

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA

Gustavo Henrique Ferreira Gonçalinho

Os efeitos do resveratrol nas sirtuínas, células progenitoras endoteliais circulantes e marcadores de apoptose em mulheres na pós-menopausa com síndrome coronariana crônica: um ensaio clínico randomizado

São Paulo

2026

GUSTAVO HENRIQUE FERREIRA GONÇALINHO

Os efeitos do resveratrol nas sirtuínas, células progenitoras endoteliais circulantes e marcadores de apoptose em mulheres na pós-menopausa com síndrome coronariana crônica: um ensaio clínico randomizado

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo, para obtenção do título
Doutor em Ciências

Área de concentração: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Padua Mansur

São Paulo

2026

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gonçalinho, Gustavo Henrique Ferreira

Os efeitos do resveratrol nas sirtuínas, células progenitoras endoteliais circulantes e marcadores de apoptose em mulheres na pós-menopausa com síndrome coronariana crônica : um ensaio clínico randomizado / Gustavo Henrique Ferreira Gonçalinho; Antonio de Padua Mansur, orientador. -- São Paulo, 2026.

Tese (Doutorado) -- Programa de Cardiologia. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2026.

1.Menopausa 2.Doença arterial coronariana 3.Aterosclerose
4.Sirtuínas 5.Células progenitoras endoteliais 6.Proteínas inibidoras da apoptose 7.Resveratrol I.Mansur, Antonio de Padua, orient.
II.Título

USP/FM/DBD-077/26

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

“O questionador que senta sorrateiro

Nunca saberá como Responder.”

– Olga Tokarczuk

AGRADECIMENTOS

Ao Antônio de Padua Mansur pela orientação, ensinamentos, pela confiança que teve no meu trabalho e pela liberdade acadêmica que me proporcionou durante meu doutorado, esta última característica que é essencial para a formação de um cientista.

Aos pesquisadores e pesquisadoras do Laboratório de Imunologia do InCor. Ao Jorge Kalil, que confiou no meu trabalho e trouxe recursos que fizeram esse trabalho possível de ser realizado. À Verônica Coelho, pelo apoio na realização do estudo e por estar sempre me lembrando que a Ciência deverá ser sempre crítica e cética. À Sandra Maria, pelos ensinamentos no laboratório e pelo suporte nas análises. À Malu e Samar, pelo acolhimento no laboratório.

Ao pessoal Unidade Clínica de Coronariopatias Crônicas e do Laboratório de Análises Clínicas pelo apoio.

Aos amigos e amigas que me acompanharam e torceram por mim.

À Ágata, pelo carinho e companheirismo. Você me inspira.

À Universidade de São Paulo, que transformou minha vida e minha visão de mundo.

Ao Sistema Único de Saúde, que garante que o direito à saúde seja universal. Além disso, possibilita a formação de profissionais da saúde e pesquisadores de excelência.

RESUMO

Gonçalinho GHF. Os efeitos do resveratrol nas sirtuínas, células progenitoras endoteliais circulantes e marcadores de apoptose em mulheres na pós-menopausa com síndrome coronariana crônica: um ensaio clínico randomizado [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2026.

Introdução e objetivo: A menopausa é um importante fator de risco cardiovascular nas mulheres, provavelmente devido ao acentuado declínio de estrógenos. Os estrógenos afetam processos-chave na aterosclerose, mantendo a integridade endotelial ao inibir a apoptose endotelial e promover a regeneração por meio de células progenitoras endoteliais (EPC). Os fitoestrógenos, como o resveratrol, têm potencial terapêutico para a saúde cardiovascular das mulheres. O presente estudo teve como objetivo determinar se o resveratrol modulava os biomarcadores de apoptose circulantes e as EPC em mulheres na pós-menopausa com doença arterial coronariana (DAC) crônica. **Métodos:** Vinte mulheres na pós-menopausa com DAC crônica foram alocadas em um grupo de intervenção que recebeu 1000 mg de resveratrol ou placebo por 90 dias. Foram avaliados os marcadores circulantes de apoptose (caspases 3 e 9, survivina, cIAP2, XIAP, Bcl-2, citocromo C, sTNFR2 e S100A12), SIRT1 e 3, citocinas e EPC. **Resultados:** No final do estudo, o grupo do resveratrol apresentou um aumento no cIAP2 sérico ($p = 0,018$) e Bcl-2 ($p = 0,043$) e uma diminuição na caspase-9 ($B = -7,152$, IC 95% = $-13,554$ – $-0,751$) e no CD34+/KDR+ circulante ($B = -0,249$, IC 95% = $-0,365$ – $-0,133$). Além disso, os níveis de XIAP foram mais baixos do que no grupo placebo ($p = 0,047$). Não foram observadas diferenças significativas para sirtuínas, citocinas, perfil lipídico, glicose e pressão arterial. **Conclusão:** O resveratrol aumentou as proteínas anti-apoptóticas em mulheres na pós-menopausa com DAC crônica, sugerindo um potencial efeito benéfico na homeostase endotelial, provavelmente não relacionado às sirtuínas circulantes. No entanto, o tratamento com resveratrol reduziu as EPC circulantes, o que pode ser devido à redução dos estímulos de mobilização das EPC secundários ao aumento da sinalização anti-apoptótica endotelial ou devido ao aumento da endotelização das EPC, induzindo a regeneração endotelial.

Palavras-chave: Menopausa, Doença arterial coronariana, Aterosclerose, Sirtuínas, Células progenitoras endoteliais, Proteínas inibidoras da apoptose, Resveratrol.

ABSTRACT

Gonçalinho GHF. The effects of resveratrol on sirtuins, circulating endothelial progenitor cells, and markers of apoptosis in postmenopausal women with chronic coronary syndrome: a randomized controlled trial [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2026.

Background & aims: Menopause is an important cardiovascular risk factor in women likely due to marked estrogen decline. Estrogens affect key processes in atherosclerosis, maintaining endothelial integrity by inhibiting endothelial apoptosis and promoting regeneration through endothelial progenitor cells (EPCs). Phytoestrogens, such as resveratrol, have therapeutic potential for women’s cardiovascular health. The present study aimed to determine whether resveratrol modulated circulating apoptosis biomarkers and EPCs in postmenopausal women with chronic coronary heart disease (CHD). **Methods:** Twenty postmenopausal women with chronic CHD were allocated to an intervention group receiving 1000 mg of resveratrol or placebo for 90 days. Circulating markers of apoptosis (caspases 3 and 9, survivin, cIAP2, XIAP, Bcl-2, cytochrome c, sTNFR2, and S100A12), SIRT1 and 3, cytokines and EPCs were assessed. **Results:** At the end of the study, the resveratrol group showed an increase in serum cIAP2 ($p = 0.018$) and Bcl-2 ($p = 0.043$), and a decrease in caspase-9 ($B = -7.152, 95\%CI = -13.554 - -0.751$) and in circulating CD34+/KDR+ ($B = -0.249, 95\%CI = -0.365 - -0.133$). In addition, XIAP levels were lower than placebo group ($p = 0.047$). No significant differences were observed for sirtuins, cytokines, lipid profile, glucose, and blood pressure. **Conclusion:** Resveratrol increased anti-apoptotic proteins in postmenopausal women with chronic CHD, suggesting a potential beneficial effect on endothelial homeostasis, likely unrelated to circulating sirtuins. However, resveratrol treatment reduced circulating EPCs, which could be due to reduction of EPCs mobilization stimuli secondary to increased endothelial anti-apoptosis signaling or due to increased endothelization of EPCs, inducing endothelial regeneration.

Keywords: Menopause, Coronary disease, Atherosclerosis, Sirtuins, Endothelial progenitor cells, Inhibitors of apoptosis proteins, Resveratrol.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Cascata de sinalização de caspases apoptóticas de células de mamíferos – p. 12

Figura 2. Efeitos da apoptose na aterosclerose. – p. 14

Figura 3. Esquema das vias de sinalização inibidoras da apoptose relevantes para a sobrevivência e apoptose das células tumorais. – p. 15

Figura 4. Mobilização, recrutamento e incorporação de EPC no tecido isquêmico. – p. 18

Figura 5. Vias de sinalização da SIRT1 no coração. – p. 21

Figura 6. Vias de sinalização da SIRT3 no coração. – p. 22

Figura 7. Desenho do estudo – p. 30

Figura 8. Expressão superficial de CD34⁺/KDR⁺/CD45⁻ de PBMC de um indivíduo. – p. 36

Tabela 1. Coeficientes para o cálculo da densidade corporal, segundo a equação de Durnin & Womersley. – p. 32

Tabela 2. Características clínicas das participantes. – p. 41

Tabela 3. Características nutricionais basais e pós-tratamento. – p. 43

Tabela 4. Marcadores nos períodos basal e pós-intervenção. – p. 45

Tabela 5. Efeitos do resveratrol nas sirtuínas, EPC e marcadores de apoptose circulantes. – p. 47

Tabela 6. Análise de mediação. – p. 69

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	11
I. Epidemiologia das doenças cardiovasculares nas mulheres.....	11
II. Apoptose e patogênese das doenças cardiovasculares	11
III. O papel das células progenitoras endoteliais nas doenças cardiovasculares 16	
IV. Resveratrol, sirtuínas e potencial efeito nas doenças cardiovasculares.....	19
V. Justificativa do estudo	27
2. OBJETIVO	28
3. METODOLOGIA.....	29
I. Delineamento do estudo	29
II. Critérios de inclusão	30
III. Critérios de exclusão	30
IV. Intervenção do estudo e avaliação nutricional clínica	31
a. Anamnese	31
b. Inquéritos dietéticos.....	31
c. Antropometria.....	31
d. Nível de atividade física	33
V. Análises laboratoriais	33
a. Glicemia e perfil lipídico	33
b. Inflamação e disfunção endotelial	34
c. Sirtuínas.....	34
d. Marcadores de apoptose	34
e. Outros marcadores séricos.....	34
f. Isolamento e criopreservação de células mononucleares do sangue periférico 35	

g.	Descongelamento celular e análise de viabilidade	35
h.	Análise de células progenitoras endoteliais circulantes por citometria de fluxo	
	35	
VI.	Análises estatísticas	36
4.	RESULTADOS	39
5.	DISCUSSÃO	46
6.	CONCLUSÕES	51
7.	SUPORTE FINANCEIRO	51
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1. INTRODUÇÃO

I. Epidemiologia das doenças cardiovasculares nas mulheres

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte em mulheres brasileiras, com taxas brutas de mortalidade de 183,3/100 mil, superando, assim, as outras principais taxas de mortalidade, causadas por neoplasias (97,5/100 mil), doenças do aparelho respiratório (64,6/100 mil) e doenças endócrinas, nutricionais e metabólicas (45,5/100 mil) (1). Dentre as DCV, a doença isquêmica do coração (DIC) correspondeu a 34,6% das causas de mortes cardiovasculares entre 2010 e 2019, principalmente em mulheres a partir dos 60 anos (1). Dados mais recentes mostram que, a DIC ainda é a principal causa de morte por DCV, seguida por doenças cerebrovasculares (2).

A ocorrência das DCV aparece cerca de 7 a 10 anos mais tardiamente no sexo feminino do que no masculino, e é principalmente atribuída à proteção vascular do estradiol no período fértil (3–6). A menopausa, período caracterizado por amenorreia e redução nos níveis de estrógenos, está associada a alterações estruturais cardíacas, assim como aumento da incidência e risco de DCV (7). Entretanto, ainda não está claro o efeito causal do declínio de estrógenos e o risco elevado, visto que ensaios clínicos com terapia de reposição hormonal no período após a menopausa não mostraram efeito protetor contra desfechos cardiovasculares (8,9). Esses resultados sugerem que a proteção vascular e na maior expectativa de vida observada nas mulheres se deve a fatores além dos estrógenos (10).

II. Apoptose e patogênese das doenças cardiovasculares

A apoptose é um processo de morte celular programada regulada e é ativada por diversos fatores presentes nas doenças cardiovasculares, como o estresse oxidativo, inflamação e o dano ao DNA (11). Há três principais vias de sinalização para indução da apoptose: a via extrínseca, que é mediada por receptores de morte celular e seus ligantes – como Fas/FasL e receptor 1 do fator de necrose tumoral alfa (TNFR1)/TNF- α – e ativação da caspase 8, que é iniciadora da ativação das caspases executoras 3, 6 e 7, que levam à fragmentação do DNA e apoptose; a via intrínseca, que envolve disfunção mitocondrial, liberação do citocromo C para o citosol, onde vai se complexar com o fator de ativação de proteases apoptóticas 1 (APAF-1) e com a pró-caspase 9 para formar o complexo apoptossoma, levando à ativação da iniciadora caspase 9 e subsequentemente ativação das caspases executoras 3, 6 e 7, causando a apoptose; e a via ativada pelo

estresse do retículo endoplasmático (RE) e ativação da caspase iniciadora 12, que induz a apoptose através da caspase 9 (12) (**Figura 1**).

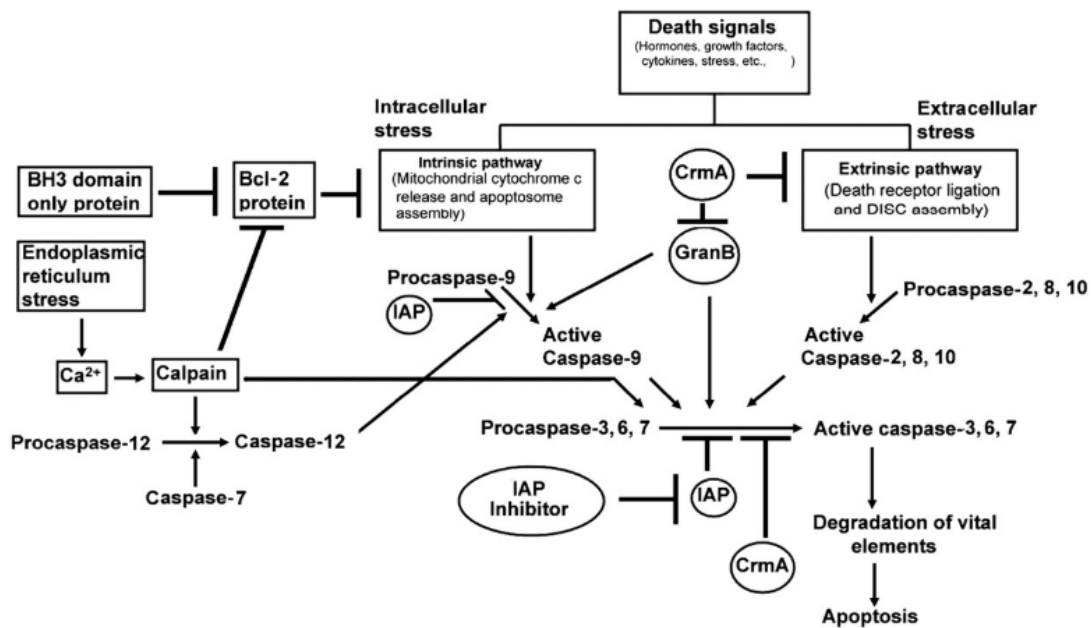


Figura 1. Cascata de sinalização de caspases apoptóticas de células de mamíferos. Fonte: Hrdinka e Yabal (12).

O papel da apoptose na patogênese das doenças cardiovasculares ainda não está claro. Entretanto, apoptose de cardiomiócitos está presente em lesões cardíacas de diversos tipos de doenças cardiovasculares (13,14). No infarto agudo do miocárdio (IAM), a morte celular causada por lesões do processo de isquemia/reperfusão oriundo da oclusão coronariana é o evento central da patogênese, e a apoptose atua intensamente nesse processo, sendo o principal tipo de morte celular da doença (15,16). Já na insuficiência cardíaca, a ocorrência de apoptose de cardiomiócitos é relativamente menor (16).

A aterosclerose é caracterizada pelo acúmulo de detritos celulares de processos apoptóticos, de colesterol, e de matriz calcificada que causa estreitamento luminal. Estímulos inflamatórios crônicos, juntamente com dislipidemias, resultam em formação e crescimento das placas ateroscleróticas, caracterizadas pela infiltração lipídica e de células imunológicas que ativam e retroalimentam a sinalização da morte celular programada, formando o núcleo necrótico (17). A eferocitose é um processo de depuração de células apoptóticas ou necróticas através de células fagocíticas, evitando que o conteúdo intracelular vazze para o tecido circundante e que este cause danos às outras células devido

a enzimas tóxicas e oxidantes e até mesmo ativar uma resposta inflamatória (17). Este processo se diferencia da fagocitose pelo fato de ser imunologicamente silencioso e induzir uma resposta de reparo tecidual (18). No entanto, em lesões ateroscleróticas mais avançadas existe uma redução da atividade eferocítica, culminando em acúmulo de detritos celulares que ativam sinalização inflamatória e desencadeiam os processos de morte celular programada e de aterosclerose (17). A apoptose em lesões ateroscleróticas avançadas ocorre no endotélio e em macrófagos e células musculares lisas vasculares (CMLV), estas duas últimas tendo estímulos proliferativos aumentados na aterogênese (19). O aumento da apoptose de CMLV pode reduzir a estabilidade da placa aterosclerótica, elevando o risco de eventos cardiovasculares (19). Estudos pré-clínicos mostraram que alterações nas proteínas endógenas da sinalização apoptótica e que resultam no aumento de morte celular favorecem complicações ateroscleróticas, como a síndrome coronariana aguda (SCA) (19). Em humanos, a apoptose também tem mostrado papel importante na determinação do tamanho do infarto, extensão do remodelamento ventricular esquerdo e desenvolvimento de insuficiência cardíaca após IAM (20).

O endotélio tem papel essencial na preservação da estabilidade intravascular e inibição da aterosclerose devido suas funções de controlar a tensão vascular, prevenir trombose e controlar a resposta inflamatória (21). A disfunção endotelial, causada pela sinergia de diversos fatores de risco que aumentam a exposição do endotélio a substâncias como partículas de LDL oxidadas, espécies reativas de oxigênio, angiotensina II, TNF- α , homocisteína, e lipopolissacarídeos (LPS), culmina em apoptose das células endoteliais, que é o primeiro estágio da doença aterosclerótica (22–24). O excesso de apoptose da camada endotelial prejudica a integridade das células endoteliais e promove deposição lipídica, levando os monócitos aderirem ao endotélio e subsequentemente a translocação de macrófagos para a camada íntima, onde absorvem as partículas LDL oxidadas, agravando o processo aterosclerótico (21) (**Figura 2**). Novos prevenção e tratamento da aterosclerose, portanto, podem atuar na inibição da apoptose do endotélio.

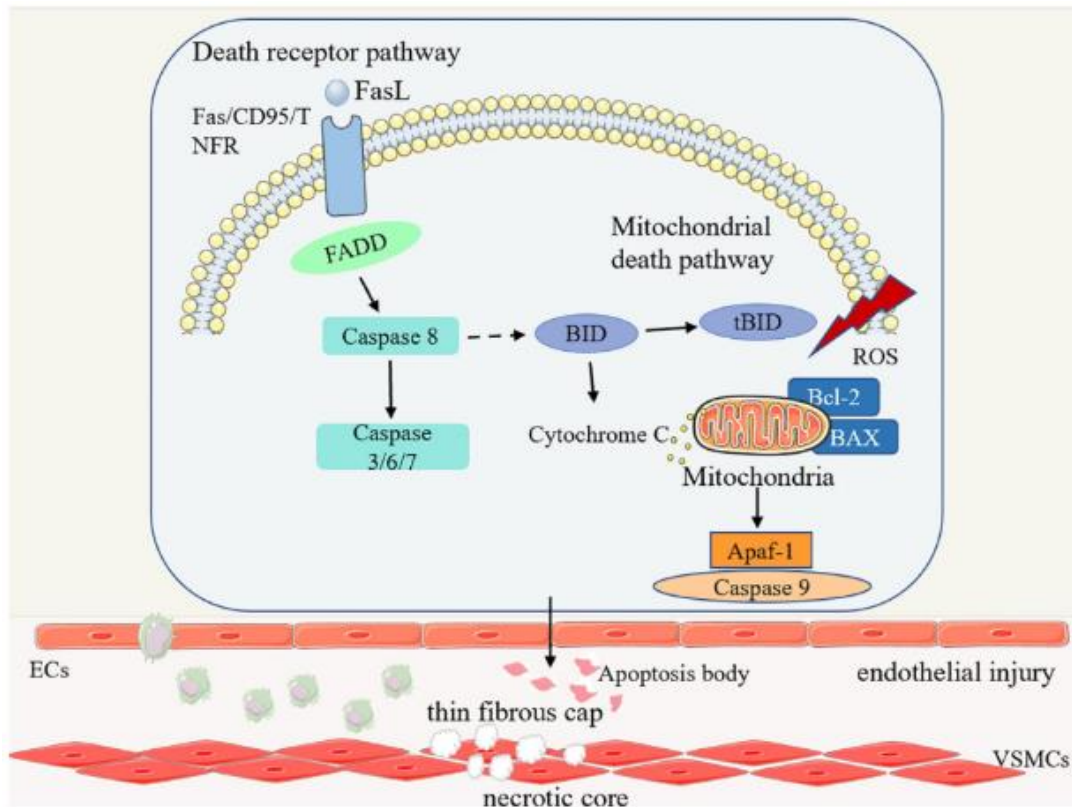


Figura 2. Efeitos da apoptose na aterosclerose. Existem duas formas diferentes de controle da apoptose: uma é regulada através das proteínas da família Bcl-2, e outra é regulada através de receptores de morte celular. Ambas focam na ativação da aterosclerose. Apoptose pode levar a danos das células endoteliais, e o afinamento células musculares lisas vasculares e apoptose de macrófagos promovem a formação do núcleo necrótico de placas ateroscleróticas. Fonte: Ni *et al.* (21).

Potenciais alvos terapêuticos têm sido estudados para inibição da apoptose no endotélio. As caspases são proteínas chave na sinalização de morte celular. A expressão, ativação e inativação das caspases são controladas por diversos mecanismos inibidores ou ativadores. As proteínas inibidoras de apoptose (IAP) têm ganhado destaque na literatura como potencial alvo terapêutico para alteração da sinalização da apoptose (25,26). Ao todo, foram identificadas 8 IAP nos humanos (27). As IAP mais descritas na literatura são as IAP celulares 1 e 2 (c-IAP1 e c-IAP2), survivina e a XIAP (*X-linked IAP*). As IAP são as únicas proteínas endógenas capazes de suprimir as atividades tanto das caspases iniciadoras quanto das efetoras da apoptose (26) (**Figura 3**).

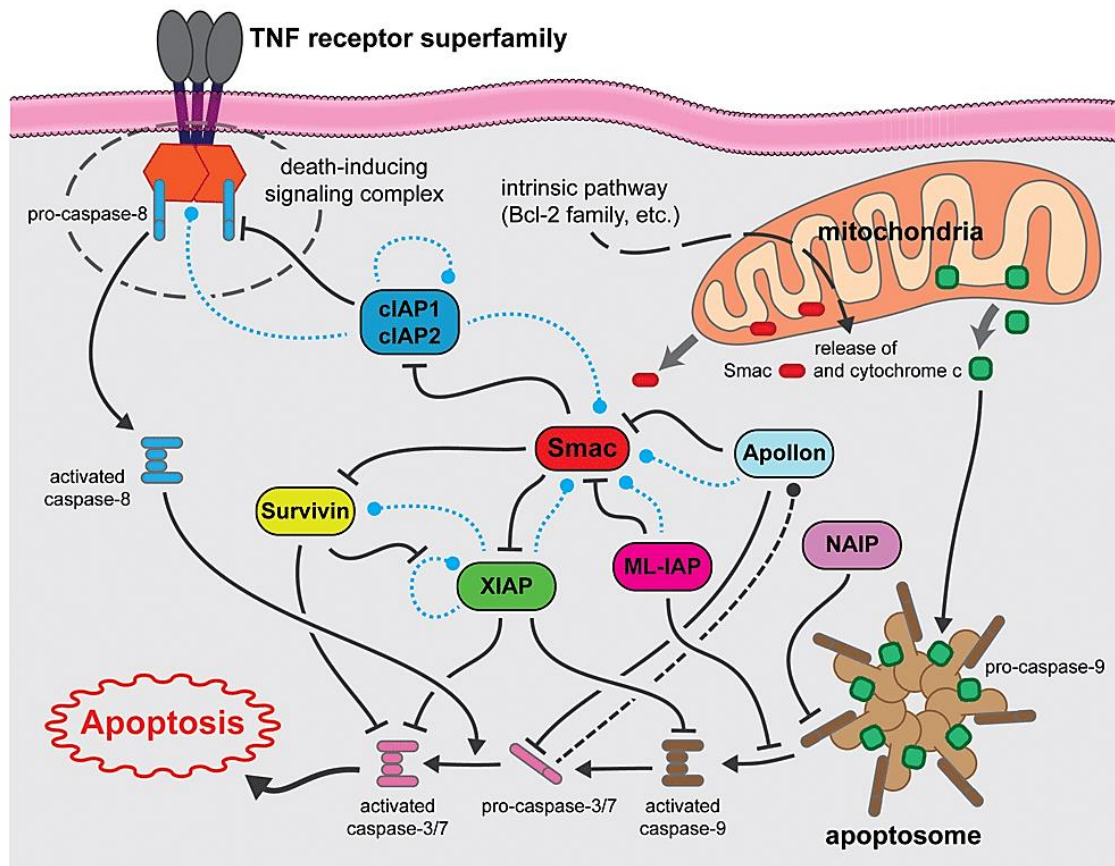


Figura 3. Esquema das vias de sinalização inibidoras da apoptose relevantes para a sobrevivência e apoptose das células tumorais. As linhas tracejadas indicam potenciais eventos degradativos (azul = mediado por ubiquitina, preto = mediado por caspase). cIAP1, inibidor celular da proteína 1 da apoptose; cIAP2, inibidor celular da proteína 2 da apoptose; ML-IAP, inibidor do melanoma da proteína da apoptose; NAIP, proteína inibidora da apoptose neuronal; TNF, fator de necrose tumoral. Fonte: Finlay *et al.* (28).

As c-IAP1 e 2 têm a característica de induzir a sobrevivência através da via NF- κ B e, desta forma, acabam inibindo a atividade da caspase 8 (26). Além disso, essas IAP inibem a apoptose pela interação direta com as caspases 9, 7 e 3 e pelo aumento da degradação destas através do sistema ubiquitina-proteassoma (26). A XIAP é a IAP que apresenta maior potência em inibir a atividade de caspases via interação direta, sistema ubiquitina-proteassoma e inibição da formação do apoptossoma (26). A XIAP também se liga ao receptor de TGF- β e aumentando a resposta celular ao fator de crescimento através da sinalização NF- κ B e JNK, induzindo a sobrevivência celular (27). Além disso, a XIAP participa de processos necessários para a expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (12). A survivina inibe a sinalização intrínseca e extrínseca de apoptose através de interações cooperativas com outras IAP, ampliando os efeitos biológicos destas (26).

Pelo fato de as IAP participarem também da resposta inflamatória, estudos mostram que a inibição dessas proteínas, principalmente c-IAP1/2 e XIAP reduz a expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, atenuando a inflamação (12,29). Um estudo mostrou que ratos nocaute para o gene de c-IAP2 apresentaram redução de lesões ateroscleróticas, que coincidiu com aumento de apoptose de macrófagos, tanto em estágios iniciais como avançados da doença (30). Também foi encontrada menor celularidade de macrófagos nas lesões ateroscleróticas (30). Isso indica que as IAP participam da fisiopatologia da aterosclerose, e a inibição destas sensibiliza os macrófagos à apoptose, aumentando a eficiência da depuração de fagócitos na placa e consequentemente atenuando a resposta inflamatória e progressão da doença (30).

Estudos mostraram que níveis circulantes de marcadores de apoptose se encontram elevados em indivíduos com alto risco cardiovascular e síndrome metabólica (31,32), IAM e angina instável (33), função ventricular esquerda reduzida (34) e insuficiência cardíaca (35), sugerindo aumento da sinalização pró-apoptótica nessas condições. Interessantemente, um estudo mostrou que mulheres no período pós-menopausa submetidas a terapia hormonal com 17 β -estradiol (E2) e noretisterona tiveram redução dos níveis circulantes de ligante de Fas (FasL), sugerindo uma relação entre estrógenos, apoptose e risco cardiovascular aumentado em mulheres após a menopausa (36). Portanto, a inibição da apoptose pode ser cardioprotetora e as IAP representam um potencial alvo terapêutico para tratamento das doenças cardiovasculares em mulheres no período pós-menopausa (11,37,38).

III. O papel das células progenitoras endoteliais nas doenças cardiovasculares

A exposição a diversos fatores de risco cardiovascular resulta em danos estruturais e funcionais no endotélio, que podem abranger desde alterações metabólicas até a apoptose de células endoteliais. Os vasos afetados perdem capacidade vasodilatadora devido ao comprometimento da síntese de substâncias vasoativas, assim como apresentam uma rigidez devido a alterações estruturais, levando a um estado vasoconstritor crônico que aumenta o risco de danos a microcirculação de órgãos, reduz a reserva de fluxo coronariano, e, a longo prazo, eleva a pressão arterial e o risco cardiovascular (24,39).

A integridade arterial pode ser restaurada através de mecanismos reparatórios inerentes, que envolvem replicação celular e reposição de células endoteliais disfuncionais (24). As células endoteliais maduras existentes podem se replicar através de processos mitóticos, porém com uma capacidade proliferativa muito baixa, visto que são células terminalmente diferenciadas. Outro mecanismo que leva ao reparo endotelial é através das células progenitoras endoteliais (EPC) circulantes, que são células imaturas que apresentam capacidade proliferativa alta de se diferenciarem em células endoteliais maduras funcionais no processo de endotelização quando essas aderem à superfície lesionada do vaso (24).

As EPC são definidas como um grupo heterogêneo de células derivadas da medula óssea e estão presentes nas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em diferentes estágios de diferenciação endotelial, tendo efeito de tropismo vascular envolvido na reparação de danos endoteliais (39). As EPC da circulação se encontram em estágios diferentes de maturação, que geralmente são divididos em dois grupos: as EPC iniciais (menos diferenciadas) e tardias (mais bem diferenciadas). As EPC iniciais podem ser caracterizadas através do fenótipo com formas de fusão, das unidades formadoras de colônias (UFC), e a presença de marcadores de superfície como CD31, CD34 e CD133. Já as EPC tardias expressam também o receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR2) – também chamado de receptor do domínio de inserção de quinase (KDR) – e caderina vascular endotelial (CD144) e apresentam um formato de paralelepípedo (39,40). Os níveis de maturação afetam as funções desses dois grupos no reparo vascular: as células menos diferenciadas apresentam uma proliferação limitada e sua função está principalmente à ação parácrina secretando fatores de crescimento e citocinas anti-inflamatórias, enquanto as células mais diferenciadas têm uma capacidade proliferativa maior, são capazes de produzir óxido nítrico (NO), de captar LDL acetilada (LDLac), e formar estruturas capilares em matriz de membrana basal solúvel (39–41).

Em indivíduos saudáveis, as EPC correspondem a 0,0001–0,01% do total de células na corrente sanguínea (42). A maioria das EPC se encontram na medula óssea como células-tronco quiescentes, em um microambiente com baixa tensão de oxigênio e altos níveis de moléculas quimiotáticas (43). A mobilização das células-tronco com potencial de diferenciação em EPC da medula óssea ocorre através de estímulos como hipóxia, trauma, exercício físico, estrógeno, ou citocinas (43). A migração e mobilização

das EPC estão relacionadas com a secreção de fatores de crescimento como VEGF, fator 1 derivado de células estromais (SDF-1), fator de células-tronco (SCF) e fator 1 de crescimento símile a insulina (IGF-1), que são liberados em resposta a lesões. Citocinas que estão associadas à resposta inflamatória, como TNF- α , fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), interleucina (IL)-6 e IL-3 também deflagram respostas de recrutamento e mobilização de EPC, que se incorporam ao endotélio dos locais lesionados (43) (**Figura 4**).

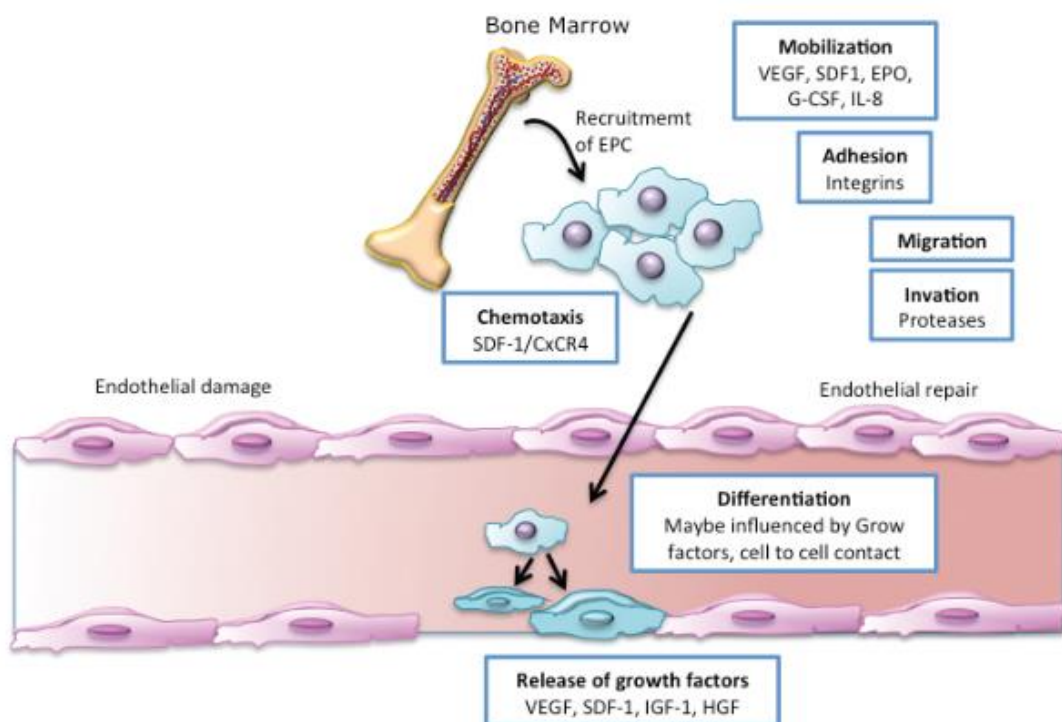


Figura 4. Mobilização, recrutamento e incorporação de EPC no tecido isquêmico. Fonte: Nova-Lamperti *et al.* (43).

A isquemia, característica principal da DAC, induz a expressão do fator 1 induzível pela hipóxia (HIF-1) em resposta à hipóxia aguda ou crônica. A ativação de HIF-1 está associada a respostas protetoras durante a isquemia. O fator de transcrição HIF-1 é um complexo dividido em duas subunidades: HIF-1 α e HIF-1 β . HIF-1 β é expressa de maneira constitutiva, enquanto a expressão de HIF-1 α é regulada pela pressão de oxigênio celular. Em uma situação de isquemia, a baixa pressão de oxigênio celular induz a expressão de HIF-1 α , que, em células endoteliais, leva à sinalização de

sobrevivência celular, aumento da expressão de VEGF e da angiogênese, sendo um importante regulador da função das células endoteliais (43). Em um estudo com modelo de isquemia de membros foi observado que a regulação positiva de HIF-1 α em EPC promoveu diferenciação, proliferação e migração das células (44).

Estudos epidemiológicos observacionais mostraram que a quantidade de EPC circulantes estão positivamente associadas com função endotelial mensurada pela vasodilatação mediada por fluxo (FMD) (45) e inversamente associadas com fatores de risco para DAC (46), e que também são preditoras de desfechos cardiovasculares, mostrando que indivíduos com menores níveis apresentaram menor sobrevida (47,48). Em relação a indivíduos saudáveis, menores níveis circulantes de EPC foram observados em indivíduos com angina instável e estável (49), disfunção erétil (50), e aterosclerose (51). Alguns estudos intervencionais mostraram que a infusão de EPC melhora a reserva de fluxo coronariano após IAM (52) e melhora função endotelial após refeição rica em gordura (53). Um estudo mostrou que mulheres na pós-menopausa e com DAC apresentaram menores quantidades de EPC circulantes que mulheres na pós-menopausa e sem a doença, e que este último grupo apresentou quantidades maiores que homens pareados por idade, evidenciando diferenças sexuais e o estado reprodutivo nas EPC circulantes e de como estas são influenciadas pela progressão da DAC (54). Esses resultados mostram que as EPC são biomarcadores emergentes de função endotelial e um possível fator de risco cardiovascular, corroborando com os resultados de estudos pré-clínicos.

IV. Resveratrol, sirtuínas e potencial efeito nas doenças cardiovasculares

Uma hipótese que poderia explicar a diferença do envelhecimento cardiovascular e expectativa de vida na população feminina em relação à população masculina é de que existe um envolvimento diferenciado das sirtuínas nesse grupo. As sirtuínas são uma família de proteínas desacetiladoras de histona (HDAC) sensíveis a nutrientes e dependentes de NAD⁺ (55). Estudos laboratoriais mostraram associação da expressão e atividade das sirtuínas com maior longevidade, reparo de danos do DNA e envolvidas com processos fisiopatológicos e fisiológicos, como envelhecimento, resistência a estresse celular, apoptose e inflamação, além da regulação da biogênese mitocondrial e ciclos circadianos (56). No estado de depleção energética celular ocorre aumento da produção de NAD⁺, que catalisa as reações das sirtuínas (55). Assim, a restrição

energética da dieta e substâncias miméticas de restrição energética aumentam o *pool* de NAD⁺, levando a expressão e ativação de sirtuínas, que apresentam diversos efeitos metabólicos cardioprotetores (57–60). Os efeitos mais estudados em relação ao metabolismo energético se devem principalmente à SIRT1 e SIRT3, as sirtuínas mais estudadas.

A SIRT1 fica localizada no núcleo celular, e sua expressão e atividade são controladas por diversos estímulos fisiopatológicos, fatores e cofatores de transcrição e modificações pós-translacionais (**Figura 5**). Seus efeitos no metabolismo glicídico estão associados com o aumento da expressão de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma tipo gama (PPAR- γ), fator de transcrição que está diretamente envolvido com aumento da captação de glicose através da síntese de adiponectina e translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) para as membranas celulares, aumentando, então, a sensibilidade das células à insulina (56). A SIRT1 também modula o metabolismo lipídico através do aumento da oxidação de ácidos graxos via ativação do PPAR- α , assim como aumenta o transporte reverso de colesterol através da expressão de ABCA1 e ABCG1 e inibição de LOX-1, restringindo a captação de LDL pelos macrófagos na túnica íntima (56). A desacetilação de histonas associadas aos genes *FOXO1*, *FOXO3a* e *FOXO4* induzida pela SIRT1 resulta em modulação do ciclo celular, aumento das defesas contra espécies reativas de oxigênio pela indução da catalase e redução da apoptose via aumento da expressão de Bcl-2. A sinalização de sobrevivência celular também é aumentada pela desacetilação da p53. A expressão de SIRT1 também atenua o encurtamento dos telômeros, que causa significativa redução do envelhecimento celular (56).

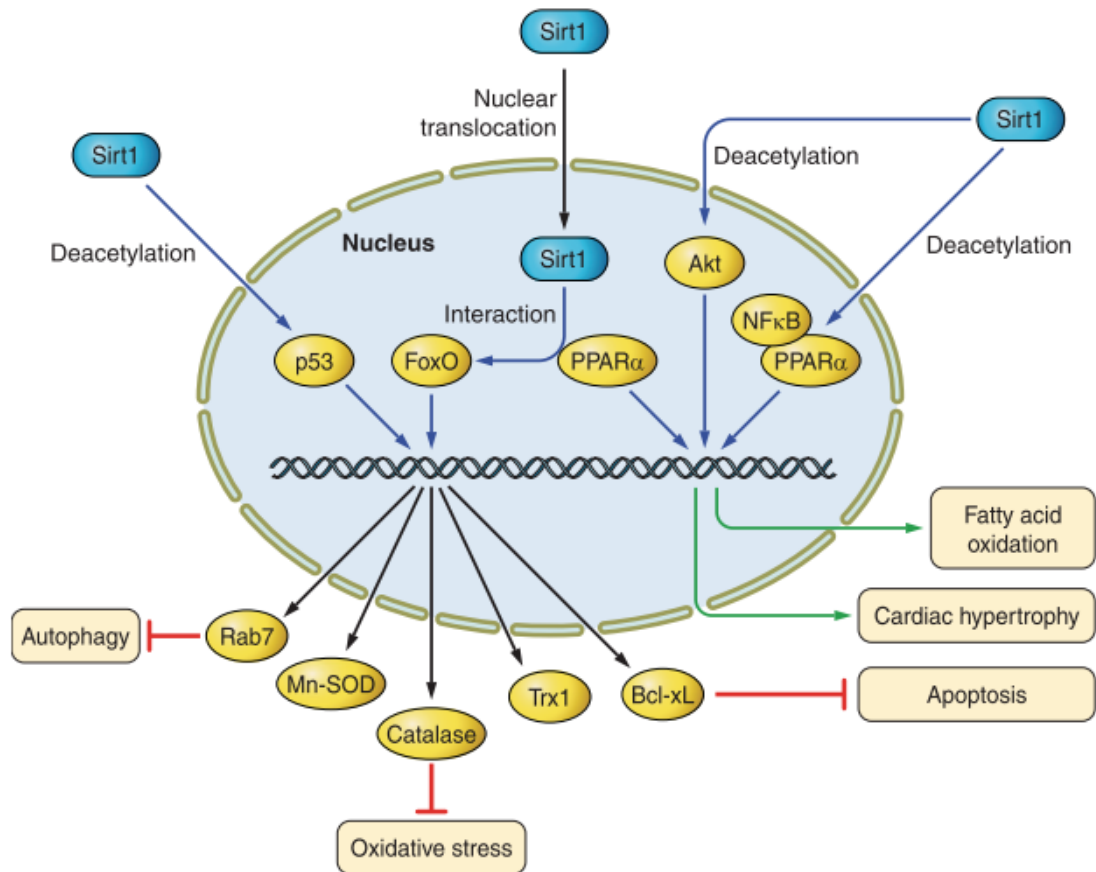


Figura 5. Vias de sinalização da SIRT1 no coração. SIRT1 modula a oxidação de ácidos graxos, hipertrofia cardíaca, apoptose, estresse oxidativo e autofagia através da desacetilação de NF-κB, Akt, Forkhead box class O (FoxO) e p53. Fonte: Matsushima e Sadoshima (56).

A SIRT3, localizada no interior das mitocôndrias, exerce papel importante no metabolismo energético e na apoptose. A expressão de SIRT3 induz a desacetilação de *FOXO3a*, elevando a expressão de catalase e superóxido dismutase (SOD). Através da ativação da proteína mitocondrial ciclofilina D (CypD) pela SIRT3, a permeabilização da membrana externa da mitocôndria é inibida, neutralizando a sinalização intrínseca da apoptose (56). Outro efeito importante do aumento da atividade de SIRT3 é a regulação da sinalização pró-apoptótica através do aumento da expressão de Bcl-2, um importante inibidor dessa via (56) (**Figura 6**).

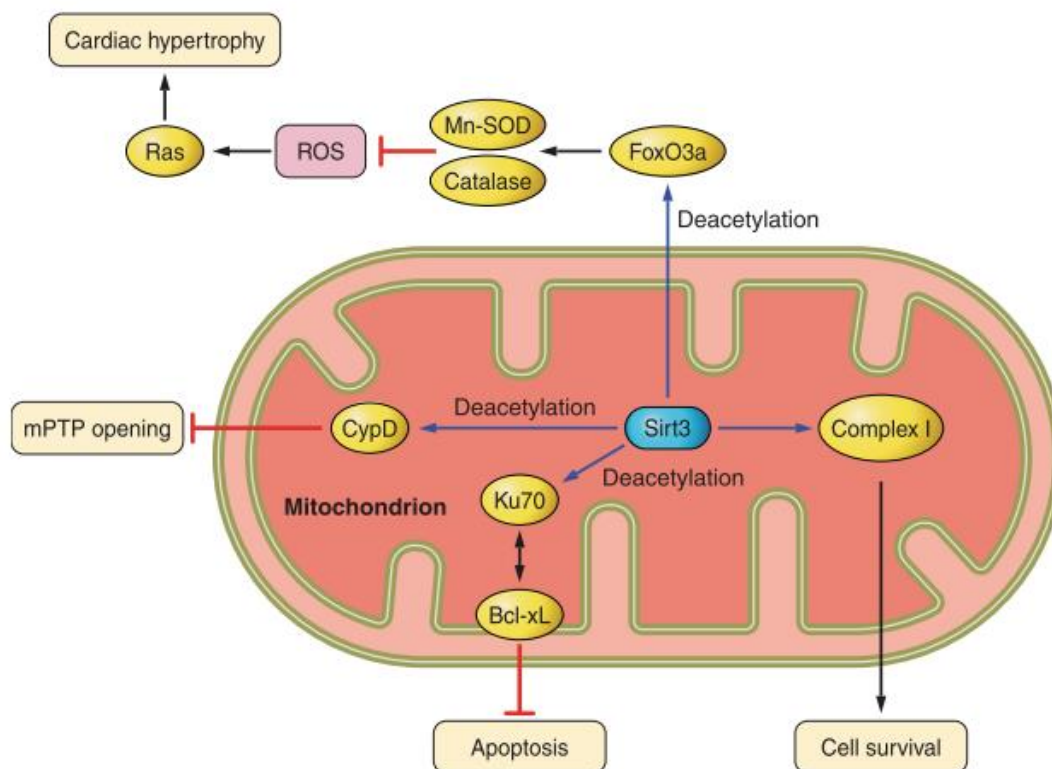


Figura 6. Vias de sinalização da SIRT3 no coração. SIRT3 regula a abertura dos poros de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP), apoptose e sobrevivência celular, principalmente através da desacetilação de proteínas mitocondriais, incluindo ciclofilina D (CypD), Ku70, e complexo I, independentemente da transcrição. SIRT3 também desacetila FoxO, levando à regulação positiva de superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD) e catalase e à inibição da hipertrofia cardíaca. Fonte: Matsushima e Sadoshima (56).

Evidências laboratoriais e clínicas sugerem que as sirtuínas apresentam efeito cardioprotetor em mulheres, principalmente por compartilhar vias metabólicas associadas ao estrogênio. Em um estudo utilizando modelos de isquemia cerebral realizado em ratas foi demonstrado que o estrogênio induz aumento da expressão e atividade de SIRT1 e AMPK de maneira dose-dependente em neurônios. A ativação destas vias reduziu a apoptose neuronal induzida pela privação de oxigênio e glicose. Esses resultados sugerem que o efeito protetor do estrogênio contra isquemia cerebral ocorre através da via metabólica de SIRT1 (61). Em um estudo *in vivo* e *in vitro*, foi mostrado que SIRT1 é um importante regulador da proteção de cardiomiócitos mediada por estrogênio na hipertrofia cardíaca de camundongos (62). Também foi observado que a administração de estrogênio diminuiu o estresse oxidativo e atividade de caspase-3 de maneira dependente da ativação de SIRT1, resultando em redução da apoptose de cardiomiócitos. A resposta de hipertrofia cardíaca também teve uma redução substancial após a ativação desta via metabólica (62). Considerando a influência do estrogênio nas sirtuínas citadas nos trabalhos acima, um estudo realizado em tecidos cardíacos de doadores de órgãos sem

doenças prévias demonstrou que a expressão de SIRT1, SIRT3 e AMPK em cardiomiócitos de mulheres jovens em período fértil (de 17 a 40 anos) foi maior que em mulheres mais velhas (de 50 a 68 anos), indicando provável diminuição da expressão ao longo do envelhecimento (63). No grupo das mulheres mais velhas, também se observou maior expressão de citocinas pró-inflamatórias e ativação de NF- κ B, menor expressão de SOD e catalase, além de aumento de marcadores de disfunção mitocondrial. No entanto, essas diferenças relacionadas ao envelhecimento e da expressão de SIRT1 e SIRT3 não ocorreram nos homens, sugerindo que as diferenças do risco cardiovascular entre os sexos possam estar relacionadas com a expressão de sirtuínas no tecido cardíaco (63). Portanto, as evidências sugerem que o envelhecimento e a menopausa se associam a menor expressão de SIRT1, resultando em maior risco cardiovascular. No entanto, ainda há necessidade de mais estudos para avaliar relação causal da expressão e atividade de sirtuínas com doenças cardiovasculares em homens e mulheres e suas alterações com o envelhecimento e menopausa.

A indução de sirtuínas, especialmente a SIRT1, tem sido estudada para reestabelecimento e manutenção da função endotelial (64). Evidências oriundas de estudos laboratoriais mostram que a inibição de SIRT1 contribui para a formação de placas de ateroma e células espumosas, e que sua ativação exerce um efeito de que inibe a senescência das CMLV (65). Além disso, a deficiência de SIRT1 em camundongos induz uma malformação cardiovascular que reduz a expectativa de vida dos animais (66), visto que a SIRT1 é indispensável para a sobrevivência de cardiomiócitos por neutralizar lesões de isquemia-reperfusão (67), além de retardar a progressão da aterosclerose através da melhora da função de células endoteliais (68).

Por ser uma enzima desacetilase dependente de NAD⁺, a SIRT1 é capaz de influenciar a homeostase endotelial através de diversos alvos. A SIRT1 previne a senescência induzida por estresse e disfunção das células endoteliais através da desacetilação de p53, além de promover a proliferação e aumentar a sobrevivência das células através de LKB1 (64). A SIRT1 também contribui para a sobrevivência das células endoteliais através da indução da biogênese mitocondrial através da ativação dos fatores de transcrição co-ativador-1 α do PPAR- γ (PGC-1 α), fator respiratório nuclear 1 (NRF1) e óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), que acabam inibindo a apoptose intrínseca (64). A SIRT1 também pode contribuir para melhor função endotelial e

vasodilatação através da inibição do estresse oxidativo e redução da resposta inflamatória no endotélio. Em condições *in vivo* e *in vitro*, a ativação de SIRT1 causa a formação de um complexo com fator de transcrição Forkhead Box 3 (FOXO3), levando à translocação deste último para o núcleo e a sua ligação na região promotora da superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD), aumentando a expressão deste antioxidante e, por fim, gerando resistência ao estresse oxidativo (69,70). SIRT1 também inibe NF-κB por desacetilação direta da subunidade p65 do fator de transcrição ou ativando AMPK e PPARα, que por sua vez também apresentam ação de inibição da via do NF-κB e a subsequente geração de espécies reativas de oxigênio (64). A vasodilatação arterial causada pela geração de óxido nítrico (NO) também é modulada por SIRT1, que tem como um dos alvos de desacetilação e fosforilação a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (71).

Apesar de as evidências mostrarem o efeito da SIRT1 na vasodilatação e função endotelial, a literatura é escassa em relação a estudos clínicos na área. Um estudo demonstrou que o aumento de SIRT1 sérica por restrição energética não foi associada ao FMD, mas foi associado independentemente à maior vasodilatação mediada por nitroglicerina (NMD) em homens e mulheres sem evento cardiovascular prévio, sugerindo, então, uma melhor função vascular não mediada pelo endotélio (72). A ativação simpática crônica, mensurada pela noradrenalina plasmática, leva a um estado vasoconstritivo e é associada independentemente com menor vasodilatação mensurada por FMD, refletindo menor função endotelial (73–75). No estudo previamente citado (72), também foi mostrado que o tratamento com resveratrol (500 mg/dia) aumentou a concentração plasmática de SIRT1 de maneira semelhante restrição energética (dieta de 1000 kcal/dia), e que esse aumento foi associado, em ambos os grupos, com uma redução de noradrenalina plasmática, mas sem associações significativas da com FMD. Um outro estudo avaliou a influência de um ativador de SIRT1, SRT2104, na função endotelial de tabagistas. Apesar da melhora do perfil lipídico com a intervenção, refletida por reduções de colesterol total, LDL-c e triglicérides, não houve diferenças nos parâmetros de função endotelial e vasodilatação em relação ao grupo placebo (76).

A partícula de HDL é capaz de restaurar a função endotelial através do aumento da biodisponibilidade de NO e, conseqüentemente, aumentar o FMD (77). Um estudo realizado em mulheres com DAC precoce mostrou que o aumento da concentração sérica

de SIRT1 e redução de IMC causada pela restrição energética alterou a composição lipídica de partículas de HDL, com marcada redução de colesterol livre e fosfolípidos das partículas (78). Essa alteração da composição lipídica está associada com uma melhora da fluidez da membrana das partículas de HDL e reduz a oxidação da lipoproteína, melhorando sua função cardioprotetora (79–81). No entanto, não foi avaliada função endotelial nesse estudo.

Essas evidências sugerem que o aumento da expressão de SIRT1 está associada a melhores parâmetros cardiometabólicos, porém, a sua influência na função endotelial ainda permanece incerta. Existem críticas quanto ao uso de medidas de reatividade vascular para indivíduos com risco moderado e baixo, devido à reduzida capacidade preditiva na prevenção primária, além de ser dependente do observador (82).

Um dos principais ativadores de sirtuínas conhecidos na literatura é o resveratrol. O resveratrol (3,5,4'-trihidroxi-*trans*-estilbeno) é uma fitoalexina e polifenol encontrado naturalmente em uvas, cacau, morango, tomate, amendoim, soja, lúpulo, amora, framboesa e mirtilos (83). O resveratrol tem como principais proteínas alvo a SIRT1 e o co-ativador-1 α do PPAR- γ (PGC-1 α), causando respostas que levam à melhora da função metabólica da célula, como melhora da função mitocondrial, redução do estresse redox, aumento da sensibilidade à insulina e indução da β -oxidação de ácidos graxos (84).

Evidências também apontam que o resveratrol apresenta importante atividade anti-inflamatória (84). Em células T ativadas, o resveratrol diminui a resposta inflamatória através da indução da apoptose e inibição da secreção de TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-9, IL-12, IL-17, proteína-1 α inflamatória de macrófagos (MIP-1 α) e proteína-1 quimiotática de monócitos (MCP-1) (84). O resveratrol também diminui a resposta inflamatória através da interação com o metabolismo de ácidos graxos poli-insaturados. Ao se ligar ao sítio ativo da ciclooxigenase-2 (COX-2), o resveratrol impede a ligação desta com o ácido araquidônico, causando redução da síntese dos metabólitos pró-inflamatórios do ácido graxo como leucotrienos, tromboxanos e prostaglandinas de série par (84). Além disso, o resveratrol diminui a expressão de COX-2 através da prevenção da fosforilação da I κ B α e da MAPK, quinases que regulam os complexos dos fatores de transcrição NF- κ B e proteína ativadora 1 (AP-1) (84). Com a inibição desses fatores de transcrição ocorre a redução da resposta inflamatória.

A homeostase redox é rigorosamente regulada por diversos mecanismos bioquímicos, e o desbalanço entre oxidação e defesa antioxidante é característico da fisiopatologia das DCV. O estresse redox é o principal responsável pela morte celular e pelo comprometimento da função cardíaca durante a lesão por isquemia e reperfusão prolongada e posterior remodelamento tecidual (85). Evidências experimentais mostram que o resveratrol atua reduzindo o estresse redox causado pela lesão por isquemia e reperfusão, amenizando as lesões causadas no tecido cardíaco (85). O efeito cardioprotetor do resveratrol nas lesões por isquemia e reperfusão é atribuído à indução de sinalização de sobrevivência celular através do aumento da expressão de Bcl-2 e Akt, inibindo a apoptose e lesão miocárdica (86). A resposta de sobrevivência celular também é parcialmente atribuída à indução da autofagia através da via mTOR (87). Outras evidências apontam que o resveratrol reduz a inflamação vascular através da indução da autofagia (88).

Apesar de os inúmeros mecanismos dos potenciais efeitos positivos do resveratrol na saúde cardiometabólica, as evidências clínicas ainda são inconsistentes. Estudos mostram que a suplementação de resveratrol reduziu pressão arterial, glicemia, triglicérides, LDL-c e aumentou HDL-c e sensibilidade à insulina (89). Essas alterações poderiam estar relacionadas ao aumento das expressões gênica e proteica de SIRT1, que foram resultados de ensaios clínicos prévios (58,59).

O resveratrol também modula a função endotelial, visto que aumenta a SIRT1 e esta induz a expressão da eNOS, aumentando a síntese de NO. O NO, por sua vez, atua como mensageiro do sistema nervoso central como inibidor da medula ventrolateral rostral e conseqüentemente reduz a atividade simpática, resultando em maior vasodilatação e diminuição do risco cardiometabólico (90). Foi demonstrada uma redução de noradrenalina plasmática com suplementação de 500 mg de resveratrol por 30 dias em adultos saudáveis, mas sem alterações nos valores de FMD (72). Por outro lado, outros estudos mostraram eficácia do resveratrol em aumentar a vasodilatação da veia safena e artéria mamária interna em pacientes que realizaram bypass coronário (91), aumentar a vasodilatação da artéria braquial em idosos com algum grau de intolerância a glicose (92) e melhorar parâmetros de rigidez arterial e estresse oxidativo em pacientes com diabetes tipo 2 (93).

Meta-análises utilizando ensaios clínicos mostraram que a suplementação de resveratrol não teve efeito nos lípides plasmáticos, pressão arterial e glicemia (94,95), porém quanto aos parâmetros antropométricos houve benefícios (96,97). Alguns estudos também mostraram ausência de efeitos no metabolismo glicídico e até piora do perfil lipídico (58–60). No entanto, há diferenças relevantes nos estudos quanto à dose de resveratrol utilizada, pacientes incluídos no estudo, tempo de seguimento, e biomarcadores utilizados. Portanto, destaca-se a necessidade de ensaios clínicos mais robustos para o estudo dos efeitos do resveratrol nas doenças cardiovasculares.

V. Justificativa do estudo

As mulheres apresentam aumento do risco cardiovascular após a menopausa, possivelmente devido ao declínio de estrógenos característico do processo. No entanto, a terapia de reposição hormonal isoladamente não reduz o risco, muito provavelmente a outros mecanismos estarem associados com a menopausa. A literatura mostra que as EPC se encontram reduzidas em mulheres na pós-menopausa, e que estas apresentam, além disso, níveis mais elevados de marcadores pró-apoptóticos, sugerindo uma disfunção endotelial associada à menopausa. Além desses marcadores, a literatura aponta que a expressão de SIRT1 também declina com o processo. Como estudos apontam que a SIRT1 também está associada com maior função endotelial e redução de apoptose, a restauração desse eixo através do ativador de SIRT1 resveratrol possa modular a homeostase endotelial em mulheres na pós-menopausa com DAC estabelecida.

2. OBJETIVO

O desfecho primário do presente estudo é analisar os efeitos de 90 dias de suplementação diária de 1g de resveratrol sobre a SIRT1 e a quantidade de células progenitoras endoteliais (EPC) circulantes em mulheres com doença arterial coronária crônica no período da pós-menopausa.

Além do objetivo principal, o presente estudo tem os seguintes objetivos secundários:

- I. Avaliar a associação da expressão proteica de SIRT1 e SIRT3 com EPC circulantes.
- II. Avaliar a associação de EPC circulantes com IAP.
- III. Avaliar o efeito do resveratrol em marcadores circulantes de inflamação e função endotelial e a associação destes com EPC.
- IV. Avaliar a associação de EPC circulantes e expressão de IAP, SIRT1, SIRT3 com marcadores antropométricos (circunferência de cintura, índice de massa corporal e pregas cutâneas), perfil lipídico, glicemia.

3. METODOLOGIA

I. Delineamento do estudo

Ensaio clínico randomizado, duplo-cego, paralelo e controlado por placebo, com intervenção de 90 dias de suplementação diária de 1g *trans*-resveratrol (resveratrol), em que foram incluídas mulheres no período pós-menopausa e com DAC crônica tratadas na Unidade Clínica de Coronariopatias Crônicas do InCor-HCFMUSP. As pacientes foram randomizadas de maneira simples em dois grupos, controle e resveratrol, através de sequências geradas pelo software SPSS versão 20.0 (**Figura 7**). Após a triagem, pacientes com critérios de elegibilidade foram incluídas no estudo após a aplicação do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Então, as participantes tiveram uma consulta nutricional, em que foram realizadas a avaliação nutricional clínica, coleta de sangue para análises laboratoriais e o recebimento de orientações para tomar duas cápsulas contendo 500mg de resveratrol ou placebo por 90 dias. Após esse período houve a fase final da última consulta nutricional e de coleta de dados, finalizando a intervenção.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), com o número (CAAE: 61901722.6.0000.0068) e registrado na plataforma Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC), com o código RBR-7d7cycj, podendo ser encontrado no site <https://ensaiosclinicos.gov.br/rg/RBR-7d7cycj>.

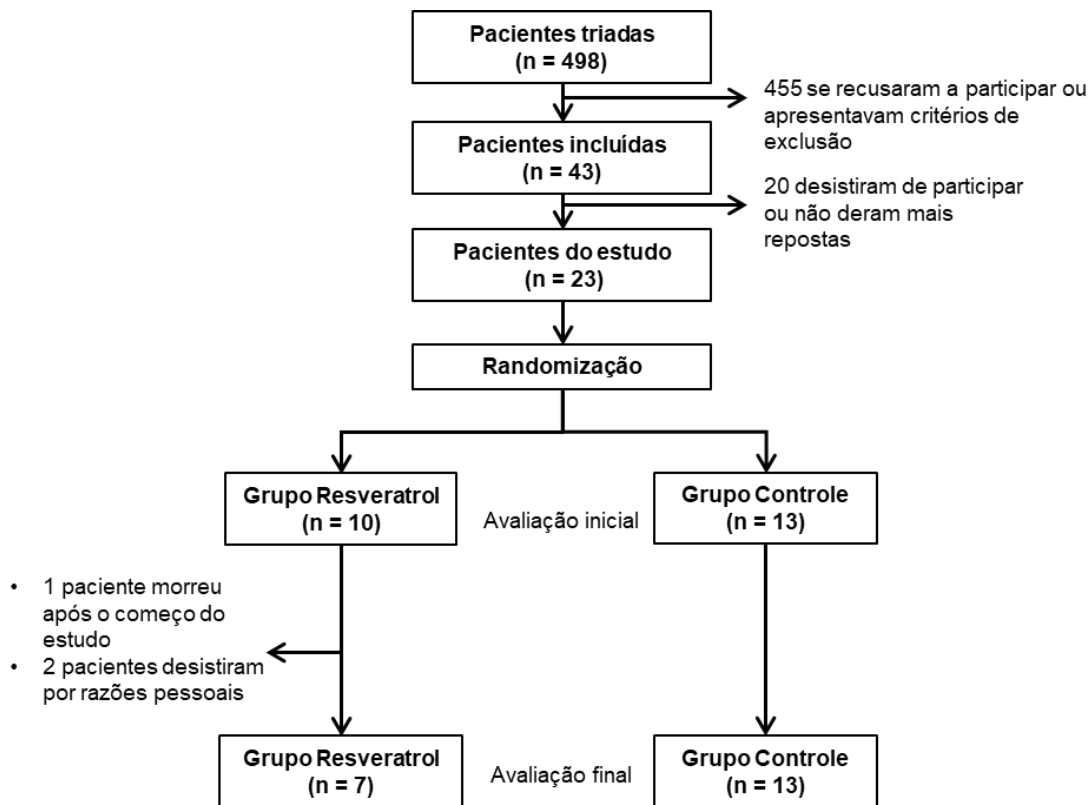


Figura 7. Desenho do estudo.

II. Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão foram: mulheres na pós-menopausa (mais de um ano de amenorreia); idade ≥ 55 anos; DAC crônica estável documentada pela cineangiocoronariografia com pelo menos uma lesão coronária com $>50\%$ de redução do lúmen vascular; e IMC entre 22 e 35 kg/m².

III. Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram: dislipidemia com TG ≥ 500 mg/dL e colesterol total ≥ 300 mg/dL; síndrome coronariana aguda nos últimos 6 meses antes da inclusão; doença cardíaca congênita; cirurgia nos últimos 6 meses antes da inclusão; doença renal crônica estágios 3a ou maior (taxa de filtração glomerular entre 45-59 mL/min/1,73m²), insuficiência hepática, doenças genéticas, hematológicas, reumáticas, respiratórias ou metabólicas clinicamente significantes que possam colocar as pacientes em perigo durante o estudo.

IV. Intervenção do estudo e avaliação nutricional clínica

O resveratrol foi administrado por via oral em dose diária de 1g divididas em 2 cápsulas de 500mg, sendo uma administrada na parte da manhã e a outra de noite pelo menos uma hora antes ou depois de qualquer refeição e/ou medicamento. O resveratrol de alta pureza (>98% *trans*-resveratrol) foi manipulado pela farmácia de manipulação Formularium (Pinheiros, São Paulo, SP, Brasil). Como placebo, cápsulas contendo amido foram utilizadas. As pacientes foram orientadas a devolver, na última consulta do estudo, as cápsulas que não foram utilizadas durante o período para cálculo de adesão ao tratamento.

A avaliação nutricional clínica consistiu em anamnese, inquéritos dietéticos, avaliação antropométrica, níveis de atividade física, assim como sintomas relatados pelas participantes após a intervenção.

a. Anamnese

Para cada paciente foi aplicado um questionário estruturado que abordou as seguintes variáveis: idade, história clínica atual, antecedentes familiares de doenças crônicas não-transmissíveis, uso de medicamentos e de suplementos alimentares e possíveis sintomas relatados ao final do estudo.

b. Inquéritos dietéticos

A avaliação dietética será realizada pela aplicação de um recordatório alimentar de 24 h (R24h) de um dia da semana para estimar o consumo habitual.

A energia, os macronutrientes (proteínas, lípidos e carboidratos), fibras, ácidos graxos e colesterol da dieta foram analisados utilizando a Tabela de Composição de Alimentos Tucunduva (98).

c. Antropometria

Os parâmetros antropométricos que mensurados foram: peso, estatura, circunferência de cintura, circunferência de braço, e composição corporal.

A análise de composição corporal foi realizada através de técnicas de plicometria através do Adipômetro Científico Classic, com pressão de 9,8 g/mm², precisão de 0,5 mm

e limite máximo de 65 mm (Sanny[®], São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil). Foram coletadas as dobras cutâneas bicipital (DCB), tricípital (DCT), subescapular (DCSE) e suprailíaca (DCSI) para cálculo da soma das 4 dobras e para predição de gordura corporal (GC). A predição da GC será realizada através do cálculo da densidade corporal usando a equação de Durnin e Womersley (99) para mulheres abaixo:

$$D = A - B \times \log_{10}(DCT + DCB + DCSE + DCSI) ,$$

Onde D = densidade corporal, A e B = coeficientes determinados de acordo com idade e sexo mostrados na tabela abaixo:

Tabela 1. Coeficientes para o cálculo da densidade corporal, segundo a equação de Durnin & Womersley (99).

Idade (anos)	Coeficiente A	Coeficiente B
17 a 19	1,1549	0,0678
20 a 29	1,1599	0,0717
30 a 39	1,1423	0,0632
40 a 49	1,3333	0,0612
≥50	1,1339	0,0645

A conversão da estimativa de densidade corporal em porcentagem de GC será feito utilizando a seguinte equação proposta por Siri (100):

$$\%GC = \left(\frac{4,95}{D} \right) - 4,5 \times 100$$

A circunferência de braço (CB) foi avaliada e também utilizada para estimar a massa muscular, foi calculada a circunferência muscular do braço (CMB) a partir dos dados de circunferência de braço (CB) e dobra cutânea tricípital (DCT) (101).

Também foi avaliada a espessura do músculo adutor do polegar como medida de reserva proteica (102).

d. Nível de atividade física

Para avaliação do nível de atividade física, foi aplicado o Questionário Internacional de Atividade Física (IPAC) versão curta, que foi validado previamente para a população brasileira (103). Para classificação da atividade física, foram utilizados um dos seguintes critérios para cada nível:

- Muito ativo: atividade física vigorosa ≥ 5 dias por semana e ≥ 30 minutos por sessão; atividade física vigorosa ≥ 3 dias por semana e ≥ 20 minutos por sessão e atividade moderada e/ou caminhada ≥ 5 dias por semana e ≥ 30 minutos por sessão.
- Ativo: atividade física vigorosa ≥ 3 dias por semana e ≥ 20 minutos por sessão; atividade moderada ou caminhada ≥ 5 dias por semana e ≥ 30 minutos por sessão; ou qualquer atividade somada de ≥ 5 dias por semana e ≥ 150 minutos por semana de caminhada, atividade moderada e atividade vigorosa.
- Irregularmente ativo: tipo A – realiza atividade física por pelo menos 10 minutos, mas não atinge critérios de Ativo (5 dias por semana ou 150 minutos por semana); tipo B – não atinge os critérios da categoria A.
- Sedentário: não realiza atividades físicas por pelo menos 10 minutos contínuos durante a semana.

V. Análises laboratoriais

Após um jejum de 8 a 12 horas, 60 mL de sangue foram coletados de cada paciente. O sangue total foi centrifugado a 1000 g durante 15 minutos a 4°C para separação do plasma ou soro. Dos 60 mL, 40 mL foram coletados em tubos de heparina para análises de EPC em citômetro de fluxo. Todas as amostras foram distribuídas de acordo com o número de análises e armazenadas a -80°C até o momento das análises.

a. Glicemia e perfil lipídico

As concentrações de glicose, colesterol total, HDL-c, LDL-c, triglicérides, foram determinadas por métodos usados em rotina hospitalar do Laboratório de Análises Clínicas do Incor/HC-FMUSP.

b. Inflamação e disfunção endotelial

A determinação das concentrações plasmáticas de proteína C-reativa (PCR) foram realizadas por métodos de rotina hospitalar do Laboratório de Análises Clínicas do Incor/HC-FMUSP.

No soro, também foram avaliados por ensaios imunoenzimáticos, através de kits ELISA (com seus respectivos códigos de compra), molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) (ab223591), calgranulina C (S100A12) (ab282299), interleucina (IL)-6 (ab178013), IL-1 β (ab214025), IL-10 (ab185986), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (ab181421), receptor 2 de TNF- α (TNFR2) (ab260061), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) (ab179886), fator estimulador das colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (ab100529), metaloproteinases-9 (MMP-9) (ab246539), fator de células-tronco (SCF) (ab176109), e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (RK00023). Todos os kits foram comprados da Abcam (Cambridge, Reino Unido), com exceção do VEGF, que foi comprado da Abclonal (Massachusetts, EUA).

c. Sirtuínas

As concentrações séricas de SIRT1 (RK04258 Abclonal, Massachusetts, EUA) e SIRT3 (ab314347, Abcam, Cambridge, Reino Unido) foram avaliadas através do ensaio imunoenzimático com kit ELISA.

d. Marcadores de apoptose

Para avaliar marcadores de apoptose e IAP, foram quantificados os parâmetros circulantes no soro por meio de ensaios imunoenzimáticos: caspase-3 (ab285337), caspase-9 (ab119508), c-IAP2 (ab314836), Bcl2 (ab119506), survivina (ab183361), XIAP (ab155446) e citocromo C (RK00061). Todas foram compradas da Abcam (Cambridge, Reino Unido), com exceção do citocromo C, que foi comprado da Abclonal (Massachusetts, EUA).

e. Outros marcadores séricos

Também foram avaliados, através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA), os seguintes marcadores séricos: receptor de produtos de glicação avançada (RAGE) (ab309111), angiopoietina(Ang)-2 (ab99971), norepinefrina (ab287789), adiponectina

(ab314604) e leptina (ab179884). Todos foram comprados pela Abcam (Cambridge, Reino Unido).

f. Isolamento e criopreservação de células mononucleares do sangue periférico

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram isoladas por centrifugação em gradiente de densidade utilizando Ficoll-Hypaque (Amersham Bioscience, Sunnyvale, CA, EUA). Após centrifugação a $800 \times g$ durante 30 minutos, a camada de células mononucleares foi recolhida, ressuspendida em solução salina e lavada duas vezes. As células foram então ressuspendidas em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute; Sigma, Missouri, EUA) e criopreservadas a uma concentração de 1×10^6 células/mL em uma solução de congelamento contendo 90% de soro fetal bovino inativado por calor (FBSi; Imunoquímica, Rio de Janeiro, Brasil) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma, Missouri, EUA). As amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido até o uso.

g. Descongelamento celular e análise de viabilidade

As PBMC criopreservadas foram rapidamente descongeladas em banho-maria a 37°C e imediatamente transferidas para tubos contendo meio RPMI 1640 suplementado com 10% de FBSi. A viabilidade celular foi avaliada utilizando o ensaio de exclusão com azul de tripano (Merck Millipore, Massachusetts, EUA).

h. Análise de células progenitoras endoteliais circulantes por citometria de fluxo

As células progenitoras endoteliais (EPC) foram analisadas por citometria de fluxo utilizando os seguintes anticorpos conjugados com fluorocromo: anti-CD34 PerCP-Cy5.5 (RUO), anti-KDR/VEGFR-2 PE (clone 89) e anti-CD45 FITC (clone 2D1), todos obtidos da BD Biosciences (Califórnia, EUA). As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton & Dickinson), com a aquisição de aproximadamente 400.000 eventos, selecionando células CD45-negativas. A aquisição e análise dos dados foram realizadas utilizando o software FlowJo (versão 10.10; Becton Dickinson & Company, CA, EUA). As EPC foram definidas como células CD34⁺/KDR⁺ dentro de um amplo *gating* abrangendo populações de linfócitos e monócitos, restritas à fração de células CD45⁻ (**Figura 8**). A viabilidade celular também será avaliada durante o teste com o kit BD Horizon Fixable Viability Stain 450 (FVS 450).

O resultado foi expresso como uma porcentagem de células CD34⁺/KDR⁺ em relação ao número total de leucócitos.

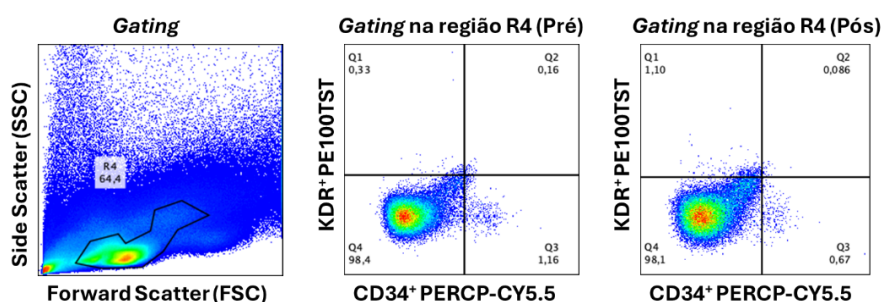


Figura 8. Expressão superficial de CD34⁺/KDR⁺/CD45⁻ de PBMC de um indivíduo.

VI. Análises estatísticas

O cálculo do tamanho amostral foi feito usando como base um estudo que avaliou a quantidade circulante de CD34⁺/KDR⁺ após intervenção com estatinas (104). O número de indivíduos para cada um dos 2 grupos foi de 5 pacientes, totalizando 10 pacientes no estudo, tendo um poder de teste de 0.800 utilizando um nível de significância de $p < 0.05$.

As análises estatísticas foram conduzidas através de testes não-paramétricos por causa do pequeno tamanho amostral. As variáveis foram descritas de acordo com medidas de dispersão central (mediana e intervalo interquartil (IIQ)) para variáveis contínuas e frequência e porcentagem para variáveis categóricas.

As diferenças intragrupos (pré e pós-intervenção) foram avaliadas através do teste pareado de Wilcoxon, e a comparação intergrupos foi realizada através do teste U de Mann-Whitney para grupos independentes usando as variações (deltas – Δ , ou seja, pós – pré) dos parâmetros analisados e as variáveis do tempo basal para verificar diferenças dos efeitos e diferenças basais entre os grupos.

Para verificar o efeito da intervenção nos desfechos e suas associações com covariáveis, regressões lineares múltiplas foram aplicadas utilizando o método de entrada forçada para a covariável categórica “intervenção” (0 = placebo, 1 = resveratrol) e o método *stepwise* para a modelagem com as outras covariáveis. As variáveis dependentes utilizadas foram as variações (Δ) das principais variáveis do estudo, como: SIRT1, SIRT3, CD34⁺/KDR⁺, cIAP2, Bcl-2, survivina, XIAP, caspase 9, caspase 3 e citocromo C. Como variáveis independentes, além de todas as variáveis acima listadas, foram

utilizadas as variáveis: idade; pressões arteriais sistólica e diastólica; frequência cardíaca; LDL-c; HDL-c; triglicérides; glicose; PCRus; %GC; IL-1 β ; IL-6; IL-10; TNF- α ; sTNFR2; S100A12; MMP-9; VEGF; leptina; adiponectina; norepinefrina; GM-CSF; SCF; MCP-1; angiopoietina 2. O modelo final reportado foi selecionado utilizando como critérios o melhor R² ajustado sem grandes diferenças para o R²; o maior valor F da ANOVA; e o limite máximo de 4 variáveis independentes para evitar o *overfitting* e o *underfitting* do modelo.

Posteriormente, foi aplicada uma análise de mediação causal através do método Baron & Kenny (105) para verificar se as variáveis dos modelos de regressão descrito acima atuam como mediadoras do efeito do resveratrol na variável de desfecho do estudo. O efeito direto do resveratrol (c') é o efeito do resveratrol (variável independente, X) sobre o desfecho (variável dependente, Y) obtido em uma regressão linear multivariada com método de entrada forçada utilizando as covariáveis dos modelos reportados anteriormente, representado pelo coeficiente B . Assim, o efeito direto é representado pela seguinte equação:

$$\text{Efeito direto} = X \xrightarrow{c'} Y$$

O efeito direto (c') do resveratrol pode estar sendo mediado por outras variáveis, chamadas de mediadoras (M). As variáveis mediadoras (M) podem exercer um efeito sobre o desfecho (b) e o resveratrol pode modular a variável dependente (Y) através de seu efeito nas variáveis mediadoras (a). Assim, o efeito indireto é representado pela seguinte equação:

$$\text{Efeito indireto} = X \xrightarrow{a} M \xrightarrow{b} Y$$

O efeito do resveratrol (X) sobre as variáveis mediadoras (M) é representado pelo a , sendo o coeficiente B de uma regressão simples com cada variável do modelo (se houver mais de uma possível mediadora, então haverá $a1$, $a2$, etc.). O efeito das possíveis variáveis mediadoras (M) sobre a variável dependente Y é representado pelo b , e este é o coeficiente B das mediadoras (M) obtido na regressão múltipla. Para calcular o efeito indireto do resveratrol, temos a seguinte equação:

$$\textit{Efeito indireto} = a * b$$

Para avaliar a significância do efeito, foi aplicado o teste de Sobel, onde é calculado o valor z, calculado pela seguinte equação:

$$z = \frac{a * b}{\sqrt{b^2 SE_a^2 + a^2 SE_b^2}}$$

Para todas as análises foi utilizado o nível de significância bicaudal $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas através do software SPSS versão 20.0.

4. RESULTADOS

Quatrocentas e noventa e oito pacientes do ambulatório eram elegíveis para o estudo. Destas, 455 apresentaram algum critério de inclusão ou se recusaram a participar do estudo, e as outras 43 pacientes foram incluídas no estudo após assinatura do TCLE. No entanto, 20 pacientes desistiram de participar ou não responderam mais as tentativas de contato para marcar a consulta inicial do estudo. Vinte e três pacientes foram alocadas para os grupos resveratrol ($n = 10$) ou placebo ($n = 13$), porém uma paciente do grupo resveratrol apresentou uma infecção grave e veio a óbito alguns dias depois da primeira consulta e outras duas abandonaram o estudo após o tratamento. Ao todo, 20 pacientes terminaram o estudo, sendo 7 do grupo resveratrol e 13 do grupo placebo (**Figura 1**). Todas as pacientes apresentaram uma adesão ao tratamento superior a 80%.

A maioria das pacientes apresentaram DAC triarterial e comorbidades em ambos os grupos (**Tabela 2**). A dieta e atividade física foram mantidas ao longo do estudo (**Tabela 3**). As características basais não diferiram entre os grupos, com exceção de HDL-c ($p = 0,014$; não mostrado) e S100A12 ($p = 0,024$; não mostrado) (**Tabela 4**).

Ao final do estudo, observou-se um aumento na frequência cardíaca ($p = 0,027$), bem como nas proteínas inibidoras da apoptose sérica cIAP2 ($p = 0,018$) e Bcl-2 ($p = 0,043$) no grupo resveratrol. Embora não tenha havido redução estatisticamente significativa no XIAP ($p = 0,068$) no grupo resveratrol, foi detectada uma diferença significativa entre os grupos nas variações desse marcador ($p = 0,047$), indicando que o resveratrol reduziu os níveis séricos de XIAP significativamente em comparação ao grupo placebo. As variações do VEGF sérico também diferiram significativamente entre os grupos ($p = 0,029$); no entanto, a maioria das medições desse marcador estava abaixo do limite de detecção, dificultando a interpretação do efeito real do resveratrol sobre esse marcador (**Tabela 4**).

O efeito do resveratrol nos desfechos ajustado pelas covariáveis através de modelos de regressão linear múltipla foi avaliado (**Tabela 5**). Não houve efeito significativo do resveratrol na SIRT1 ($p = 0,395$) e SIRT3 séricas ($p = 0,158$). No entanto, a survivina ($p = 0,001$) e a norepinefrina foram preditoras significativas de SIRT1, assim como a XIAP ($p < 0,001$) e a adiponectina ($p = 0,002$) foram preditoras significativas de SIRT3. A intervenção com resveratrol reduziu significativamente as células CD34⁺/KDR⁺

circulantes ($p < 0,001$) quando ajustada para o sTNFR2 ($p < 0,001$), HDL-c ($p = 0,002$) e XIAP ($p = 0,002$). Quanto aos marcadores de apoptose, o resveratrol demonstrou diminuir a caspase 9 sérica ($p = 0,031$) quando ajustada para a proteína C reativa ($p < 0,001$), TNF- α ($p < 0,001$) e idade ($p = 0,001$). Já o efeito do resveratrol na cIAP2 perdeu a significância estatística quando ajustado por Bcl-2 ($p = 0,816$), assim como a Bcl-2, quando ajustado por S100A12, cIAP2 e MCP-1 ($p = 0,991$). Não houve efeito significativo sobre os outros marcadores. Também não foram observados efeitos de mediação estatisticamente significativos em nenhum resultado (**Tabela 6**).

Tabela 2. Características clínicas das participantes.

Variáveis	Placebo (n = 13)		Resveratrol (n = 7)	
	Frequência	%	Frequência	%
Características clínicas				
<i>Classificação da DAC</i>				
Uniarterial	1	7,7	0	0,0
Biarterial	1	7,7	0	0,0
Triarterial	11	84,6	7	100,0
<i>Consumo de álcool</i>	1	7,7	1	14,3
<i>Tabagismo</i>				
Tabagista	3	23,1	2	28,6
Ex-tabagista	2	15,4	2	42,9
<i>Comorbidades</i>				
Doença renal crônica	1	7,7	1	14,3
Artrite reumatóide	1	7,7	0	0,0
Diabetes melito tipo 1	1	7,7	0	0,0
Diabetes melito tipo 2	3	23,1	2	28,6
Insuficiência cardíaca	1	7,7	2	28,6
Lúpus eritematoso sistêmico	0	0,0	1	14,3
Acidente vascular encefálico	1	7,7	1	14,3
Medicações				
<i>Bloqueadores dos canais de cálcio</i>				
Amlodipino	8	61,5	6	85,7
<i>Agentes antiplaquetários</i>				
AAS	12	92,3	7	100,0
Clopidogrel	13	100,0	7	100,0
<i>Beta-bloqueadores</i>				
Carvedilol	3	23,1	1	14,3
Atenolol	9	69,2	5	71,4
Metoprolol	1	7,7	0	0,0
<i>Inibidores da ECA</i>				
Enalapril	3	23,1	3	42,9
<i>BRA</i>				
Losartan	9	69,2	3	42,9
<i>Estatinas</i>				
Atorvastatin	13	100,0	7	100,0
<i>Diuréticos</i>				
Hidroclorotiazida	4	30,8	2	28,6
Clortalidona	1	7,7	0	0,0
Furosemida	1	7,7	1	14,3
Espironolactona	2	15,4	0	0,0
<i>Hipoglicemiantes</i>				
Metformina	6	46,2	5	71,4
Glicazida	5	38,5	5	71,4
Insulina	3	23,1	0	0,0
Dapagliflozina	2	15,4	3	42,9
<i>Vasodilatores</i>				
Propranolol	1	7,7	1	14,3
Dinitrato de isossorbida	4	30,8	1	14,3
Mononitrato de isossorbida	3	23,1	1	14,3
<i>Antilipêmicos</i>				
Ezetimiba	2	15,4	0	0,0
<i>Agonistas alfa-1-adrenérgicos</i>				
Clonidina	1	7,7	0	0,0
<i>Inibidores da bomba de prótons</i>				
Omeprazol	9	69,2	4	57,1
<i>Outras medicações</i>				
Metotrexato	1	7,7	0	0,0
Colchicina	1	7,7	0	0,0
Bromazepam	1	7,7	0	0,0
Amitriptilina	1	7,7	0	0,0
Sertralina	1	7,7	0	0,0
Domperidona	1	7,7	0	0,0
Gabapentina	1	7,7	0	0,0
Paroxetina	1	7,7	0	0,0

Tabela 3. Características nutricionais basais e pós-tratamento.

Variáveis	Placebo (n = 13)						p	Resveratrol (n = 7)						Δ	p
	Basal		Pós-intervenção					Basal		Pós-intervenção					
	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ			
<i>Consumo alimentar</i>															
Energia, kcal/d	1446,0	1124,0	1636,5	1149,0	837,0	1704,0	0,241	1625,0	1455,0	2161,0	1625,0	1257,0	1648,0	0,465	0,688
Proteínas, %kcal	15,2	12,6	18,9	16,7	9,8	27,6	0,333	16,2	10,0	27,2	18,0	9,2	24,4	1,000	0,630
Carboidratos, %kcal	58,1	49,0	64,8	51,7	46,5	66,9	0,878	47,6	40,2	67,2	58,6	51,9	70,6	0,144	0,335
Fibras, g	10,4	7,7	12,7	10,4	8,3	19,8	0,646	16,0	9,7	24,6	15,3	12,3	18,8	1,000	0,840
Lípides, %kcal	28,4	22,7	36,6	25,5	20,9	29,5	0,203	31,0	23,9	42,5	28,0	23,0	28,5	0,273	0,810
Ácidos graxos saturados, %kcal	9,3	7,9	11,4	7,5	6,1	9,4	0,333	10,7	8,8	14,1	9,5	8,5	12,2	0,273	0,748
Ácidos graxos monoinsaturados, %kcal	8,8	5,4	11,0	6,5	3,2	8,7	0,037	10,0	5,9	16,9	7,6	5,9	10,0	0,144	0,748
Ácidos graxos poliinsaturados, %kcal	5,1	2,9	7,8	3,6	1,9	6,2	0,074	5,8	3,6	6,2	3,7	2,2	5,6	0,273	1,000
Ácidos graxos trans, %kcal	0,1	0,0	0,4	0,0	0,0	0,3	0,398	0,1	0,0	0,7	0,1	0,0	0,5	0,715	0,648
<i>Antropometria</i>															
IMC, kg/m ²	30,4	26,1	32,2	30,0	26,7	33,3	0,239	26,0	20,1	27,7	25,5	20,2	27,9	0,396	0,219
Soma das dobras cutâneas, mm	91,0	66,5	105,5	91,0	81,5	113,0	0,421	73,0	41,0	87,0	70,0	48,0	77,0	0,499	0,284
Circunferência de braço, cm	30,0	28,0	32,5	29,0	28,3	33,2	0,937	28,0	25,0	32,3	26,0	24,8	29,0	0,061	0,054
Circunferência de cintura, cm	94,0	84,5	105,5	99,0	91,3	111,0	0,117	82,0	74,0	96,0	82,0	77,5	99,0	0,343	0,578
Circunferência muscular do braço, cm	22,4	21,6	24,7	21,8	20,5	24,6	0,382	21,3	20,1	24,4	20,7	19,7	23,3	0,236	0,578
Massa livre de gordura, kg	43,7	40,3	48,7	42,4	40,3	47,2	0,859	40,0	36,7	40,5	40,2	36,3	41,1	0,866	0,781
Massa de gordura, kg	22,9	19,5	29,5	22,7	21,1	29,5	0,255	20,3	12,9	21,4	18,5	13,5	20,6	0,612	0,250
Gordura corporal, %	35,5	31,2	37,5	35,5	34,0	38,5	0,421	32,5	24,8	34,9	31,9	26,9	33,2	1,000	0,250
<i>Atividade física*</i>															
Sedentário, frequência e %	7,0	53,8		7,0	53,8		N/A	5,0	71,4		5,0	71,4		N/A	N/A
Irregularmente ativo, frequência e %	2,0	15,4		2,0	15,4		N/A	1,0	14,3		1,0	14,3		N/A	N/A
Ativo, frequência e %	4,0	30,8		4,0	30,8		N/A	1,0	14,3		1,0	14,3		N/A	N/A
Muito ativo, frequência e %	0,0	0,0		0,0	0,0		N/A	0,0	0,0		0,0	0,0		N/A	N/A

Tabela 4. Marcadores nos períodos basal e pós-intervenção.

Variáveis	Placebo (n = 13)			Pós-intervenção			p	Resveratrol (n = 7)			Pós-intervenção			p	Δ
	Basal Mediana	IQ		Mediana	IIQ			Basal Mediana	IIQ		Mediana	IIQ			
Idade, anos	69,0	62,0	71,0	N/A	N/A		N/A	72,0	70,0	75,0	N/A	N/A		N/A	N/A
Fatores de risco															
PA sistólica, mmHg	136,0	121,5	142,0	132,0	120,0	153,0	0,609	130,0	126,0	142,0	124,0	117,0	140,0	0,310	0,088
PA diastólica, mmHg	73,0	69,0	82,5	76,0	66,5	83,5	0,929	75,0	68,0	78,0	68,0	50,0	80,0	0,075	0,103
Frequência cardíaca, bpm	64,0	60,5	70,5	64,0	60,5	70,5	0,824	67,0	51,0	73,0	72,0	60,0	78,0	0,027	0,051
Colesterol total, mg/dL	149,0	130,0	200,0	156,0	139,0	195,5	0,600	131,0	121,0	150,0	143,0	125,0	151,0	0,352	0,606
LDL-c, mg/dL	79,0	59,5	107,5	87,0	63,0	110,0	0,861	72,0	50,0	80,0	69,0	58,0	96,0	0,735	0,937
HDL-c, mg/dL	42,0	39,0	48,0	42,0	38,5	49,0	0,937	32,0	31,0	40,0	32,0	28,0	38,0	0,141	0,211
Triglicérides, mg/dL	152,0	93,5	213,0	131,0	99,0	241,0	0,278	138,0	97,0	192,0	183,0	101,0	205,0	0,091	0,552
Glicose, mg/dL	116,0	107,0	142,0	108,0	85,5	124,0	0,530	107,0	90,0	147,0	118,0	86,0	150,0	0,735	0,606
Metabolismo															
Sirtuína 1, ng/mL	0,0013	0,0012	0,0129	0,0012	0,0012	0,0012	0,208	0,0012	0,0012	0,0039	0,0012	0,0012	0,0040	0,180	0,075
Sirtuína 3, ng/mL	1,1	0,9	4,0	1,1	0,8	4,4	0,152	0,9	0,8	1,1	1,0	0,7	1,4	0,735	0,219
sRAGE, pg/mL	839,7	577,3	1146,2	924,7	767,6	1215,0	0,064	841,4	462,6	970,9	706,6	569,0	1280,0	0,735	0,219
Leptina, ng/mL	46,6	3,3	63,7	40,6	4,0	48,9	0,972	3,5	1,4	11,4	2,2	1,5	2,5	0,063	0,143
Adiponectina, µg/mL	7,2	6,1	11,9	7,4	6,3	11,8	0,600	9,9	8,6	13,5	9,7	7,6	11,9	0,091	0,104
Função endotelial e inflamação															
CD34 ⁺ /KDR ⁺ , %	0,19	0,18	0,33	0,24	0,16	0,30	0,254	0,27	0,20	0,34	0,16	0,08	0,27	0,144	0,177
GM-CSF, pg/mL	0,76	0,60	2,79	0,92	0,63	2,53	0,600	0,75	0,71	1,08	0,62	0,49	1,01	0,176	0,452
MMP-9, ng/mL	16,14	9,04	30,28	18,21	9,43	24,46	0,701	10,16	5,45	41,30	13,63	9,02	39,58	0,499	0,322
VEGF, pg/mL	0,85	0,85	1,45	0,85	0,85	0,85	0,273	0,85	0,85	4,88	0,85	0,85	106,40	0,109	0,029
VCAM-1, ng/mL	80,28	71,87	102,62	80,28	72,64	102,62	0,972	102,62	71,57	102,62	78,71	72,25	102,62	0,753	0,751
Norepinefrina, pg/mL	1256,60	1079,05	1526,80	1351,00	1148,40	1560,10	0,422	1315,40	1189,60	1627,80	1283,40	1199,80	1689,40	0,398	0,405
PCRus, mg/L	1,3	0,8	2,1	1,2	0,8	4,4	0,350	1,7	0,7	2,9	1,6	0,9	1,8	0,735	0,405
IL-1β, pg/mL	10,1	3,3	12,8	14,3	8,7	45,3	0,249	12,7	1,4	19,9	10,3	8,4	24,5	0,735	0,663
IL-6, pg/mL	0,4	0,2	5,5	1,6	0,2	4,4	0,721	7,1	0,2	13,2	10,1	0,2	25,8	0,138	0,188
IL-10, pg/mL	6,1	3,1	8,3	1,2	0,0	6,5	0,101	7,6	2,6	9,1	3,0	0,9	7,0	0,866	0,721
TNF-α, pg/mL	19,1	13,2	27,2	22,4	15,6	32,2	0,422	26,6	14,2	37,7	39,0	20,9	49,4	0,128	0,362
MCP-1, pg/mL	93,77	82,87	122,25	100,20	89,44	119,90	0,972	76,45	69,91	105,10	102,60	76,94	118,40	0,499	0,452
Apoptose															
Caspase 3, ng/mL	2,27	1,05	2,96	2,44	1,26	4,71	0,463	2,13	1,31	3,51	1,55	1,41	2,00	0,499	0,285
Caspase 9, ng/mL	0,97	0,72	2,50	1,18	0,34	2,55	0,916	2,64	1,80	3,81	1,79	0,09	5,60	1,000	0,905
Survivin, pg/mL	50,00	36,00	116,50	31,00	22,00	48,50	0,075	45,00	11,00	72,00	32,00	22,00	79,00	0,866	0,143
cIAP2, ng/mL	1,49	0,77	1,99	1,18	0,91	2,01	0,382	1,44	1,00	1,73	1,54	1,02	2,29	0,018	0,552
XIAP, ng/mL	0,23	0,04	5,56	0,62	0,04	10,05	0,214	0,57	0,04	4,82	0,04	0,04	0,05	0,068	0,047
Bcl-2, ng/mL	0,85	0,23	2,63	0,85	0,16	1,76	0,859	0,64	0,33	1,35	1,95	0,52	3,06	0,043	0,062
Citocromo C, pg/mL	3,94	2,00	64,59	2,00	2,00	47,84	0,859	2,00	2,00	46,25	2,00	2,00	32,63	1,000	0,713
sTNFR2, ng/mL	6,56	5,53	7,92	6,55	5,23	8,00	1,000	6,10	4,50	7,86	6,24	4,17	8,00	0,116	0,321
S100A12, pg/mL	1380,80	1018,40	2733,50	856,00	769,44	1565,20	0,087	870,40	751,12	1112,80	900,80	739,28	1384,80	0,612	0,191
Mobilização de células progenitoras															
Angiopietina 2, pg/mL	228,10	202,50	318,60	277,00	207,10	395,15	0,249	301,70	272,90	394,90	332,70	254,30	391,10	0,866	0,322
SCF, pg/mL	165,4	135,6	194,1	148,9	116,9	213,9	0,861	140,8	116,9	195,0	163,1	120,2	213,2	0,310	0,251

Tabela 5. Efeitos do resveratrol nas sirtuínas, EPC e marcadores de apoptose circulantes.

Modelos (Δ das variáveis)	R ² ajustado	B	SE	p	95% IC	
					Menor	Maior
Sirtuína 1, ng/mL	0,739					
Resveratrol		0,00200	0,00300	0,395	-0,003	0,008
Norepinefrina, pg/mL		0,00002	0,00000	0,000	0,000	0,000
Survivina, pg/mL		0,00002	0,00000	0,001	0,000	0,000
Sirtuína 3, ng/mL	0,786					
Resveratrol		-0,557	0,375	0,158	-1,355	0,242
XIAP, ng/mL		-0,143	0,020	0,000	-0,185	-0,101
Adiponectina, μ g/mL		-0,388	0,103	0,002	-0,607	-0,169
CD34⁺/KDR⁺, %	0,994					
Resveratrol		-0,249	0,054	0,000	-0,365	-0,133
sTNFR2, ng/mL		0,143	0,004	0,000	0,135	0,151
HDL-c, mg/dL		-0,030	0,008	0,002	-0,046	-0,013
XIAP, ng/mL		-0,011	0,003	0,002	-0,017	-0,005
cIAP2, ng/mL	0,371					
Resveratrol		-0,042	0,176	0,816	-0,414	0,331
Bcl-2, ng/mL		0,216	0,063	0,003	0,083	0,348
Bcl-2, ng/mL	0,746					
Resveratrol		-0,004	0,367	0,991	-0,786	0,778
S100A12, pg/mL		0,001	0,000	0,001	0,000	0,001
cIAP2, ng/mL		1,549	0,403	0,002	0,689	2,409
MCP-1, pg/mL		0,014	0,005	0,012	0,003	0,024
Survivina, pg/mL	0,834					
Resveratrol		-34,575	53,403	0,527	-148,401	79,251
IL-1 β , pg/mL		-4,815	0,528	0,000	-5,939	-3,690
Leptina, ng/mL		-3,270	0,986	0,005	-5,372	-1,168
Angiopietina 2, pg/mL		-0,659	0,223	0,010	-1,135	-0,183
XIAP, ng/mL	0,818					
Resveratrol		-3,968	1,888	0,053	-7,992	0,055
Sirtuína 3, ng/mL		-5,476	0,641	0,000	-6,842	-4,110
Adiponectina, μ g/mL		-1,880	0,599	0,007	-3,157	-0,603
GM-CSF, pg/mL		2,081	0,879	0,032	0,207	3,956
Caspase 9, ng/mL	0,787					
Resveratrol		-7,152	3,003	0,031	-13,554	-0,751
Proteína C-reativa, mg/L		8,320	1,007	0,000	6,175	10,465
TNF- α , pg/mL		0,321	0,052	0,000	0,211	0,432
idade, anos		1,033	0,255	0,001	0,489	1,577
Caspase 3, ng/mL	0,021					
Resveratrol		-1,225	1,031	0,250	-3,390	0,941
Citocromo C, pg/mL	0,424					
Resveratrol		18,913	18,663	0,326	-20,650	58,477
Gordura corporal, %		14,789	4,497	0,005	5,256	24,321
Sirtuína 1, ng/mL		-2041,741	902,627	0,038	-3955,224	-128,257

Tabela 6. Análise de mediação.

Modelos (Δ das variáveis)	Efeito direto (c')	a	SE _a	b	SE _b	Efeito indireto (a*b)	Z de Sobel	p
Sirtuína 1, ng/mL								
Resveratrol	0,002	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Norepinefrina, pg/mL		117,941	207,562	0,000016	0,000	0,001848	0,547	0,585
Survivina, pg/mL		108,630	126,715	0,000019	0,000	0,002013	0,789	0,430
Sirtuína 3, ng/mL								
Resveratrol	-0,557	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
XIAP, ng/mL		-5,893	3,992	-0,143	0,019	0,843	1,449	0,147
Adiponectina, µg/mL		-1,172	0,764	-0,388	0,100	0,455	1,423	0,154
CD34⁺/KDR⁺, %								
Resveratrol	-0,249	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
sTNFR2, ng/mL		-2,732	4,301	0,143	0,004	-0,391	-0,635	0,525
HDL-c, mg/dL		-2,516	2,025	-0,030	0,007	0,075	1,242	0,214
XIAP, ng/mL		-5,893	3,992	-0,011	0,003	0,065	1,369	0,171
cIAP2, ng/mL								
Resveratrol	-0,042	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Bcl-2, ng/mL		1,090	0,610	0,216	0,063	0,235	1,585	0,113
Bcl-2, ng/mL								
Resveratrol	-0,004	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
S100A12, pg/mL		1023,896	604,395	0,001	0,000	1,024	1,670	0,095
cIAP2, ng/mL		0,193	0,206	1,549	0,403	0,299	0,910	0,363
MCP-1, pg/mL		17,264	16,485	0,014	0,005	0,242	0,981	0,327
Survivina, pg/mL								
Resveratrol	-34,575	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
IL-1β, pg/mL		-22,802	24,843	-4,815	0,528	109,792	0,913	0,361
Leptina, ng/mL		-6,995	12,419	-3,270	0,986	22,874	0,555	0,579
Angiopietina 2, pg/mL		-16,007	59,426	-0,659	0,223	10,549	0,268	0,789
XIAP, ng/mL								
Resveratrol	-3,968	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Sirtuína 3, ng/mL		0,740	0,698	-5,476	0,641	-4,052	-1,052	0,298
Adiponectina, µg/mL		-1,172	0,764	-1,880	0,599	2,203	1,378	0,168
GM-CSF, pg/mL		-0,037	0,484	2,081	0,879	-0,077	0,076	0,939
Caspase 9, ng/mL								
Resveratrol	-7,152	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Proteína C-reativa, mg/L		-0,885	0,852	8,320	1,007	-7,363	-1,031	0,303
TNF-α, pg/mL		28,819	16,510	0,321	0,052	9,251	1,779	0,075
idade, anos		N/A	N/A	1,033	0,255	N/A	N/A	N/A
Caspase 3, ng/mL								
Resveratrol	-1,225	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Citocromo C, pg/mL								
Resveratrol	18,913	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Gordura corporal, %		-0,854	0,919	14,789	4,497	-12,630	-0,894	0,371
Sirtuína 1, ng/mL		0,006	0,005	-2041,741	902,627	-12,250	-1,060	0,289

5. DISCUSSÃO

Esse foi o primeiro estudo que avaliou os efeitos do resveratrol em múltiplos biomarcadores de apoptose circulantes e EPC para o tratamento da DAC em mulheres na pós-menopausa em um contexto de pesquisa clínica. O principal achado do estudo foi que o resveratrol aumentou a concentração de biomarcadores anti-apoptóticos (Bcl-2 e cIAP2) e reduziu a concentração de caspase 9 e as EPC circulantes em mulheres na pós-menopausa com DAC.

I. Marcadores de apoptose

Em estágios avançados da aterosclerose, a inflamação e a apoptose das células endoteliais e CMLV contribuem para o aumento do risco de ruptura da placa (17). Foi demonstrado anteriormente que a capa fibrosa e o núcleo necrótico das artérias carótidas de placas de pacientes sintomáticos apresentavam maior expressão de caspase 3 e menores quantidades de CMLV em comparação com pacientes assintomáticos, sugerindo que o aumento da apoptose leva ao aumento da gravidade da aterosclerose (38). Além disso, os resultados do mesmo estudo mostraram que as placas de pacientes sintomáticos apresentavam maior expressão de cIAP2, XIAP e survivina, sugerindo um mecanismo de defesa para estabilizar a placa e prevenir eventos coronários agudos, uma vez que essas proteínas inibem a atividade das caspases 3, 7 e 9 (38). Estudos em modelos animais mostraram que a superexpressão das proteínas anti-apoptóticas cIAP2 e Bcl-2 protegeu o tecido cardíaco contra lesões de I/R e inibiu a apoptose de cardiomiócitos, reduzindo tamanho do infarto e tendo uma melhor recuperação após a oclusão da artéria coronária (106,107). Além disso, a apoptose induzida pelo IAM é caracterizada pela redução da expressão de Bcl-2 e pelo aumento da expressão de Bax, demonstrando a importância do Bcl-2 na proteção contra lesões cardíacas (15). A homeostase endotelial também é afetada pelas IAP e pelo Bcl-2. Foi demonstrado que as células endoteliais submetidas à hipóxia aumentaram a expressão cIAP2 devido ao estresse, impedindo a apoptose, e que a utilização de um agonista para aumentar a expressão da proteína levou à diminuição da atividade da caspase 3 e à sobrevivência das células endoteliais (108,109). O Bcl-2 tem um efeito anti-apoptótico nas células endoteliais devido aos seus mecanismos de inibição da liberação do citocromo C, de aumento da expressão de survivina e os próprios efeitos antioxidantes da Bcl-2 (110–113). A XIAP e a survivina também têm sido implicados na

inibição da apoptose nas células endoteliais, indicando um potencial efeito protetor vascular (112,114–116).

O presente estudo mostrou que o tratamento com resveratrol em mulheres na pós-menopausa com DAC aumentou as concentrações séricas de duas proteínas inibidoras da apoptose, cIAP2 e Bcl-2, sugerindo um impacto cardioprotetor. Além disso, essas duas proteínas circulantes foram associadas entre si na análise multivariada, sugerindo uma conexão fisiológica entre as concentrações séricas de ambas. Além disso, MCP-1 e S100A12, marcadores de disfunção endotelial e dano celular, respectivamente, foram preditores significativos do aumento de Bcl-2 no presente estudo, indicando que o aumento nos níveis de marcadores anti-apoptóticos poderia ser um mecanismo de defesa que contribui para manter a homeostase endotelial (110–113). Também é importante observar que, no presente estudo, houve redução na caspase 9 sérica no grupo resveratrol, sugerindo, juntamente com o aumento dos níveis de cIAP2 e Bcl-2, um efeito anti-apoptótico sistêmico. Além disso, a idade e biomarcadores inflamatórios, como CRP e TNF- α , foram preditores significativos da caspase 9 sérica, embora a intervenção não tenha afetado significativamente essas moléculas relacionadas à inflamação. Isso indica que a resposta inflamatória aumenta a sinalização na via intrínseca da apoptose e que a suplementação com altas doses de resveratrol pode regular negativamente essa via em mulheres com CAD, o que poderia ser cardioprotetor. Estudos laboratoriais prévios mostraram que o resveratrol reduziu a apoptose das células endoteliais (117–122). Ao diminuir a sinalização da apoptose, o resveratrol tem demonstrado reduzir os danos causados pela isquemia-reperfusão no tecido cardíaco e diminuir a formação de detritos apoptóticos, facilitando e aumentando a eferocitose (123). Apesar dos resultados do presente estudo, não foram encontrados estudos clínicos anteriores que avaliassem os efeitos do resveratrol nos marcadores circulantes de apoptose, com exceção de um que mostrou que o resveratrol reduziu a citoqueratina-18 M30 – um marcador de apoptose hepatocelular – em pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), e que também foi associado à redução da ecogenicidade do tecido hepático, sugerindo um melhor resultado clínico (124). Outros estudos mostraram que o aumento dos biomarcadores de apoptose circulantes, como Fas e seu ligante FasL, estava associado a grupos de fatores de risco cardiometabólicos (32), *strain* ventricular esquerdo prejudicado (34), IAM e angina pectoris (33) e aumento do risco cardiovascular (31), indicando que a redução de biomarcadores pró-apoptóticos, ou mesmo o aumento de biomarcadores

antiapoptóticos, poderia estar associada à redução do risco. Por outro lado, o presente estudo não avaliou o Fas e o FasL circulantes.

Os mecanismos pelos quais o resveratrol inibe a apoptose são a ativação da via AMPK/SIRT1/PGC-1 α (117), o aumento das atividades da SOD2 e do conteúdo de glutathiona (GSH) (118,120,125), a regulação dos níveis de espécies reativas de oxigênio mitocondriais pela ativação da SIRT3 (120) e a inibição da ativação do NF- κ B, atividade da NADPH oxidase e consequente inibição da produção de espécies reativas de oxigênio (122). Embora tenha sido demonstrado anteriormente que o resveratrol inibe a caspase 3 (125), no presente estudo não foi observado nenhum efeito nos níveis séricos. Além disso, não foi observado nenhum efeito no citocromo C circulante, um marcador relatado de permeabilização da membrana externa mitocondrial que é desencadeado pela via intrínseca da apoptose (126). Ainda assim, a caspase 3 efetora é ativada pelo apoptossoma, que é um complexo formado pelo citocromo C, pelo fator 1 ativador de protease apoptótica (APAF-1) e pela caspase 9 iniciadora, cuja redução pode afetar a formação do complexo (126). Outro achado relevante foi a redução do XIAP no grupo do resveratrol. Dados da literatura sugerem uma interação entre IAPs, pois um mecanismo compensatório de regulação positiva do cIAP2 foi encontrado em camundongos com deficiência de XIAP (127), o que poderia explicar a redução do XIAP concomitantemente com um aumento do cIAP2 encontrado no presente estudo. Além disso, a afinidade farmacológica do resveratrol pelas IAP pode diferir, sugerindo uma maior seletividade para o cIAP2 e o Bcl-2 (128).

II. Células progenitoras endoteliais circulantes

A modulação da apoptose das células endoteliais pode afetar células-chave da homeostase endotelial, como as EPC. Após ajustes estatísticos, os resultados do estudo mostraram que a intervenção com resveratrol reduziu significativamente os níveis de EPC. Este foi um resultado inesperado, uma vez que níveis mais elevados de EPC circulantes têm sido associados a uma melhor função endotelial (45) e os dados na literatura sugerem que o resveratrol melhora as funções endotelial e vascular (72,91–93,129). No entanto, é relevante considerar diversos fenótipos de EPC para interpretação. Quando isoladas pela primeira vez de PBMC por Asahara *et al.*, as EPC foram identificadas como CD34⁺/KDR⁺ e descritas como células imaturas circulantes relevantes na angiogênese pós-natal ou no reparo vascular por meio do recrutamento de EPC

circulantes e subsequente reendotelização (130). No entanto, ainda se discute se as EPC circulantes ou locais do tecido são as principais participantes da regeneração vascular e quais proteínas de superfície devem ser usadas para classificar as EPC (131). Apesar disso, diversos estudos mostraram que números mais elevados de EPC circulantes têm sido associados a uma melhor função endotelial e menor risco cardiovascular (45–48).

A proteção cardiovascular encontrada em mulheres no período fértil tem sido atribuída aos efeitos do estrogênio no recrutamento e na função das EPC, incluindo aumento da proliferação, angiogênese e síntese de NO (132,133). Estudos mostram que mulheres na pós-menopausa apresentam mais EPC que homens, e que a quantidade se encontra reduzida em mulheres com DAC (54). Por outro lado, foi demonstrado que a quantidade de EPC aumentam acentuadamente após o infarto agudo do miocárdio (IAM), embora não atinjam a mesma quantidade que em indivíduos saudáveis (134). Outro estudo mostrou que as EPC circulantes eram mais elevadas em indivíduos com DAC selecionados para revascularização de acordo com a gravidade da doença (135). Como mencionado anteriormente, a contagem de EPC aumenta com a gravidade da doença, possivelmente como um mecanismo de reparo desencadeado por danos endoteliais. Assim, considerando que no presente estudo a maioria dos participantes tinha DAC triarterial, é plausível que uma redução na disfunção e nos danos endoteliais cause uma diminuição na mobilização das EPC, levando a uma redução na contagem circulante. No entanto, não se observou diferenças significativas no marcador de mobilização SCF.

Considerando os resultados relatados sobre biomarcadores de apoptose, esperava-se um aumento na contagem de EPC devido à inibição da apoptose. Entretanto, outras interpretações também são possíveis. Os corpos apoptóticos das células endoteliais e as alarminas secretadas pelas células mortas induzem a proliferação, mobilização e recrutamento das EPC, e a inibição da apoptose nas células endoteliais maduras poderia diminuir a sinalização de mobilização das EPC, reduzindo consequentemente sua contagem circulante, conforme relatado anteriormente (136,137). Apesar disso, nos resultados do presente estudo, os níveis circulantes de S100A12 e seu receptor solúvel sRAGE, respectivamente uma alarmina e um receptor solúvel, não se alteraram com a intervenção do resveratrol. Uma explicação alternativa para a redução das EPC circulantes após o tratamento com resveratrol é a ocorrência de um aumento da endotelização para reparação endotelial, uma vez que se demonstrou que o polifenol

aumenta a proliferação, adesão e migração das EPC de forma dependente da dose (138). A hipótese de que a contagem de EPC muda devido à mobilização para tecidos danificados para endotelização também foi sugerida em um estudo que mostrou que pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e disfunção endotelial reduziram as EPC circulantes após o tratamento com exercícios, bem como melhoraram a função endotelial, marcada pelo aumento do índice de hiperemia reativa (139). Outro estudo mostrou que a histerectomia em ratas resultou em um aumento nas EPC circulantes, sugerindo que a remoção do órgão-alvo impediu que as EPC circulantes fossem recrutadas para locais de regeneração/remodelação endometrial, aumentando assim sua contagem circulante (133).

III. Forças e limitações do estudo

O presente estudo tem limitações. Primeiramente, foram avaliados apenas biomarcadores circulantes, o que dificulta a compreensão dos efeitos intracelulares da intervenção. No entanto, esta abordagem reflete alterações sistêmicas, em vez de alterações em células específicas. Estudos anteriores também mostraram alterações em biomarcadores circulantes comuns, como a SIRT1 (60,72,78,140). Segundamente, o presente estudo não avaliou a dilatação mediada pelo fluxo para refletir a função endotelial devido à impraticabilidade e ao alto custo do projeto, mas foram medidos biomarcadores circulantes da função endotelial. Por fim, embora quantidades maiores de EPC estejam associadas a maior cardioproteção, isso não implica necessariamente maior reparo endotelial, uma vez que a adesão ao local lesionado leva a uma redução nos números circulantes (139), o que foi observado no presente estudo, dificultando tirar conclusões sobre o efeito do resveratrol na homeostase endotelial no contexto da DAC. Entretanto, uma força do estudo é que vários biomarcadores relacionados à inflamação, apoptose, função endotelial e mecanismos de ação do resveratrol foram analisados. No entanto, estudos futuros devem avaliar como as EPC se comportam na DAC juntamente com marcadores da função endotelial e estresse oxidativo.

6. CONCLUSÕES

Os principais resultados do estudo mostraram que o resveratrol aumentou as proteínas anti-apoptóticas em mulheres na pós-menopausa com DAC crônica, sugerindo um potencial efeito benéfico na homeostase endotelial, provavelmente não relacionado com a SIRT1 e a SIRT3 circulantes. No entanto, o tratamento com resveratrol reduziu as EPC circulantes, o que pode ser devido à redução dos estímulos de mobilização das EPC secundários ao aumento da sinalização anti-apoptótica endotelial ou devido ao aumento da endotelização das EPC, induzindo a regeneração endotelial.

7. SUPORTE FINANCEIRO

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), nas modalidades Auxílio a Pesquisa Regular, de número 2022/00823-6, e Bolsa de Doutorado, de número 2022/08606-4.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ministério da Saúde. Mortalidade proporcional por grupos de causas em mulheres no Brasil em 2010 e 2019. *Bol Epidemiológico*. 2021;52(29):14–5.
2. Mensah GA, Fuster V, Murray CJL, Roth GA. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risks, 1990-2022. *J Am Coll Cardiol*. 2023;82(25):2350–473.
3. Demirovic J, Sprafka JM, Folsom AR, Laitinen D, Blackburn H. Menopause and Serum Cholesterol: Differences between Blacks and Whites. *Am J Epidemiol*. 1992;136(2):155–64.
4. Mendelsohn M, Karas R. The Protective Effects of Estrogen on the Cardiovascular System. *N Engl J Med*. 1999;340(23):1801–11.
5. Mehilli J, Presbitero P. Coronary artery disease and acute coronary syndrome in women. *Heart*. 2020;106(7):487–92.
6. Lerner DJ, Kannel WB. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: A 26-year follow-up of the Framingham population. *Am Heart J*. 1986;111(2):383–90.
7. Merz AA, Cheng S. Sex differences in cardiovascular ageing. *Heart*. 2016;102(11):825–31.
8. Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, et al. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *J Am Med Assoc*. 1998;280(7):605–13.
9. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: Principal results from the women’s health initiative randomized controlled trial. *J Am Med Assoc*. 2002;288(3):321–33.
10. Banks AD. Women and Heart Disease: Missed Opportunities. *J Midwifery Women’s Heal*. 2008;53(5):430–9.
11. Lee Y, Gustafsson ÅB. Role of apoptosis in cardiovascular disease. *Apoptosis*.

- 2009;14(4):536–48.
12. Hrdinka M, Yabal M. Inhibitor of apoptosis proteins in human health and disease. *Genes Immun.* 2019;20(8):641–50.
 13. Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, et al. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med.* 1996;335:1182–9.
 14. Olivetti G, Quaini F, Sala R, Lagrasta C, Corradi D, Bonacina E, et al. Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28(9):2005–16.
 15. Cheng W, Kajstura J, Nitahara JA, Li B, Reiss K, Liu Y, et al. Programmed myocyte cell death affects the viable myocardium after infarction in rats. *Exp Cell Res.* 1996;226(2):316–27.
 16. Del Re DP, Amgalan D, Linkermann A, Liu Q, Kitsis RN. Fundamental mechanisms of regulated cell death and implications for heart disease. *Physiol Rev* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2020 Nov 20];99(4):1765–817. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31364924/>
 17. Adkar SS, Leeper NJ. Efferocytosis in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* [Internet]. 2024;21(11):762–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41569-024-01037-7>
 18. Yin C, Heit B. Cellular Responses to the Efferocytosis of Apoptotic Cells. *Front Immunol.* 2021;12(April):1–12.
 19. Geng YJ, Libby P. Progression of atheroma: A struggle between death and procreation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 Sep;22(9):1370–80.
 20. Teringova E, Tousek P. Apoptosis in ischemic heart disease. *J Transl Med.* 2017 May 1;15(1).
 21. Ni D, Lei C, Liu M, Peng J, Yi G, Mo Z. Cell death in atherosclerosis. *Cell Cycle.*

2024;23(5):495–518.

22. Duan H, Zhang Q, Liu J, Li R, Wang D, Peng W, et al. Suppression of apoptosis in vascular endothelial cell, the promising way for natural medicines to treat atherosclerosis. *Pharmacol Res* [Internet]. 2021;168(March):105599. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105599>
23. Wolf MP, Hunziker P. Atherosclerosis: Insights into Vascular Pathobiology and Outlook to Novel Treatments. *J Cardiovasc Transl Res*. 2020;13(5):744–57.
24. Altabas V, Biloš LSK. The Role of Endothelial Progenitor Cells in Atherosclerosis and Impact of Anti-Lipemic Treatments on Endothelial Repair. *Int J Mol Sci*. 2022;23:2663.
25. Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Caspases - An update. *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol*. 2008;151(1):10–27.
26. Mohamed MS, Bishr MK, Almutairi FM, Ali AG. Inhibitors of apoptosis: clinical implications in cancer. *Apoptosis*. 2017;22(12):1487–509.
27. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: Blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(6):401–10.
28. Finlay D, Teriete P, Vamos M, Cosford NDP, Vuori K. Inducing death in tumor cells: Roles of the inhibitor of apoptosis proteins. *F1000Research*. 2017;6:1–19.
29. Mayer BA, Rehberg M, Erhardt A, Wolf A, Reichel CA, Kracht M, et al. Inhibitor of apoptosis proteins as novel targets in inflammatory processes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 Oct;31(10):2240–50.
30. Sleiman L, Beanlands R, Hasu M, Thabet M, Norgaard A, Chen YX, et al. Loss of cellular inhibitor of apoptosis protein 2 reduces atherosclerosis in atherogenic apoe^{-/-} C57BL/6 mice on high-fat diet. *J Am Heart Assoc*. 2013;2(5):1–11.
31. Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, De Teresa E, Farsang C, Gaw A, Gensini G, et al. Increased soluble Fas plasma levels in subjects at high cardiovascular risk: Atorvastatin on inflammatory markers (AIM) study, a substudy of ACTFAST.

- Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007;27(1):168–74.
32. Tamakoshi A, Suzuki K, Lin Y, Ito Y, Yagyu K, Kikuchi S, et al. Relationship of sFas with metabolic risk factors and their clusters. *Eur J Clin Invest*. 2010;40(6):527–33.
 33. Shimizu M, Fukuo K, Nagata S, Suhara T, Okuro M, Fujii K, et al. Increased plasma levels of the soluble form of Fas ligand in patients with acute myocardial infarction and unstable angina pectoris. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2002;39(4):585–90. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097\(01\)01800-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097(01)01800-9)
 34. Ikonomidis I, Tzortzis S, Lekakis J, Paraskevaïdis I, Dasou P, Parissis J, et al. Association of soluble apoptotic markers with impaired left ventricular deformation in patients with rheumatoid arthritis. Effects of inhibition of interleukin-1 activity by anakinra. *Thromb Haemost*. 2011;106(5):959–67.
 35. Adamopoulos S, Parissis J, Karatzas D, Kroupis C, Georgiadis M, Karavolias G, et al. Physical training modulates proinflammatory cytokines and the soluble Fas/soluble Fas ligand system in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2002;39(4):653–63. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097\(01\)01795-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097(01)01795-8)
 36. Christodoulakos GE, Lambrinouadaki I V., Creatsa MG, Economou E V., Siasou Z, Panoulis CP, et al. Circulating levels of atherogenesis-associated adipocytokines and apoptotic markers are differentially influenced by hormone therapy, tibolone and raloxifene in healthy postmenopausal women. *Climacteric*. 2008;11(2):155–65.
 37. Estornes Y, Bertrand MJM. IAPs, regulators of innate immunity and inflammation. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2015;39:106–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcd.2014.03.035>
 38. Moran EP, Agrawal DK. Increased expression of inhibitor of apoptosis proteins in atherosclerotic plaques of symptomatic patients with carotid stenosis. *Exp Mol Pathol*. 2007;83(1):11–6.

39. Pelliccia F, Zimarino M, De Luca G, Viceconte N, Tanzilli G, De Caterina R. Endothelial Progenitor Cells in Coronary Artery Disease: From Bench to Bedside. *Stem Cells Transl Med.* 2022;11(5):451–60.
40. Burger D, Touyz RM. Cellular biomarkers of endothelial health: Microparticles, endothelial progenitor cells, and circulating endothelial cells. *J Am Soc Hypertens* [Internet]. 2012;6(2):85–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jash.2011.11.003>
41. Werling NJ, Thorpe R, Zhao Y. A systematic approach to the establishment and characterization of endothelial progenitor cells for gene therapy. *Hum Gene Ther Methods.* 2013;24(3):171–84.
42. Khan SS, Solomon MA, McCoy JP. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytom Part B - Clin Cytom.* 2005;64(1):1–8.
43. Nova-Lamperti E, Zúñiga F, Ormazábal V, Escudero C, Aguayo C. Vascular Regeneration by Endothelial Progenitor Cells in Health and Diseases. In: *Microcirculation Revisited - From Molecules to Clinical Practice.* 2016. p. 286.
44. Zan T, Li H, Du Z, Gu B, Liu K, Li Q. Enhanced endothelial progenitor cell mobilization and function through direct manipulation of hypoxia inducible factor-1 α . *Cell Biochem Funct.* 2015;33(3):143–9.
45. Hill JM, Zalos G, Halcox JPJ, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, et al. Circulating Endothelial Progenitor Cells, Vascular Function, and Cardiovascular Risk. *N Engl J Med.* 2003;348(7):593–600.
46. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res.* 2001;89(1):1–8.
47. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, et al. Circulating Endothelial Progenitor Cells and Cardiovascular Outcomes. *N Engl J Med.* 2005;353(10):999–1007.

48. Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kämper U, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: Proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation*. 2005;111(22):2981–7.
49. George J, Goldstein E, Abashidze S, Deutsch V, Shmilovich H, Finkelstein A, et al. Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: Association with systemic inflammation. *Eur Heart J*. 2004;25(12):1003–8.
50. Foresta C, Caretta N, Lana A, Cabrelle A, Palù G, Ferlin A. Circulating endothelial progenitor cells in subjects with erectile dysfunction. *Int J Impot Res*. 2005;17(3):288–90.
51. Taguchi A, Matsuyama T, Moriwaki H, Hayashi T, Hayashida K, Nagatsuka K, et al. Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function. *Circulation*. 2004;109(24):2972–5.
52. Ahn CM, Hong SJ, Choi SC, Park JH, Kim JS, Lim DS. Red ginseng extract improves coronary flow reserve and increases absolute numbers of various circulating angiogenic cells in patients with first ST-segment elevation acute myocardial infarction. *Phyther Res*. 2011;25(2):239–49.
53. Grassi D, Draijer R, Schalkwijk C, Desideri G, D'Angeli A, Francavilla S, et al. Black tea increases circulating endothelial progenitor cells and improves flow mediated dilatation counteracting deleterious effects from a fat load in hypertensive patients: A randomized controlled study. *Nutrients*. 2016;8(11):1–11.
54. Pelliccia F, Pasceri V, Cianfrocca C, Vitale C, Meoni G, Pristipino C, et al. Circulating endothelial progenitor cells in postmenopausal women with and without coronary artery disease. *Climacteric*. 2009;12:259–65.
55. Hernández-Saavedra D, Moody L, Xu GB, Chen H, Pan YX. Epigenetic Regulation of Metabolism and Inflammation by Calorie Restriction. *Adv Nutr*. 2019;10(3):520–36.
56. Matsushima S, Sadoshima J. The role of sirtuins in cardiac disease. *Am J Physiol*

- *Hear Circ Physiol.* 2015;309(9):H1375–89.
57. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, et al. Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell.* 2006;127(6):1109–22.
 58. Roggerio A, Cassaro Strunz CM, Pacanaro AP, Leal DP, Takada JY, Avakian SD, et al. Gene expression of sirtuin-1 and endogenous secretory receptor for advanced glycation end products in healthy and slightly overweight subjects after caloric restriction and resveratrol administration. *Nutrients.* 2018;10(7):937.
 59. Mansur AP, Roggerio A, Goes MFS, Avakian SD, Leal DP, Maranhão RC, et al. Serum concentrations and gene expression of sirtuin 1 in healthy and slightly overweight subjects after caloric restriction or resveratrol supplementation: A randomized trial. *Int J Cardiol.* 2017;227:788–94.
 60. Gonçalves GHF, Roggerio A, Goes MF da S, Avakian SD, Leal DP, Strunz CMC, et al. Comparison of Resveratrol Supplementation and Energy Restriction Effects on Sympathetic Nervous System Activity and Vascular Reactivity: A Randomized Clinical Trial. *Molecules.* 2021;26(11):3168.
 61. Guo JM, Shu H, Wang L, Xu JJ, Niu XC, Zhang L. SIRT1-dependent AMPK pathway in the protection of estrogen against ischemic brain injury. *CNS Neurosci Ther.* 2017;23(4):360–9.
 62. Shen T, Ding L, Ruan Y, Qin W, Lin Y, Xi C, et al. SIRT1 functions as an important regulator of estrogen-mediated cardiomyocyte protection in Angiotensin II-induced heart hypertrophy. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014(Article ID 713894).
 63. Arellano MLB de, Pozdniakova S, Köhl AA, Baczko I, Ladilov Y, Regitz-Zagrosek V. Sex differences in the aging human heart: Decreased sirtuins, proinflammatory shift and reduced anti-oxidative defense. *Aging (Albany NY).* 2019;11(7):1918–33.
 64. Zhang W, Huang Q, Zeng Z, Wu J, Zhang Y, Chen Z. Sirt1 Inhibits Oxidative

Stress in Vascular Endothelial Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017.

65. Bai B, Vanhoutte PM, Wang Y. Loss-of-SIRT1 function during vascular ageing: Hyperphosphorylation mediated by cyclin-dependent kinase 5. *Trends Cardiovasc Med* [Internet]. 2014;24(2):81–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcm.2013.07.001>
66. Cheng HL, Mostoslavsky R, Saito S, Manis JP, Gu Y, Patel P, et al. Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(19):10794–9.
67. Li N, Zhao L, Yi-Ming W, Yu YS, Xia CY, Duan JL, et al. Sirt1 hyperexpression in SHR heart related to left ventricular hypertrophy. *Can J Physiol Pharmacol*. 2009;87(1):56–62.
68. Chen Z, Peng IC, Cui X, Li YS, Chien S, Shyy JYJ. Shear stress, SIRT1, and vascular homeostasis. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107(22):10268–73.
69. Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, et al. Stress-Dependent Regulation of FOXO Transcription Factors by the SIRT1 Deacetylase. *Science*. 2004;303(5666):2011–5.
70. Van Der Horst A, Tertoolen LGJ, De Vries-Smits LMM, Frye RA, Medema RH, Burgering BMT. FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2/SIRT1. *J Biol Chem*. 2004;279(28):28873–9.
71. Mattagajasingh I, Kim CS, Naqvi A, Yamamori T, Hoffman TA, Jung SB, et al. SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(37):14855–60.
72. Gonçalves GHF, Kuwabara KL, Faria NF de O, Goes MF da S, Roggerio A, Avakian SD, et al. Sirtuin 1 and Vascular Function in Healthy Women and Men : A Randomized Clinical Trial Comparing the Effects of Energy Restriction and Resveratrol. *Nutrients*. 2023;15:2949.
73. Hijmering ML, Stroes ESG, Olijhoek J, Hutten BA, Blankestijn PJ, Rabelink TJ.

- Sympathetic activation markedly reduces endothelium-dependent, flow-mediated vasodilation. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2002;39(4):683–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097\(01\)01786-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097(01)01786-7)
74. Kaplon RE, Walker AE, Seals DR. Plasma norepinephrine is an independent predictor of vascular endothelial function with aging in healthy women. *J Appl Physiol*. 2011;111(5):1416–21.
 75. Dyson KS, Shoemaker JK, Hughson RL. Effect of acute sympathetic nervous system activation on flow-mediated dilation of brachial artery. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2006;290(4):1446–53.
 76. Venkatasubramanian S, Noh RM, Daga S, Langrish JP, Joshi N V., Mills NL, et al. Cardiovascular effects of a novel SIRT1 activator, SRT2104, in otherwise healthy cigarette smokers. *J Am Heart Assoc*. 2013;2(3):1–11.
 77. Spieker LE, Sudano I, Hürlimann D, Lerch PG, Lang MG, Binggeli C, et al. High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men. *Circulation*. 2002;105(12):1399–402.
 78. Leal DP, Gonçalves GHF, Tavoni TM, Kuwabara KL, Paccanaro AP, Freitas FR, et al. The Interplay of Sirtuin-1, LDL-Cholesterol, and HDL Function: A Randomized Controlled Trial Comparing the Effects of Energy Restriction and Atorvastatin on Women with Premature Coronary Artery Disease. *Antioxidants*. 2022;11(12):2363.
 79. Davidson WS, Gillotte KL, Lund-Katz S, Johnson WJ, Rothblat GH, Phillips MC. The effect of high density lipoprotein phospholipid acyl chain composition on the efflux of cellular free cholesterol. *J Biol Chem* [Internet]. 1995;270(11):5882–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.270.11.5882>
 80. Sola R, Baudet MF, Motta C, Maillé M, Boisnier C, Jacotot B. Effects of dietary fats on the fluidity of human high-density lipoprotein: Influence of the overall composition and phospholipid fatty acids. *Biochim Biophys Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab*. 1990;1043(1):43–51.

81. Fernández-Castillejo S, Rubió L, Hernáez Á, Catalán Ú, Pedret A, Valls R-M, et al. Determinants of HDL Cholesterol Efflux Capacity after Virgin Olive Oil Ingestion: Interrelationships with Fluidity of HDL Monolayer. *Mol Nutr Food Res*. 2017;61:1700445.
82. Vlachopoulos C, Xaplanteris P, Aboyans V, Brodmann M, Cífková R, Cosentino F, et al. The role of vascular biomarkers for primary and secondary prevention. A position paper from the European Society of Cardiology Working Group on peripheral circulation. Endorsed by the Association for Research into Arterial Structure and Physiology (ARTERY. *Atherosclerosis*. 2015;241(2):507–32.
83. Pyo IS, Yun S, Yoon YE, Choi JW, Lee SJ. Mechanisms of aging and the preventive effects of resveratrol on age-related diseases. *Molecules*. 2020;25(20).
84. Repposi G, Das UN, Eynard AR. Molecular Basis of the Beneficial Actions of Resveratrol. *Arch Med Res*. 2020;51(2):105–14.
85. Fu DG. Regulation of redox signalling and autophagy during cardiovascular diseases-role of resveratrol. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(8):1530–6.
86. Das S, Cordis GA, Maulik N, Das DK. Pharmacological preconditioning with resveratrol: Role of CREB-dependent Bcl-2 signaling via adenosine A3 receptor activation. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2005;288(1 57-1):328–35.
87. Gurusamy N, Lekli I, Mukherjee S, Ray D, Ahsan MK, Gherghiceanu M, et al. Cardioprotection by resveratrol: A novel mechanism via autophagy involving the mTORC2 pathway. *Cardiovasc Res*. 2010;86(1):103–12.
88. Chen ML, Yi L, Jin X, Liang XY, Zhou Y, Zhang T, et al. Resveratrol attenuates vascular endothelial inflammation by inducing autophagy through the cAMP signaling pathway. *Autophagy*. 2013;9(12):2033–45.
89. Bonnefont-Rousselot D. Resveratrol and cardiovascular diseases. *Nutrients*. 2016;8(5).
90. Ma HJ, Cao YK, Liu YX, Wang R, Wu YM. Microinjection of resveratrol into rostral ventrolateral medulla decreases sympathetic vasomotor tone through nitric

- oxide and intracellular Ca²⁺ in anesthetized male rats. *Acta Pharmacol Sin* [Internet]. 2008 Aug [cited 2021 Feb 9];29(8):906–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18664323/>
91. Rakici O, Kiziltepe U, Coskun B, Aslamaci S, Akar F. Effects of resveratrol on vascular tone and endothelial function of human saphenous vein and internal mammary artery. *Int J Cardiol*. 2005;105(2):209–15.
 92. Pollack RM, Barzilai N, Anghel V, Kulkarni AS, Golden A, O’Broin P, et al. Resveratrol Improves Vascular Function and Mitochondrial Number but Not Glucose Metabolism in Older Adults. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci*. 2017;72(12):1703–9.
 93. Imamura H, Yamaguchi T, Nagayama D, Saiki A, Shirai K, Tatsuno I. Resveratrol ameliorates arterial stiffness assessed by cardio-ankle vascular index in patients with type 2 diabetes mellitus. *Int Heart J*. 2017 Aug 2;58(4):577–83.
 94. Sahebkar A, Serban C, Ursoniu S, Wong ND, Muntner P, Graham IM, et al. Lack of efficacy of resveratrol on C-reactive protein and selected cardiovascular risk factors - Results from a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Cardiol* [Internet]. 2015;189(1):47–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.04.008>
 95. Haghighatdoost F, Hariri M. Effect of resveratrol on lipid profile: An updated systematic review and meta-analysis on randomized clinical trials. *Pharmacol Res* [Internet]. 2018;129:141–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2017.12.033>
 96. Mousavi SM, Milajerdi A, Sheikhi A, Kord-Varkaneh H, Feinle-Bisset C, Larijani B, et al. Resveratrol supplementation significantly influences obesity measures: a systematic review and dose–response meta-analysis of randomized controlled trials. *Obes Rev*. 2019;20(3):487–98.
 97. Tabrizi R, Tamtaji OR, Lankarani KB, Akbari M, Dadgostar E, Dabbaghmanesh MH, et al. The effects of resveratrol intake on weight loss: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet].

2020;60(3):375–90.

Available

from:

<https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1529654>

98. Philippi ST. Tabela de composição de alimentos: suporte para decisão nutricional - 8ª edição. Barueri: Manole; 2024. 164 p.
99. Durnin JVGA, Womersley J. Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 Years. *Br J Nutr.* 1974;32(01):77–97.
100. Siri WE. Body composition from fluid spaces and density: analysis of methods. 1961. *Nutrition.* 1956;9(5):480–91.
101. Frisancho AR. New norms of upper limb fat and muscle areas for assessment of nutritional status. *Am J Clin Nutr.* 1981;34(11):2540–5.
102. Gonzalez MC, Duarte RRP, Budziareck MB. Adductor pollicis muscle: Reference values of its thickness in a healthy population. *Clin Nutr [Internet].* 2010;29(2):268–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2009.08.012>
103. Matsudo S, Araújo T, Matsudo V, Andrade D, Andrade E, Oliveira LC, et al. International Physical Activity Questionnaire (IPAQ): Study of Validity and Reliability in Brazil. *Atividade Física & Saúde.* 2012;6(2):5–18.
104. Lin LY, Huang CC, Chen JS, Wu TC, Leu HB, Huang PH, et al. Effects of pitavastatin versus atorvastatin on the peripheral endothelial progenitor cells and vascular endothelial growth factor in high-risk patients: A pilot prospective, double-blind, randomized study. *Cardiovasc Diabetol.* 2014;13(1):1–11.
105. Suissa K, Benedetti A, Henderson M, Gray-Donald K, Paradis G. A mediation analysis on the relationship between dietary glycemic load, obesity and cardiovascular risk factors in children. *Int J Obes.* 2022;46(4):774–81.
106. Chen Z, Chua CC, Ho Y-S, Hamdy RC, Chua BHL. Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2001;280:2313–20.

107. Chua CC, Gao J, Ho YS, Xiong Y, Xu X, Chen Z, et al. Overexpression of IAP-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2007 Apr;1773(4):577–83.
108. Wu J, Parungo C, Wu G, Kang PM, Laham RJ, Sellke FW, et al. PR39 Inhibits Apoptosis in Hypoxic Endothelial Cells: Role of Inhibitor Apoptosis Protein-2. *Circulation.* 2004;109(13):1660–7.
109. Dong Z, Venkatachalam MA, Wang J, Patel Y, Saikumar P, Semenza GL, et al. Up-regulation of apoptosis inhibitory protein IAP-2 by hypoxia: HIF-1-independent mechanisms. *J Biol Chem* [Internet]. 2001;276(22):18702–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M011774200>
110. Giuliani A, Cirilli I, Prattichizzo F, Mensà E, Fulgenzi G, Sabbatinelli J, et al. The mitomiR / Bcl - 2 axis affects mitochondrial function and autophagic vacuole formation in senescent endothelial cells. *Aging (Albany NY).* 2018;10(10):2855–73.
111. Cao Y, Jiang Z, Zeng Z, Liu Y, Gu Y, Ji Y, et al. Bcl-2 silencing attenuates hypoxia-induced apoptosis resistance in pulmonary microvascular endothelial cells. *Apoptosis.* 2016;21(1):69–84.
112. Kumar P, Coltas IK, Kumar B, Chepeha DB, Bradford CR, Polverini PJ. Bcl-2 Protects Endothelial Cells against γ -Radiation via a Raf-MEK-ERK-Survivin Signaling Pathway That Is Independent of Cytochrome c Release. *Cancer Res.* 2007;67(3):1193–203.
113. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin X-M, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell.* 1993;75:241–51.
114. Levkau B, Garton KJ, Ferri N, Kloke K, Nofer J-R, Baba HA, et al. xIAP Induces Cell-Cycle Arrest and Activates Nuclear Factor-kB: New Survival Pathways Disabled by Caspase-Mediated Cleavage During Apoptosis of Human Endothelial Cells. *Circ Res.* 2001;88(3):282–90.

115. Liou J, Matijevic-aleksic N, Lee S, Wu KK. Prostacyclin Inhibits Endothelial Cell XIAP Ubiquitination and Degradation. *J Cell Physiol.* 2007;212(3):840–8.
116. Tran J, Rak J, Sheehan C, Saibil SD, Lacasse E, Korneluk RG, et al. Marked Induction of the IAP Family Antiapoptotic Proteins Survivin and XIAP by VEGF in Vascular Endothelial Cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;264:781–8.
117. Li J, Yu S, Ying J, Shi T, Wang P. Resveratrol Prevents ROS-Induced Apoptosis in High Glucose-Treated Retinal Capillary Endothelial Cells via the Activation of AMPK / Sirt1 / PGC-1 α Pathway. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:Article ID 7584691.
118. Liu L, Gu L, Ma Q, Zhu D, Huang X. Resveratrol attenuates hydrogen peroxide-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17:88–94.
119. Ou H, Chou F, Sheen H, Lin T, Yang C-H, Sheu WH-H. Resveratrol , a polyphenolic compound in red wine , protects against oxidized LDL-induced cytotoxicity in endothelial cells. *Clin Chim Acta.* 2006;364:196–204.
120. Zhou X, Chen M, Zeng X, Yang J, Deng H, Yi L, et al. Resveratrol regulates mitochondrial reactive oxygen species homeostasis through Sirt3 signaling pathway in human vascular endothelial cells. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1576.
121. Xia L, Ding F. Resveratrol attenuates apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells induced by high shear stress and proinflammatory factors. *Hum Cell.* 2011;24:127–33.
122. Chen F, Qian L, Deng B, Liu Z, Zhao Y, Le Y. Resveratrol Protects Vascular Endothelial Cells from High Glucose – Induced Apoptosis through Inhibition of NADPH Oxidase Activation – Driven Oxidative Stress. *CNS Neurosci Ther.* 2013;19(9):1–7.
123. Yao X, Liu Y, Mao M, Yang L, Zhan Q, Xiao J. Calorie restriction mimetic, resveratrol, attenuates hepatic ischemia and reperfusion injury through enhancing efferocytosis of macrophages via AMPK/STAT3/S1PR1 pathway. *J Nutr Biochem*

- [Internet]. 2024;126:109587. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2024.109587>
124. Faghihzadeh F, Adibi P, Rafiei R, Hekmatdoost A. Resveratrol supplementation improves inflammatory biomarkers in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr Res* [Internet]. 2014;34(10):837–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2014.09.005>
 125. Losa GA. Resveratrol modulates apoptosis and oxidation in human blood mononuclear cells. *Eur J Clin Invest*. 2003;33:818–23.
 126. D’Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2020 Nov 19];43(6):582–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30958602/>
 127. Harlin H, Reffey SB, Duckett CS, Lindsten T, Thompson CB. Characterization of XIAP-Deficient Mice. *Mol Cell*. 2001;21(10):3604–8.
 128. Ndubaku C, Varfolomeev E, Wang L, Zobel K, Lau K, Elliott LO, et al. Antagonism of c-IAP and XIAP Proteins Is Required for Efficient Induction of Cell Death by Small-Molecule IAP Antagonists. *Am J Chem Biol*. 2007;2(5):337–346.
 129. Xia N, Daiber A, Habermeier A, Closs EI, Thum T, Spanier G, et al. Resveratrol reverses endothelial nitric-oxide synthase uncoupling in apolipoprotein E knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;335(1):149–54.
 130. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, Zee R Van Der, Li T, et al. Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science*. 1997;275(964):964–7.
 131. Zhang M, Malik AB, Rehman J. Endothelial progenitor cells and vascular repair. *Curr Opin Hematol*. 2014;21(3):224–8.
 132. Luo Y, Yan Q, Wu W, Luo F. Decreased Count and Dysfunction of Circulating EPCs in Postmenopausal Hypercholesterolemic Females via Reducing NO Production. *Stem Cells Int*. 2018;2018:Article ID 2543847.

133. Fadini GP, Kreutzenberg S De, Albiero M, Coracina A, Pagnin E, Baesso I, et al. Gender Differences in Endothelial Progenitor Cells and Cardiovascular Risk Profile The Role of Female Estrogens. *Arterioscler Thromb*. 2008;28:997–1004.
134. Grundmann F, Scheid C, Braun D, Zobel C, Reuter H, Schwinger RHG, et al. Differential increase of CD34, KDR/CD34, CD133/CD34 and CD117/CD34 positive cells in peripheral blood of patients with acute myocardial infarction. *Clin Res Cardiol*. 2007;96(9):621–7.
135. Güven H, Shepherd RM, Bach RG, Capoccia BJ, Link DC. The Number of Endothelial Progenitor Cell Colonies in the Blood Is Increased in Patients With Angiographically Significant Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(8):1579–87.
136. Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*. 2004;104(9):2761–6.
137. Chavakis E, Hain A, Vinci M, Carmona G, Bianchi ME, Vajkoczy P, et al. High-mobility group box 1 activates integrin-dependent homing of endothelial progenitor cells. *Circ Res*. 2007;100(2):204–12.
138. Wang X Bin, Huang J, Zou JG, Su E Ben, Shan QJ, Yang ZJ, et al. Effects of resveratrol on number and activity of endothelial progenitor cells from human peripheral blood. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34(11):1109–15.
139. Neunhäuserer D, Patti A, Niederseer D, Kaiser B, Cadamuro J, Lamprecht B, et al. Systemic Inflammation, Vascular Function, and Endothelial Progenitor Cells after an Exercise Training Intervention in COPD. *Am J Med*. 2021;134(3):e171–80.
140. Gonçalves GHF, Nascimento JR de O, Mito BM, Amato RV, Moretti MA, Strunz CMC, et al. Effects of Coffee on Sirtuin-1, Homocysteine, and Cholesterol of Healthy Adults : Does the Coffee Powder Matter ? *J Clin Med*. 2022;11:2985.