, J. Yu, Y. Huang, *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *117*, 225.

M. Long, S. H. Yang, J. X. Han, P. Li, Y. Zhang, S. Dong, X. Chen, J. Guo, J. Wang, J. B. He1, *Int J. Mol. Sci.* **2016** *17*, 808.

J. Ma, S. S. Gao, H. J. Yang, M. Wang, B. F. Cheng, Z. W. Feng, L. Wang, *Front Neurosci.* **2018**, *12*, 369.

P. I. Merksamer, Y. Liu, W. He, M. D. Hirschey, D. Chen, E. Verdin, *Aging (Albany NY)*. **2013**, *5*, 144.

P. Parihar, O. Solanki, M.L. Mansuri, M.S. Parihar. *Exp. Gerontol.* **2014**, *61*, 130.

K. Ou, L. Gu, *J. Funct. Foods.* **2014**, *7*, 43.

J. Pokorný, J. Pokorný, A. Foletti, J. Kobilková, J. Vrba, Jr. J. Vrba, *Pharmaceuticals.* **2015**, *8*, 675.

G. Scola, C. C. F. C. Laurino, E. Menin, M. Salvador. *Anticancer Agents Med Chem.* **2013**, *13*, 1088.

M. Spinazzi, A. Casarin, V. Pertegato, L. Salviati, C. *Nat. Protoc.* **2012**, *7*, 1235.

E. Verdin, M. D. Hirschey, L. W.S. Finley, M. C. Haigis, *Trends Biochem. Sci.* **2010**, *35*, 669.

Z. S. Xu, X. Y. Wang, D. M. Xiao, L. F. Hu, M. Lu, Z. Y. Wu, J. S. Bian, *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *50*, 1314.

Y. Wang, S. J. Chung, W. O. Song, O. K. Chun, *J. Nutr.* **2011**, *141*, 447.

E. D. Wills, *Biochem. J* **1966**, *99*, 167.

T. Yamamori, H. Yasui, M. Yamazumi, Y. Wada, Y. Nakamura, H. Nakamura, O. Inanami, *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *53*, 260.

X. H. Yang, T. Liu, B. Chen, F. Wang, Q. Yang, X. Chen, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1.

Z. Zhang, L. Zheng, Z. Zhao, J. Shi, X. Wang, J. Huang, *J. Toxicol. Sci.* **2014**, *39*, 803.

5. DISCUSSÃO GERAL

Os polifenóis são compostos encontrados abundantemente em plantas (Croft 2016). O seu consumo pode desempenhar um papel vital na saúde através da redução da incidência de doenças associadas ao estresse oxidativo (Cory *et al.* 2018). Dentre os alimentos que os contém, destaca-se a uva, a qual possui diferentes compostos fenólicos (Júnior *et al.* 2013), distribuídos em sua pele, polpa e semente, sendo a sua semente particularmente rica em proantocianidinas (Kennedy 2008).

As proantocianidinas são uma classe de flavonoides formadas a partir da polimerização de unidades de flavan-3-ol, através do acoplamento de monômeros de catequina e epigallocatequina (Ou & Gu 2014). Elas representam uma classe de polifenóis que tem despertado interesse devido a suas atividades biológicas (Figura 9), tais como: anti-inflamatória (Lintrakul *et al.* 2016; Günay *et al.* 2016), anti-obesidade (Salvadó *et al.* 2015), anti-apoptótica (Zhang *et al.* 2014), capazes de aumentar a expressão de enzimas antioxidantes (Li *et al.* 2015) e também, capazes de prevenir a disfunção mitocondrial (Zhang *et al.* 2014; Yang *et al.* 2017). Não menos importante, possuem uma importante atividade antioxidante (Chen & Yu 2017).

Em nosso trabalho, com o propósito de avaliar a capacidade antioxidante das proantocianidinas da semente de uva, realizamos a determinação da atividade antioxidante do extrato *in vitro* (Anexo I) através da capacidade de varredura dos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]) e 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+}). As proantocianidinas de semente de uva demonstraram uma importante capacidade em reduzir o radical DPPH[•] (IC₅₀= 129,85 ± 6,84 µg/mL) e também o radical ABTS^{•+} (IC₅₀= 254,37 ± 12,90 µg/mL), comprovando a atividade antioxidante já descrita. O IC₅₀ representa a quantidade do extrato capaz de reduzir em 50% a atividade do radical livre. A avaliação da atividade antioxidante através dos ensaios

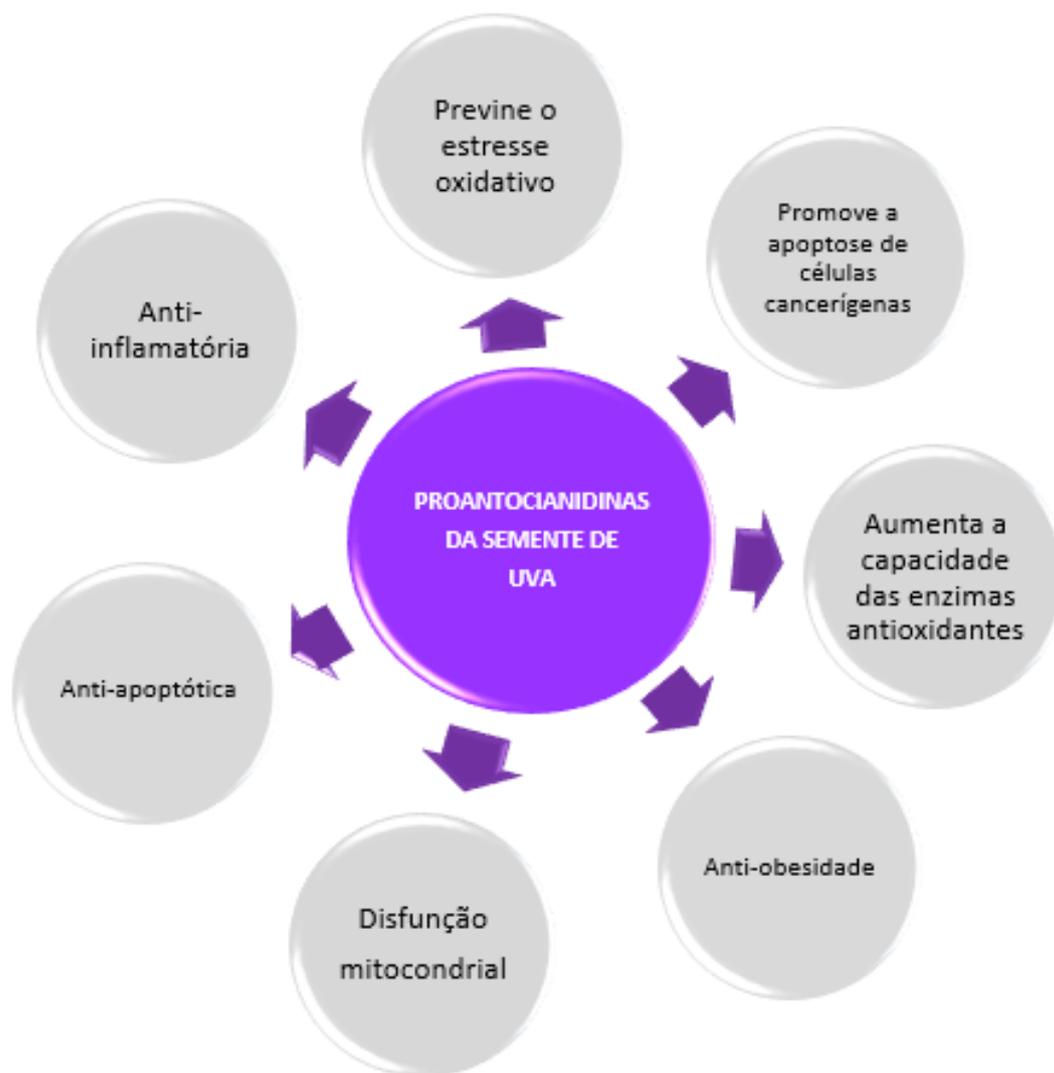


Figura 9. Atividades biológicas das proantocianidinas.

DPPH^{*} (Yamaguchi *et al.* 1998) e ABTS^{**} (Rufino *et al.* 2007) se baseia no princípio de que o antioxidante presente na amostra é capaz de doar hidrogênio ao radical livre, estabilizando assim o radical (Halliwell 2012). Chen & Yu (2017) em seu estudo avaliando a capacidade antioxidante de proantocianidinas de semente de uva (padronizada em 95% de proantocianidina) através do ensaio DPPH^{*}, obtiveram um IC₅₀ de 52 ± 5 µg/mL.

Com a finalidade de avaliar os efeitos biológicos das proantocianidinas frente aos danos ocasionados pelo H₂O₂, a linhagem embrionária de rim humano HEK-293 foi

utilizada como modelo de estudo. Este modelo permite o estudo de mecanismos de ação de moléculas com possível uso terapêutico, auxiliando na análise das propriedades biológicas (Zucco *et al.* 2004).

Para os ensaios, as células HEK-293 foram tratadas com três diferentes concentrações do extrato de proantocianidinas de semente de uva (GSPE) (25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) por 30 minutos, para determinar a concentração mais alta e não citotóxica. A concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ foi escolhida para o seguimento dos testes. Decorrido o tempo de tratamento com as GSPE por 30 minutos, o meio contendo GSPE foi aspirado, as células foram lavadas, e adicionado o H_2O_2 (100 μM) por 24 horas. A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de MTT (3 - [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio). As GSPE impediram a diminuição da viabilidade celular induzida pelo H_2O_2 .

O H_2O_2 é uma espécie reativa que possui a capacidade de atravessar membranas do local de sua geração para atingir um alvo reativo mais distante, causando danos a múltiplos compartimentos celulares (Sies *et al.* 2017). Um dos danos que podem ser causado pelas espécies reativas é a peroxidação lipídica. Os lipídios que estão presentes na membrana plasmática e organelas intracelulares são moléculas especialmente suscetíveis a oxidação. A oxidação lipídica produz aldeídos, como o malondialdeído, que é quantificado pela metodologia de TBARS. O GSPE preveniu o dano oxidativo ocasionado pelo H_2O_2 aos lipídios, o que foi condizente com a meta-análise realizada por Li *et al* (2015). Nesta meta-análise, as proantocianidinas foram capazes de prevenir a peroxidação lipídica, induzida por diferentes indutores de danos oxidativos em ratos. Outra consequência dos altos níveis de ER é a carbonilação de proteínas. Assim como para os lipídios, as proantocianidinas também foram capazes de prevenir a ocorrência da oxidação de proteínas induzida pelo H_2O_2 .

Com o propósito de manter a homeostase redox, as células dispõem de defesas antioxidantes enzimáticas. Elas são responsáveis por promover a detoxificação das ER (Kehrer & Klotz 2015). Neste estudo, observou-se que o as GSPE foram capazes de evitar

a diminuição da atividade da enzima SOD ocasionada pelo H₂O₂, corroborando com outros estudos anteriores (Li *et al.* 2015).

Sabe-se que a mitocôndria é uma organela central no metabolismo energético, e ainda, que é a principal fonte endógena de ER, em particular pelos complexos I e III da cadeia de transporte de elétrons (Chiu & Dawes 2012; Georgieva *et al.* 2017). Uma disfunção na dinâmica mitocondrial conduz a um aumento excessivo da geração de ER e uma diminuição na produção de ATP (Kehrer & Klotz, 2015; Georgieva *et al.* 2017). Sendo assim, ela representa um importante alvo de estudo. Nosso trabalho avaliou a atividades dos complexos mitocondriais (complexos I, II, III e IV da cadeia de transporte de elétrons), a expressão da subunidade NDUF57 e a produção de ATP em células tratadas com GSPE e com H₂O₂. As células HEK-293 quando expostas somente ao H₂O₂ demonstraram diminuição da atividade dos complexos I, III e IV, da expressão gênica da subunidade 7 do complexo I mitocondrial (NDUF57), e, conseqüentemente, diminuição da produção de ATP. Por outro lado, o H₂O₂ provocou um aumento na atividade do complexo II da cadeia de transporte de elétrons. Altos níveis de H₂O₂ podem alterar a homeostase mitocondrial e a dinâmica da cadeia de transporte de elétrons, levando à disfunção mitocondrial e à diminuição da produção de ATP (Baeri *et al.* 2018). Os resultados mostraram que as GSPE foram capazes de restabelecer a homeostase dos complexos mitocondriais I, II, III e IV, a expressão da subunidade NDUF57, bem como a produção de ATP. Estudos prévios demonstraram a capacidade do GSPE de modular a disfunção mitocondrial, aumentando a atividade do complexo I em células de fibroblastos do pulmão fetal humano HFL1 (Yang *et al.* 2017) e do complexo IV em células osteoblásticas MC3T3-E1 (Zhang *et al.* 2014). Neste trabalho demonstrou-se pela primeira vez que o NDUF57 é um dos alvo do GSPE na cadeia de transporte de elétrons. Esta subunidade contém último grupamento ferro-enxofre do complexo I é responsável

pela redução da ubiquinona, transferindo os elétrons do complexo I a Coenzima Q (Janssen *et al.* 2006).

Uma alta concentração de ER, bem como a disfunção mitocondrial, podem levar as células à apoptose (Georgieva *et al.* 2017). No presente estudo foi demonstrado que as proteínas apoptóticas p53, BAX e PARP estavam elevadas quando as células foram expostas ao H₂O₂. Zhang *et al.* (2014) também encontraram um aumento na expressão das proteínas apoptóticas em células submetidas ao tratamento com H₂O₂. Nosso estudo demonstrou que, quando as células foram tratadas com GSPE e com H₂O₂ não houve aumento na expressão das proteínas apoptóticas. Este fato pode ser consequência da regularização da atividade e função dos complexos transportadores de elétrons e consequente manutenção da homeostase redox promovida pelas GSPE. Resultados semelhantes quanto a proteínas apoptóticas foram descritos para células osteoblásticas MC3T3-E1 (Zhang *et al.* 2014) e para células de fibroblastos de pulmão fetal humano HFL1 (Yang *et al.* 2017) onde as GSPE foram capazes de prevenir a ocorrência da apoptose induzida pelo H₂O₂. O papel pró-apoptótico da proteína p53 está relacionado a altos níveis de ER, bem como ao dano nuclear (Wawryk-Gawda *et al.* 2014). O aumento da expressão da proteína p53 também está relacionado a diminuição das proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2, e com o aumento das proteínas pró apoptóticas, como a proteína BAX (Trachootham *et al.* 2008). A proteína BAX pode ser aumentada em virtude da ativação da proteína p53 (Fridman & Lowe 2003), como também devido a ocorrência de danos mitocondriais (Sumbayev & Yasinska 2005). O aumento da expressão da proteína BAX conduz a um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, a liberação de citocromo c (Ma *et al.* 2014) e assim, a ativação de Apaf-1 e a caspase-9 (Sumbayev & Yasinska 2005). As capazes, quando ativadas, conduzem a clivagem de substratos como a proteína PARP, a fragmentação do DNA, a perda da integridade da membrana e, a

apoptose (Morales *et al.* 2014). Estudos relacionaram o aumento de PARP com quebras das fitas simples de DNA, e a um dano no núcleo celular (Hocsak *et al.* 2017).

As sirtuínas foram estudadas devido à sua capacidade de identificar alterações na homeostase e metabolismo energético e coordenar as respostas celulares (Lin *et al.* 2018). Nas células HEK-293, o H₂O₂ causou inibição significativa na expressão de SIRT 1 e aumento na expressão de SIRT 3. De fato, já foi demonstrado que H₂O₂ inibe SIRT 1 (Xu *et al.*, 2011) e aumenta a expressão de SIRT 3 (Dai *et al.* 2014). Nosso trabalho mostrou, pela primeira vez, que o tratamento com GSPE foi capaz de prevenir a diminuição da expressão de SIRT 1 e o aumento de SIRT3 induzido pelo H₂O₂. O controle da SIRT 1 pode ser um importante alvo para o combate de doenças associadas a uma disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e apoptose. A expressão da SIRT1 possui relação com a diminuição da expressão de proteínas pró-apoptóticas como p53 e FoxO, bem como ao aumento de proteínas BCL2, relacionadas a resposta anti-apoptótica (Morigi *et al.* 2018). Carnevale *et al.* (2017) constataram que quando a SIRT 1 é silenciada, a SIRT 3 aumenta sua expressão como mecanismo compensatório de defesa da célula. Este fato pode explicar a expressão oposta de SIRT1 e SIRT3 observada em nosso estudo. Além disso, a SIRT 3, localizada na mitocôndria, está relacionada ao aumento da expressão da enzima SOD2 (Dai *et al.* 2014), que mantém a homeostase redox e evita o dano oxidativo, como observado em nosso trabalho. A enzima SOD2, localizada na mitocôndria, catalisa a dismutação de superóxido em O₂ em H₂O₂, tornando-os substrato para detoxificação pelas enzimas CAT ou GPx (Halliwell & Guterige 2000).

Nossos resultados fornecem uma base científica para o desenvolvimento e a utilização de proantocianidinas no tratamento de doenças associadas ao estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial. No entanto, outros estudos elucidando o exato mecanismo de ação das proantocianidinas devem ser considerados.

6. CONCLUSÕES

Nosso estudo mostrou que as proantocianidinas da semente de uva são uma estratégia importante para prevenir a disfunção mitocondrial, o estresse oxidativo e a apoptose em células HEK-293 tratadas com H_2O_2 . Os dados aqui apresentados permitiram concluir que as mitocôndrias e a homeostase redox são alvos envolvidos nos mecanismos de proteção das GSPE e que esta proteção ocorre via regulação SIRT1.

Os dados obtidos neste estudo permitem as seguintes conclusões específicas:

- ✓ As GSPE foram capazes de prevenir a diminuição da viabilidade, os danos oxidativos a lipídeos e proteínas, bem como a depleção da atividade da enzima SOD induzidos pelo H_2O_2 .
- ✓ A exposição das células a GSPE foi capaz de evitar a diminuição da atividade dos complexos I, III e IV da cadeia de transporte de elétrons ocasionado pelo H_2O_2 .
- ✓ A expressão da subunidade NDUFS7, diminuída com o tratamento com o H_2O_2 , foi preservada em níveis basais em células tratadas com GSPE, sugerindo-se que este é um dos alvos da ação das GSPE.
- ✓ O tratamento com GSPE preveniu o aumento da atividade do complexo II da cadeia de transporte de elétrons induzido pelo H_2O_2 .
- ✓ Observou-se que as GSPE evitaram a diminuição da biossíntese de ATP provocado pelo H_2O_2 .
- ✓ As GSPE foram capazes de evitar o aumento da expressão de proteínas apoptóticas (PARP, p53 e BAX) induzidos pelo H_2O_2 .
- ✓ A diminuição da expressão da SIRT 1 induzida pelo H_2O_2 foi evitada em células expostas as GSPE.
- ✓ As GSPE impediram o aumento da expressão da SIRT 3 ocasionado pelo H_2O_2 .

7. PERSPECTIVAS

Para uma melhor compreensão dos efeitos biológicos das proantocianidinas da semente da uva, e para continuidade deste trabalho, seria importante a avaliação dos seguintes aspectos:

- ✓ Avaliar a expressão das demais sirtuínas, a fim de correlacionar as suas atividades e integrar seus mecanismos de ação em células HEK-293 tratadas com GSPE.
- ✓ Examinar fatores de transcrição responsáveis pela regulação da atividade das SIRT 1 e SIRT3 em células HEK-293 tratadas com GSPE.
- ✓ Determinar a capacidade das GSPE em evitar os danos oxidativos ao DNA, através do ensaio cometa e cometa alcalino, em cultura de células HEK-293.
- ✓ Avaliar o efeito anti-inflamatório das GSPE em células HEK-293.
- ✓ Verificar o papel das GSPE em relação a biogênese mitocondrial, através da expressão da proteína PGC1- α , em células HEK-293.
- ✓ Avaliar o efeito das GSPE em ratos, através dos ensaios de atividade dos complexos mitocondriais (complexos I, II, III e IV), estresse oxidativo (TBARS e proteínas carboniladas), apoptose (PARP, p53 e BAX) e expressão de sirtuínas (SIRT 1 e SIRT3).

10. REFERÊNCIAS

- Andreazza, A.C.; Shao, L.; Wang, J.F.; Young, L.T. (2010). Mitochondrial complex I activity and oxidative damage to mitochondrial proteins in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder. **Arch. Gen. Psychiatry.** 67: 360-8.
- Baeri, M.; Mohammadi-Nejad, S.; Rahimifard, M.; Navaei-Nigjeh, M.; Moeini-Nodeh, S.; Khorasani, R.; Abdollahi, M. (2018). Molecular and biochemical evidence on the protective role of ellagic acid and silybin against oxidative stress-induced cellular aging. **Mol. Cell Biochem.** 441:21-33.
- Bao, L.; Cai, X.; Zhang, Z.; Li, Y. (2015). Grape seed procyanidin B2 ameliorates mitochondrial dysfunction and inhibits apoptosis via the AMP-activated protein kinase-silent mating type information regulation 2 homologue 1-PPAR γ co-activator-1 α axis in rat mesangial cells under high-dose glucosamine. **Br. J. Nutr.** 113: 35-44.
- Bansode, R.R.; Khatiwada, J.R.; Losso, J.N.; Williams, L.L. (2016). Targeting MicroRNA in Cancer Using Plant-Based Proanthocyanidins. **Diseases.** 2016 4: 1-13.
- Bhullar, K.S.; Rupasinghe, H.P. (2013). Polyphenols: multipotent therapeutic agents in neurodegenerative diseases. **Oxid. Med. Cell Longev.** 2013: 1-19.
- Bosch-Presegué, L. Vaquero, A. (2014). Sirtuin-dependent epigenetic regulation in the maintenance of genome integrity. **FEBS J.** 282: 1745-67.

- Bouayed, J.; & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state. Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. **Oxid. Med. Cell Longev.** 3: 228-37.
- Breen, A.P.; Murphy, J.A. (1995). Reactions of oxyl radicals with DNA. **Free Radic. Biol. Med.** 18: 1033–1077.
- Blake, R.; Trounce, I.A. (2013). Mitochondrial dysfunction and complications associated with diabetes. **Biochim. Biophys. Acta.** 1840:1404-12.
- Cádiz-Gurrea, M.L.; Borrás-Linares, I.; Lozano-Sánchez, J.; Joven, J.; Fernández-Arroyo, S.; Segura-Carretero, A. (2017). Cocoa and grape seed byproducts as a source of antioxidant and anti-inflammatory proanthocyanidins. **Inta. Já. Mola. Sci.** 18: 1-14.
- Cai, X.; Bao, L.; Ren, J.; Li, Y.; Zhang, Z. (2015). Grape seed procyanidin B2 protects podocytes from high glucose-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis via the AMPK-SIRT1-PGC-1 α axis in vitro. **Food Funct.** 7:805-15.
- Carnevale, I.; Pellegrini, L.; D'Aquila, P.; Saladini, S.; Lococo, E.; Polletta, L.; Vernucci, E.; Foglio, E.; Coppola, S.; Sansone, S.; Passarino, G.; Bellizzi, D.; Russo, M. A.; Fini, M.; Tafani, M. (2017). SIRT1-SIRT3 axis regulates cellular response to oxidative stress and etoposide. **J. Cell. Physiol.** 232:1835-1844.

- Carocho, M., Ferreira, I. C.F.R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food Chem. Toxicol.** 51: 15–25.
- Carrasco-Pozo, C.; Mizgier, M. L.; Speisky, H.; & Gotteland, M. (2012). Differential protective effects of quercetin, resveratrol, rutin and epigallocatechin gallate against mitochondrial dysfunction induced by indomethacin in Caco-2 cells. **Chem. Biol. Interact.** 195: 199–205.
- Chen, Q.; Liu, X.F.; Zheng, P.S.(2014). Grape seed proanthocyanidins (GSPs) inhibit the growth of cervical cancer by inducing apoptosis mediated by the mitochondrial pathway. **PLOSone.** 9: 1-12.
- Chen, M.; Yu, S. (2017). Lipophilized grape seed proanthocyanidin derivatives as novel antioxidants. **J. Agric. Food. Chem.** 65:1598-1605.
- Cheng, Y.C.; Sheen, J.M.; Hu, W.L.; Hung, Y.C. (2017). Polyphenols and oxidative stress in atherosclerosis-related ischemic heart disease and stroke. **Oxid. Med. Cell Longev.** 2017:1-17.
- Cheung, K.G.; Cole, L.K.; Xiang, B.; Chen, K.; Ma, X.; Myal, Y.; Hatch, G.M.; Tong, Q.; Dolinsky, V.W. (2015). Sirtuin-3 (SIRT3) protein attenuates doxorubicin-induced oxidative stress and improves mitochondrial respiration in H9c2 cardiomyocytes. **J. Biol. Chem.** 290:10981-93.

- Chiu, J.; Dawes, I.W. (2012). Redox control of cell proliferation. **Trends Cell Biol.** 22:592-601.
- Cory, H.; Passarelli, S.; Szeto, J.; Tamez, M.; Mattei, J. (2018). The role of polyphenols in human health and food systems: A mini-review. **Front. Nutr.** 5: 1-9.
- Crabtree, M.; Hao, G.; Gross, S.S. (2003). Detection of cysteine S-nitrosylation and tyrosine 3-nitration in kidney proteins. **Methods Mol. Med.** 86:373-84.
- Croft, K.D. Dietary polyphenols: antioxidants or not? (2016). **Arch. Biochem. Biophys.** 595: 120-124.
- Dai, S. H.; Chen, T.; Wang, Y. H.; Zhu, J.; Luo, P.; Rao, W.; Yang, Y. F.; Fei, Z.; Jiang, X. F. (2014). Sirt3 attenuates hydrogen peroxide-induced oxidative stress through the preservation of mitochondrial function in HT22 cells. **Int. J. Mol. Med.** 34, 1159-68.
- Dalle-Donne, I.; Scaloni, A.; Giustarini, D.; Cavarra E.; Tell, G., Lungarella, G.; Colombo, R.; Rossi, R.; Milzani, A. (2005). Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. **Mass. Spectrom. Rev.** 24: 55-99.
- Del Rio, D; Rodriguz-Mateos, A; Spencer, J. P. E; Tognolini, M; Borges, G; Crozier, A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and

evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxid. Redox Signal.** 18: 1818-1892.

. Dhanasekaran, D.N.; Reddy, E.P. (2008). JNK signaling in apoptosis. **Oncogene.** 27:6245-51.

Dragan, S.; Andrica, F.; Serban, M.C.; Timar, R. (2015). Polyphenols-rich natural products for treatment of diabetes. **Curr. Med. Chem.** 22:14-22

El-Hattab, A.W. & Scaglia, F. (2016). Mitochondrial cytopathies. **Cell Calcium.** 60, 199–206.

Rufino, M.S.M.; Alves, R.E.; Brito, E.S.; Morais, S.M.; Sampaio, C.G.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F.D. (2007). Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. **Embrapa.** 1-4.

Espley, R. V.; Butts, C. A.; Laing, W. A.; Martell, S.; Smith, H.; McGhie, T. K.; Zhang, J.; Paturi, G.; Hedderley, D.; Bovy, A.; Schouten, H. J.; Putterill, J.; Allan, A. C.; Hellens, R. P. (2014). Dietary flavonoids from modified apple reduce inflammation markers and modulate gut microbiota in mice. **J. Nutr.** 44:146-54

Farmer, E.E.; Mueller, M.J. (2013). ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. **Annu. Ver. Plant. Biol.** 64:429-50.

- Favero, G.; Franceschetti, L.; Rodella, L. F.; Rezzani, R. (2015). Sirtuins, aging, and cardiovascular risks. **Age (Dordr)**. 37:1-19.
- Forbes-Hernández, T.; Giampieri, F.; Gasparini, M.; Mazzoni, L.; Quiles, J. L.; Alvarez-Suarez, J. M.; Battino, M. (2014). The effects of bioactive compounds from plant foods on mitochondrial function: a focus on apoptotic mechanisms. **Food Chem. Toxicol.** 68: 154-182
- Fridman, J.S.; Lowe, S.W. (2003). Control of apoptosis by p53. **Oncogene**. 22:9030-40.
- Gabai, V.L.; Yaglom, J.A.; Volloch, V.; Meriin, A.B.; Force, T.; Koutroumanis, M.; Massie, B.; Mosser, D.D.; Sherman, M.Y. (2000). Hsp72-mediated suppression of c-Jun N-terminal kinase is implicated in development of tolerance to caspase-independent cell death. **Mol. Cell Biol.** 20:6826-36.
- Georgieva, E.; Ivanova, D.; Zhelev, Z.; Bakalova, R.; Gulubova, M.; Aoki, I. (2017) Mitochondrial dysfunction and redox imbalance as a Diagnostic marker of "free radical diseases". **Anticancer Res.** 37:5373-5381.
- Gopalakrishnan, S.; Ediga, H.H.; Reddy, S.S.; Reddy, G.B.; Ismail, A. (2018). Procyanidin-B2 enriched fraction of cinnamon acts as a proteasome inhibitor and anti-proliferative agent in human prostate cancer cells. **IUBMB Life.** 70:445-457.

- González-Paramás, A.M.; Santos-Buelga, C.; Dueñas, M.; González-Manzano, S. (2011). Analysis of flavonoids in foods and biological samples. **Mini. Rev. Med. Chem.** 11: 1239-55.
- Günay, E.; Celik, S.; Sarinc-Ulasli, S.; Özyürek, A.; Hazman, Ö.; Günay, S.; Özdemir, M.; Ünlü, M. (2016). Comparison of the anti-inflammatory effects of proanthocyanidin, quercetin, and damnacanthol on benzo(a)pyrene exposed A549 alveolar cell line. **Inflammation.** 39:744-51.
- Halliwell, B. (2000). Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? **Am. J. Clin. Nutr.** 72:1082-7.
- Halliwell, B. (2012). Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutr. Rev.** 70:257-65.
- He, N.; Zhu, X.; He, W.; Zhao, S.; Zhao, W.; Zhu, C. (2015). Resveratrol inhibits the hydrogen dioxide-induced apoptosis via Sirt 1 activation in osteoblast cells. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 79:1779-86.
- Hocsak, E.; Szabo, V.; Kalman, N.; Antus, C.; Cseh, A.; Sumegi, K.; Eros, K.; Hegedus, Z.; Gallyas, F.Jr.; Sumegi, B.; Racz, B. (2017). PARP inhibition protects mitochondria and reduces ROS production via PARP-1-ATF4-MKP-1-MAPK retrograde pathway. **Free Radic. Biol. Med.** 108:770-784.

- Janssen, R.J.; Nijtmans, L.G.; van den Heuvel, L.P.; Smeitink, J.A. (2006). Mitochondrial complex I: structure, function and pathology. **J. Inherit. Metab. Dis.** 29:499-515.
- Levy, J.; Boyer, R.R.; Neilson, A.P.; O'Keefe, S.F.; Chu, H.S.S.; Williams, R.C.; Dorenkott, M.R.; Goodrich, K.M. (2017). Evaluation of peanut skin and grape seed extracts to inhibit growth of foodborne pathogens. **Food Sci. Nutr.** 5: 1130–1138.
- Jia, X.; Wang, Z.; Zhang, B.; Su, C.; Du, W.; Zhang, J.; Zhang, J.; Jiang, H.; Huang, F.; Ouyang, Y.; Wang, Y.; Li, L.; Wang, H. (2018). Food sources and potential determinants of dietary vitamin C intake in chinese adults: a cross-sectional study. **Nutrients.** 10:1-15.
- Johnson, G.L.; Nakamura, K. (2007). The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. **Biochim. Biophys. Acta.** 1773:1341–1348
- Júnior, E. S. P.; Medeiros, N. S.; Dani, C.; Funchal, C. (2013). Suco de uva: fonte de compostos bioativos com benefício à saúde. **Nutrição Brasil.** 12: 185-191.
- Kehrer, J.P.; Klotz, L.O. (2015). Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. **Crit. Rev. Toxicol.** 45:765-98.
- Kennedy, J. A. (2008) Grape and wine phenolics: observations and recent findings. **Ciencia e Investigación Agraria.** 35: 107-120.

- Kupis, W.; Pałyga, J.; Tomal, E.; Niewiadomska, E. (2016). The role of sirtuins in cellular homeostasis. **J. Physiol. Biochem.** 72:371-80.
- Ky, I.; Teissedre, P.L. (2015). Characterisation of mediterranean grape pomace seed and skin extracts: polyphenolic content and antioxidant activity. **Molecules.** 20:2190-207.
- Kim, J.A.; Wei, Y.; Sowers, J.R. (2008). Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. **Circ. Res.** 102: 401–414.
- Kussmaul, L.; Hirst, J. (2006). The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. **PNAS**, 103: 7607–12.
- Lane, R. K.; Hilsabeck, T.; Rea, S. (2015). The role of mitochondrial dysfunction in age-related diseases. **Biochim. Biophys. Acta.** 1827: 1387-1400.
- Larsen, S. B.; Hanss, Z.; Krüger, R. (2018). The genetic architecture of mitochondrial dysfunction in Parkinson’s disease. **Cell Tissue Res.** 373:21–37.
- Levine, R.L.; Garland, D.; Oliver, C.N.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A.G.; Ahn, B.W.; Shaltiel, S.; Stadtman, E.R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymol.** 186:464-78.

- Li, S.; Xu, M.; Niu, Q.; Xu, S.; Ding, Y.; Yan, Y.; Guo, S.; Li, F. (2015). Efficacy of Procyanidins against in vivo cellular oxidative damage: a systematic review and meta-analysis. **PLoS One**. 10:1-14.
- Li, W.; Jiang, Y.; Sun, T.; Yao, X.; Sun, X. (2016). Supplementation of procyanidins B2 attenuates photooxidation-induced apoptosis in ARPE-19 cells. **Int. J. Food. Sci. Nutr.** 67:650-9.
- Liguori, I.; Russo, G.; Curcio, F.; Bulli, G.; Aran, L.; Della-Morte, D.; Gargiulo, G.; Testa, G.; Cacciatore, F.; Bonaduce, D.; Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. **Clin. Interv. Aging**. 13:757-772.
- Lin, S.; Xing, H.; Zang, T.; Ruan, X.; Wo, L.; He, M. (2018). Sirtuins in mitochondrial stress: Indispensable helpers behind the scenes. **Ageing Res. Rev.** 44:22-32.
- Limtrakul, P.; Yodkeeree, S.; Pitchakarn, P.; Punfa, W. (2016). Anti-inflammatory effects of proanthocyanidin-rich red rice extract via suppression of MAPK, AP-1 and NF- κ B pathways in Raw 264.7 macrophages. **Nutr. Res. Pract.** 10: 251-8.
- Lü, J-M.; Lin, P. H.; Yao, Q.; Chen, C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **J. Cell. Mol. Med.**, 14: 840-60.
- Ma, Q. (2010). Transcriptional responses to oxidative stress: Pathological and toxicological implications. **Pharmacol. Ther.** 125: 376–393.

Ma, S.B.; Nguyen, T.N.; Tan, I.; Ninnis, R.; Iyer, S.; Stroud, D.A.; Menard, M.; Kluck, R.M.; Ryan, M.T.; Dewson, G. (2014). Bax targets mitochondria by distinct mechanisms before or during apoptotic cell death: a requirement for VDAC2 or Bak for efficient Bax apoptotic function. **Cell Death Differ.** 21:1925-35.

Mangialasche, F.; Polidori, M. C.; Monastero, R.; Ercolani, S.; Camardad, C.; Cecchetti, R.; Mecocci, P. (2009). Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Ageing Res. Rev.** 8: 285–305.

Mocanu, M.M.; Nagy, P.; Szöllősi, J. (2015). Chemoprevention of breast cancer by dietary polyphenols. **Molecules.** 20:22578-620.

Morales, J.; Li, L.; Fattah, F.J.; Dong, Y.; Bey, E.A.; Patel, M.; Gao, J.; Boothman, D.A. (2014). Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. **Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.** 24:15-28.

Morigi, M.; Perico, L.; Benigni, A. (2018). Sirtuins in renal health and disease. **J. Am. Soc. Nephrol.** 29:1799-1809.

Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochem. J.** 417, 1–13.

- O'Donnell, V.B.; Freeman, B.A. (2001). Interactions between nitric oxide and lipid oxidation pathways: implications for vascular disease. **Circ. Res.** 88:12-21.
- Ou, K.; Gu, L. (2014). Absorption and metabolism of proanthocyanidins. **J. Funct. Foods.** 7:1273-81.
- Parihar, P.; Solanki, I.; Mansuri, M.L.; Parihar, M.S. (2014). Mitochondrial sirtuins: emerging roles in metabolic regulations, energy homeostasis and diseases. **Exp. Gerontol.** 61:130-41.
- Pascual-Teresa, S.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Santos-Buelga, C. (2000). Prodelphinidins and related flavanols in wine. **International J. Food Sci. Technol.** 35: 33-40.
- Perry, J.J.; Shin, D.S.; Getzoff, E.D.; Tainer, J.A. (2010). The structural biochemistry of the superoxide dismutases. **Biochim. Biophys. Acta.** 1804:245-62.
- Phaniendra, A.; Jestadi, D.B.; Periyasamy, L. (2014). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian. J. Clin. Biochem.** 30:11-26.
- Pokorný, J.; Pokorný, J.; Foletti, A.; Kobilková, J.; Vrba, J.; Vrba J.J. (2015). Mitochondrial dysfunction and disturbed coherence: gate to cancer. **Pharmaceuticals.** 8:675-695.

- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. **Clin. Inverv. Aging**, 2: 219–236.
- Lane, R.K.; Hilsabeck, T.; Rea, S.L. (2015). The role of mitochondrial dysfunction in age-related diseases. **Biochim. Biophys. Acta.** 1847:1387–1400.
- Salvadó, M.J.; Casanova, E.; Fernández-Iglesias, A.; Arola, L.; Bladé, C. (2015). Roles of proanthocyanidin rich extracts in obesity. **Food Funct.** 6:1053-71.
- Sandoval-Acuña, C.; Ferreira, J.; Speisky, H. (2014). Polyphenols an mitochondria: An update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions. **Arch. Biochem. Biophys.** 559: 75–90.
- Shahidi, F.; de Camargo, A.C. (2016). Tocopherols and tocotrienols in common and emerging dietary sources: occurrence, applications, and health benefits. **Int. J. Mol. Sci.** 17:1-29.
- Shih, M.F.; Cherng, J.Y. (2012). Protective effects of Chlorella-derived peptide against UVC-induced cytotoxicity through inhibition of caspase-3 activity and reduction of the expression of phosphorylated FADD and cleaved PARP-1 in skin fibroblasts. **Molecules.** 17:9116-28.
- Sies, H.; Berndt, C.; Jones, D. P. (2017). Oxidative stress. **Annu. Ver. Biochem.** 86:715-748.

- Sinha, K.; Das, J.; Pal, P.B.; Sil, P.C. (2013). Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. **Arch. Toxicol.** 87:1157-80.
- Sumbayev, V.V.; Yasinska, I.M. (2005). Regulation of MAP kinase-dependent apoptotic pathway: implication of reactive oxygen and nitrogen species. **Arch. Biochem. Biophys.** 436:406-12.
- Sutcliffe, T.C.; Winter, A.N.; Punessen, N.C.; Linseman, D.A. (2017). Procyanidin B2 protects neurons from oxidative, nitrosative, and excitotoxic stress. **Antioxidants (Basel)**. 6:1-19.
- Tao, L.; Park, J.Y.; Lambert, J.D. (2014). Differential prooxidative effects of the green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, in normal and oral cancer cells are related to differences in sirtuin 3 signaling. **Mol. Nutr. Food Res.** 59:203-11.
- Teixeira, J.; Deus, C.M.; Borges, F.; Oliveira, P.J. (2018). Mitochondria: targeting mitochondrial reactive oxygen species with mitochondriotropic polyphenolic-based antioxidants. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.** 97:98-103.
- Tsikas, D. (2017). Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. **Anal. Biochem.** 524:13-30.

- Thakur, D.; Jain, A.; Ghoshal, G.; Shivhare, U.S.; Katare, O.P. (2017). Microencapsulation of β -carotene based on casein/guar gum blend using zeta potential-yield stress phenomenon: an approach to enhance photo-stability and retention of functionality. **AAPS Pharm. Sci. Tech.** 18:1447-1459.
- Trachootham, D.; Lu, W.; Ogasawara, M. A.; Valle, N. R. D.; Huang, P. (2008). Redox regulation of cell survival. **Antioxid. Redox. Signal.** 10: 1343-1374.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, 2: 1231-46.
- Yang, X.H.; Liu, T.; Chen, B.; Wang, F.; Yang, Q.; XiaoHong, C. (2017). Grape seed proanthocyanidins prevent irradiation-induced differentiation of human lung fibroblasts by ameliorating mitochondrial dysfunction. **Sci. Rep.** 7:1-13.
- Xu, Z. S.; Wang, X. Y.; Xiao, D. M.; Hu, L. F.; Lu, M.; Wu, Z. Y.; Bian, J. S. (2011). Hydrogen sulfide protects MC3T3-E1 osteoblastic cells against H₂O₂-induced oxidative damage-implications for the treatment of osteoporosis. **Free. Radic. Biol. Med.** 50:1314-23.
- Walker, J.; Winhusen, T.; Storkson, J.M.; Lewis, D.; Pariza, M.W.; Somoza, E.; Somoza, V. (2014). Total antioxidant capacity is significantly lower in cocaine-dependent and methamphetamine-dependent patients relative to normal controls: results from a preliminary study. **Hum. Psychopharmacol.** 29:537-43.

- Wawryk-Gawda, E.; Chylińska-Wrzos, P.; Lis-Sochocka, M.; Chłapek, K.; Bulak, K.; Jędrych, M.; Jodłowska-Jędrych, B. (2014). P53 protein in proliferation, repair and apoptosis of cells. **Protoplasma**. 251:525-33.
- Wittmann, C.; Chockley, P.; Singh, S. K.; Pase, L.; Lieschke, G. J.; Grabher, C. (2012). Hydrogen peroxide in inflammation: messenger, guide, and assassin. **Adv. Hematol.** 2012;1-7.
- Yamaguchi, T.; Takamura, H.; Matoba, T.; Terao, J. (1998). HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging of foods by using 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl. **Biosc. Biotechnol. Biochem.** 62:1201-4.
- Yu, P.K.; Bennett, M.R. (2014). Mitochondrial DNA damage and atherosclerosis. **Trends. Endocrinol.** 25:481-7.
- Yin, M.; Zhang, P.; Yu, F.; Zhang, Z.; Cai, Q.; Lu, W.; Li, B.; Qin, W.; Cheng, M.; Wang, H.; Gao, H. (2017). Grape seed procyanidin B2 ameliorates hepatic lipid metabolism disorders in db/db mice. **Mol. Med. Rep.** 16: 2844-2850.
- Yu, S.B.; Pekkurnaz, G. (2018). Mechanisms orchestrating mitochondrial dynamics for energy homeostasis. **J. Mol. Biol.** 430:3922-3941.
- Yuan, Y.; Cruzat, V.F.; Newsholme, P.; Cheng, J.; Chen, Y.; Lu, Y. (2016). Regulation of SIRT1 in aging: roles in mitochondrial function and biogenesis. **Mech. Ageing Dev.** 155:10-21.

Zhang, Z.; Zheng, L.; Zhao, Z.; Shi, J.; Wang, X.; Huang, J. (2014). Grape seed proanthocyanidins inhibit H₂O₂-induced osteoblastic MC3T3-E1 cell apoptosis via ameliorating H₂O₂-induced mitochondrial dysfunction. **J. Toxicol. Sci.** 39:803-13.

Zucco, F.; De Angelis, I.; Testai, E.; Stamatii, A. (2004). Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. **Toxicol. in Vitro.** 18: 153–163.

11. ANEXOS

11.1 Anexo I

Tabela 3. Atividade antioxidante *in vitro* do GSPE.

	DPPH [•] (µg/mL) (Yamaguchi <i>et al.</i> 1998)	ABTS ^{•+} (µg/mL) (Rufino <i>et al.</i> 2007)
GSPE IC ₅₀	129,85 ± 6,84	254,37 ± 12,90

IC₅₀, µg/mL de GSPE necessário para eliminar 50% dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}; GSPE, extrato de proantocianidina de semente de uva; DPPH[•], 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo; ABTS^{•+}, 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico). Resultados expressos em média ± DP.