

1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento é uma experiência que todo ser humano compartilha, mas nem sempre compreende. Não apenas o entendimento do processo de envelhecimento é fundamental, como também determinar as causas do envelhecimento e intervenções necessárias para o seu adiamento. Do modo mais simples, o envelhecimento é o tempo cronológico de existência desde o nascimento até a morte, sendo tempo e idade relativos sob interpretação. Apesar ser de fácil detecção a idade física, é quase imperceptível aos olhos a idade fisiológica. (SPIRDUSO *et. al.*, 2005)

O envelhecimento populacional é um dos maiores desafios da saúde pública contemporânea. Este fenômeno ocorreu inicialmente em países desenvolvidos, mas, mais recentemente é nos países em desenvolvimento que o envelhecimento da população tem ocorrido de forma mais acentuada. No Brasil, o número de idosos (≥ 60 anos de idade) passou de 3 milhões em 1960, para 7 milhões em 1975 e 14 milhões em 2002 (um aumento de 500% em quarenta anos) e estima-se que alcançará 32 milhões em 2020. Em países como a Bélgica, por exemplo, foram necessários cem anos para que a população idosa dobrasse de tamanho. (LIMA-COSTA & VERAS, 2003)

Com o envelhecimento, a massa de vários sistemas como o muscular, ósseo e cerebral, diminui. Funções fisiológicas como gasto energético total, quantidade espontânea de movimentos, reflexos, tônus e resistência muscular, batimento cardíaco máximo, função cognitiva, e taxa de filtração glomerular diminuem continuamente com o passar dos anos. Menor quantidade e velocidade de movimentos, menor massa muscular, acúmulo de excreções celulares, desorganização nuclear e celular, e enrugamento são características da senescência. (CUMMINGS, 2007) Além do acúmulo progressivo de mudanças deletérias

resultando em declínio funcional e aumento da probabilidade de doenças e morte. (TERMAN *et. al.*, 2006)

A natureza do processo de envelhecimento tem sido passível de inúmeras especulações. Possibilidades sugeridas incluem: mudança no código de DNA, diminuição na acurácia de síntese protéica, ligação de macromoléculas, auto-ataque ao sistema imunológico e danos causados por reações oxidativas. Evidências se acumulam indicando que o envelhecimento e doenças crônicas / degenerativas são causados primariamente devido ao dano gerado pelos radicais livres. (DENHAM, 1981)

Dentre as doenças degenerativas, são destacadas as doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer. O Alzheimer é a forma mais prevalente de demência, uma doença com perda cognitiva que ocorre durante o envelhecimento. A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem degenerativa heterogênea, clinicamente caracterizada por déficits cognitivos irreversíveis e progressivos e alteração de comportamento que afeta a memória, aprendizagem, atividades do dia a dia e qualidade de vida. A prevalência da Doença de Alzheimer é apenas de 1% acima dos 60 anos, mas aumenta dramaticamente para 40% acima do 85 anos de idade. (VAN DER BEEK & KAMOHUIS, 2008)

As vias neurais pertencentes ao sistema colinérgico e suas conexões são preferencialmente atingidas na doença de Alzheimer. As alterações cerebrais características da DA são as placas senis (ou neuríticas) e os emaranhados neurofibrilares. As placas senis resultam do metabolismo anormal da proteína precursora do amilóide (APP), conduzindo à formação de agregados do peptídeo β -amilóide; os emaranhados neurofibrilares formam-se a partir do colapso do citoesqueleto neuronal, decorrente da hiperfosforilação da proteína tau. Estas alterações ocorrem, desde o início da doença, em estruturas do lobo temporal medial, incluindo o hipocampo e o giro para-hipocampal, consideradas estruturas essenciais

para os processos de memória. Com a evolução da doença, o processo degenerativo se espalha para o neocórtex de associação, atingindo áreas cerebrais responsáveis por outros processos cognitivos. (FORLENZA, 2005)

Admite-se que anos antes do início da demência já ocorra deposição de peptídeos - amilóide e seu respectivo acúmulo nas porções mediais dos lobos temporais, comprometendo a neurotransmissão colinérgica. À medida que esse processo evolui, somam-se as reações gliais inflamatórias e oxidativas, além do comprometimento do citoesqueleto, levando à formação dos emaranhados neurofibrilares e à conversão das placas senis em neuríticas. Portanto, paralelamente à progressão do processo patogênico, ocorre conversão do comprometimento cognitivo leve para os estágios iniciais da demência. Na demência moderada e avançada, intensificam-se as perdas neuronais e surgem disfunções sinápticas e neuroquímicas, afetando, sobretudo, os sistemas colinérgico, serotoninérgico e glutamatérgico. Essa heterogeneidade biológica correlaciona-se com o tipo e a intensidade das manifestações psíquicas e cognitivas. (FORLENZA, 2005)

O diagnóstico da doença de Alzheimer consome bastante tempo e requer uma combinação de testes psicológicos, de imagem e exclusão de outras desordens neurológicas. Pacientes com Alzheimer pré-sintomático ou comprometimento cognitivo leve, tem grande risco de desenvolver a doença de Alzheimer em si. É estimado que quando é feito o diagnóstico da doença no paciente, esta já vem progredindo por vários anos, portanto é crucial o diagnóstico mais recente possível. (RAY *et. al.*, 2007)

O maior fator de risco para doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer é o envelhecimento. A mitocôndria, tem sido pensada como fator contribuinte ao envelhecimento pelo acúmulo de DNA mitocondrial e a produção de espécies reativas de

oxigênio. O estresse oxidativo ocorre precocemente antes do estabelecimento das placas patológicas no Alzheimer. Este dano oxidativo e disfunção mitocondrial são grandes contribuintes da doença. Por exemplo: o estresse oxidativo pode ativar sinalizações que alteram o processamento da APP ou da tau e as proteínas relacionadas na patogênese da DA podem ter envolvimento físico direto com a mitocôndria ou proteínas mitocondriais. (LIN & BEAL, 2006)

Três proteínas estão associadas com a herança da Doença de Alzheimer: proteína precursora amilóide (APP) - a qual é clivada sequencialmente por α e γ -secretases para produzir A β e presenilinas 1 e 2 (PS1 e PS2), componentes do complexo γ -secretase. Há extensa literatura sobre o papel da disfunção mitocondrial e danos oxidativos na patogênese da doença de Alzheimer, como dito anteriormente. O estresse oxidativo pode aumentar a expressão de γ -secretase pela ativação da cinase aminoterminal de c-Jun e a p38 Map cinase (MAPK), aumentando a fosforilação da tau pela ativação da quinase glicogênio sintase. A inativação por oxigênio de algumas moléculas críticas pode também ser importante. Em estudo proteômico, a prolil isomerase, PIN1, foi particularmente sensível ao dano oxidativo. PIN1 catalisa mudanças conformacionais em proteínas que afetam o processamento de APP e tau. Knockout em PIN1 aumentaram o processamento amiloidogênico de APP e níveis intracelulares de A β em ratos. (LIN & BEAL, 2006)

Existe, também evidências que o mtDNA (DNA mitocondrial) pode estar envolvido na disfunção mitocondrial vista na doença de Alzheimer. A região controladora de mtDNA mostrou aumento de mutações na DA. O cérebro deste pacientes tem um aumento médio de 63% nas regiões de controle da mutação, e em indivíduos mais velhos que 80 anos houve aumento de 130% nas mutações. Essas mutações preferencialmente alteraram elementos

regulatórios de mtDNA suprimindo transcrição e replicação mitocondrial. (LIN & BEAL, 2006)

Finalmente, alguns estudos recentes sugerem que várias das proteínas implicadas na patogênese da doença de Alzheimer tem envolvimento físico direto com a mitocôndria ou proteínas mitocondriais. APP tem sido demonstrada como influenciadora na importação do maquinário de proteínas mitocondriais causando disfunções mitocondriais e danos ao metabolismo energético. A se liga às proteínas da matriz mitocondrial chamada de A - ligadora de álcool desidrogenase (ABAD). Ao bloquear a interação de A e ABAD com um certo peptídeo, houve supressão da apoptose induzida por A e geração de radicais livres em neurônios. Contrariamente, a super expressão de ABAD em ratos transgênicos com mutação para APP, tiveram exagero no estresse oxidativo e disfunção de memória. Outros grupos também reportaram que A interage com a mitocôndria inibindo a atividade da citocromo oxidase e aumento da geração de radicais livres. A também inibe a atividade da -cetogluturato desidrogenase a qual tem sido observada, junto com a atividade da citocromo oxidase no cérebro e tecidos de pacientes com Alzheimer. (LIN & BEAL, 2006)

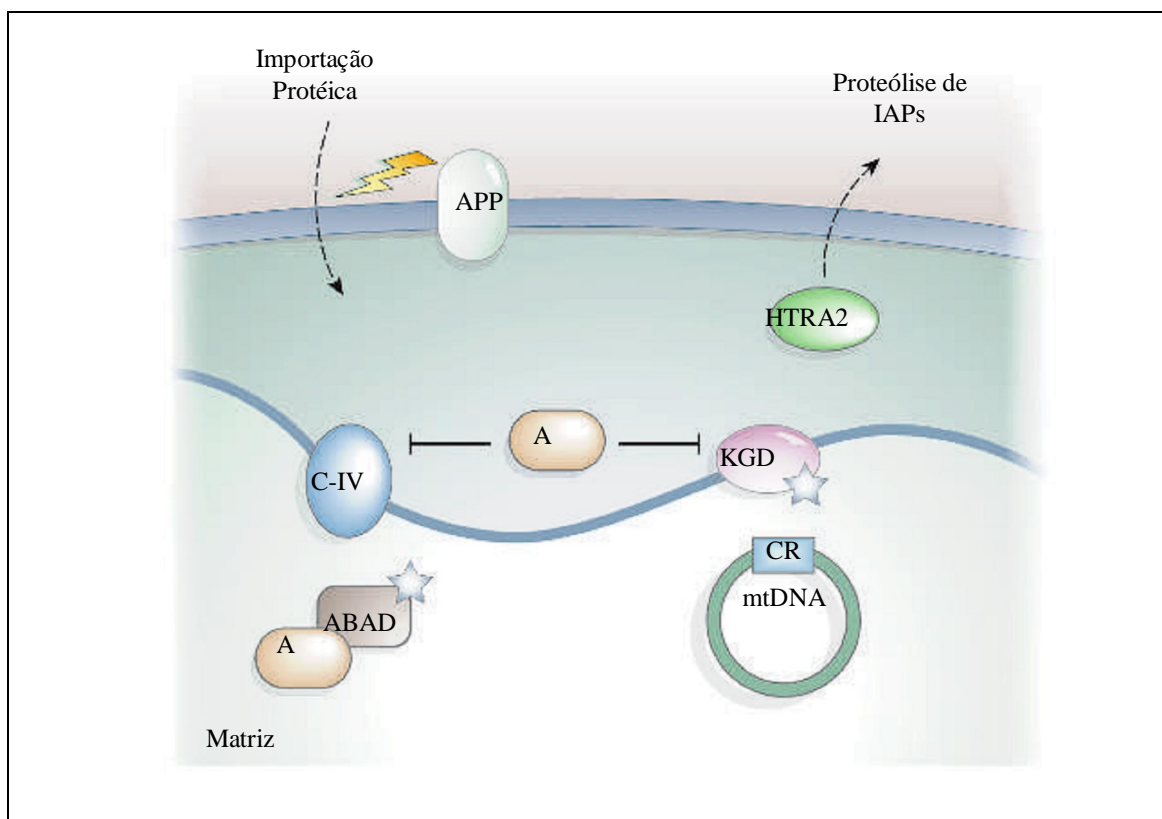


Figura 1. O papel da mitocôndria na Doença de Alzheimer. A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e inibição do metabolismo energético aumentam os níveis de A em células e ratos transgênicos, e A pode interagir com a mitocôndria causando disfunções nesta. A inibe o complexo IV (C-IV) e a -cetoglutarato desidrogenase (KGD), e se liga à A álcool desidrogenase (ABAD). Ambos KGD e ABAD produzem ROS (representado por estrelas brancas). Proteína precursora amilóide (APP) pode ser alvo para interferir com a importação protéica. Mitocôndria também tem sido reportada de conter complexos γ -secretase envolvidos na clivagem de APP para formar A e conter presenilina 1, a qual aumenta a atividade proteolítica de HTRA2 para IAPs. (LIN & BEAL, 2006)

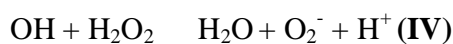
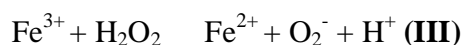
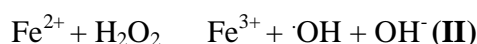
Há apenas vinte anos os radicais livres na forma de espécies reativas de oxigênio (ROS) têm sido reconhecidos como importantes em inúmeros processos patológicos. ROS são moléculas instáveis com elétrons desemparelhados, capazes de iniciar a oxidação. Isto pode resultar na oxidação de proteínas, DNA, e lipídeos que podem causar injúrias teciduais ou desencadear variadas respostas celulares através da geração de espécies reativas secundárias. (KIRKHAM & RAHMAN, 2006)

As espécies reativas de oxigênio podem ser geradas endogenamente por reações metabólicas, como transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial ou durante ativação de fagócitos ou células inflamatórias; e exogenamente através de poluentes e fumaça de cigarro. (KIRKHAM & RAHMAN, 2006)

Um radical livre pode ser definido como qualquer espécie que tem um ou mais elétrons não pareados. Essa ampla definição inclui o átomo de hidrogênio, a maioria dos metais de transição e o próprio oxigênio. Dois estados ôsingletö do oxigênio existem, sendo um deles reativo. Caso um elétron seja adquirido pelo O₂, ele se transforma em radical superóxido (O₂⁻) o qual é formado em quase todas as células aeróbicas, principalmente na fagocitose de antígenos ou imunocomplexos. Outro elétron adquirido pelo O₂⁻, o transforma em O₂⁻², que não é um radical, mas que em pH fisiológico é protonado e transforma em H₂O₂, o peróxido de hidrogênio. (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984)



O peróxido de hidrogênio gera o radical hidroxila ([·]OH) de duas maneiras: a) fusão de O-O e b) e mistura ao ferro (chamada reação de Fenton, descoberta por autor do mesmo nome em 1894); desencadeando várias outras reações:



(HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984)

O acúmulo de espécies reativas por produção exógena ou endógena é chamado de estresse oxidativo, sendo comum para vários tipos de células com perfil redutor deficitário.

Os danos causados por estresse oxidativo são inúmeros: dano às estruturas celulares incluindo lipídeos de membrana, danos aos ácidos nucléicos e às proteínas. (VALKO, *et al.*, 2006)

Muitos pesquisadores acreditam não somente que o estresse oxidativo é a causa subjacente de várias as doenças auto-imunes como também que ele pode ser o responsável por fazer com que o sistema imunológico se agrida. O sistema imune parece ser sensível tanto aos agentes infecciosos como às alterações na homeostase orgânica, como ocorre no estresse. (LEANDRO *et. al.*, 2007)

O sistema imunológico é determinante no combate a microorganismos invasores, na remoção de células mortas e detritos celulares e no estabelecimento da memória imunológica. As células que constituem o sistema imunológico originam-se a partir de células hematopoéticas pluripotentes, localizadas na medula óssea, e as diferenciações posteriores ocorrem não só aí como também em outros locais específicos do organismo. (LEANDRO *et. al.*, 2007)

As principais células que participam do sistema imune são os leucócitos, também chamados de glóbulos brancos do sangue, que são originados na medula óssea e são responsáveis pela destruição de corpos estranhos que invadem nosso organismo. Existem vários tipos de leucócitos, que podem ser classificados de acordo com sua morfologia nuclear: mononucleares (linfócitos T, linfócitos B, células exterminadoras ou *natural killer*, monócitos, macrófagos e células dendríticas) ou polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos, basófilos e mastócitos). (ABBAS *et. al.*, 2005)

Os monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas também podem ser classificados como fagócitos, por serem capazes de fagocitar e destruir antígenos, ou ainda podem ser denominadas células apresentadoras de antígenos, por serem capazes de expor,

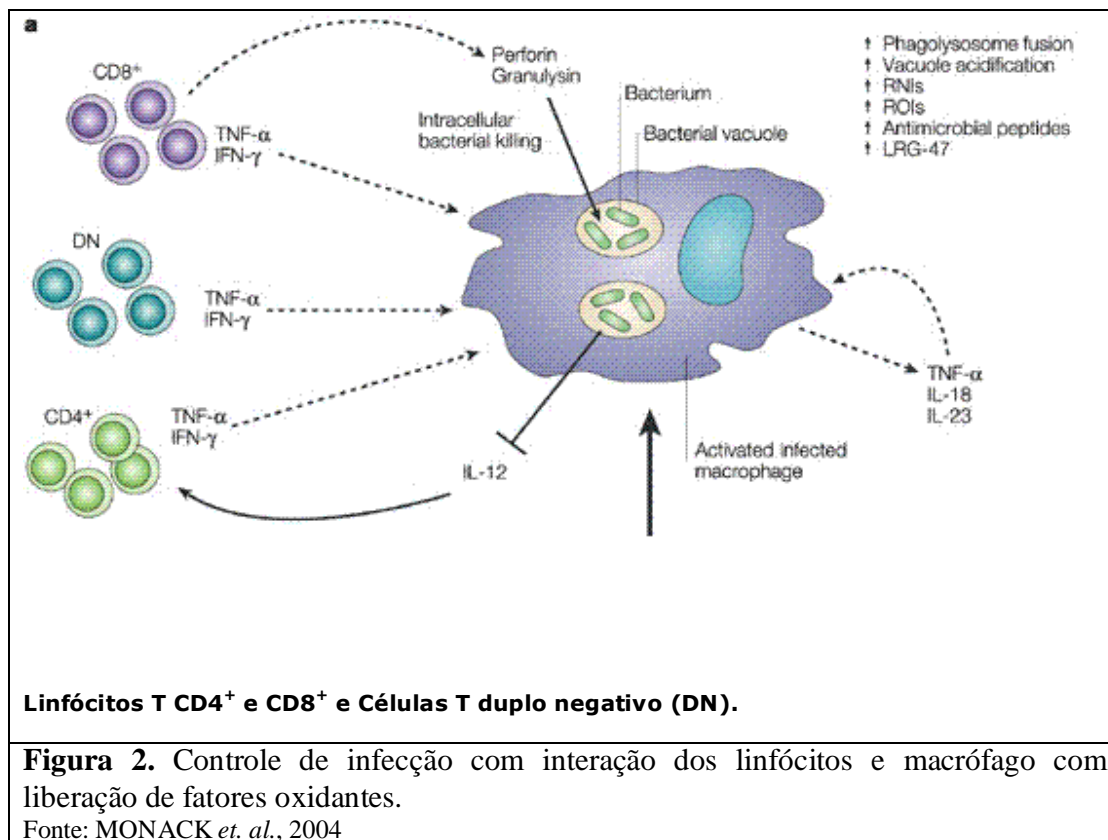
em sua superfície, fragmentos de antígenos fagocitados para serem reconhecidos por linfócitos. Os linfócitos, por sua vez, são as células-chave no controle da resposta imune, e compõem 20% a 30% dos leucócitos circulantes no sangue dos adultos. Divididos em linfócitos T e linfócitos B, são capazes de reconhecer especificamente os antígenos, diferenciando-os dos componentes próprios do organismo. (ABBAS *et. al.*, 2005)

Os linfócitos T podem ser classificados em citotóxicos (CD8) ou auxiliares (CD4). Os linfócitos T citotóxicos são importantes no combate à infecção viral, uma vez que têm a capacidade de reconhecer e destruir células infectadas por vírus. Já os linfócitos T auxiliares exercem papel central no controle e desenvolvimento da resposta imune. Estas células podem ser ativadas pelo reconhecimento de corpos estranhos (antígeno) apresentados por células apresentadoras de antígenos. Após este reconhecimento, os linfócitos são ativados e induzidos a produzir proteínas, como as citocinas, que agem na ativação de outras células do sistema imune. (ABBAS *et. al.*, 2005)

Dentre os componentes do sistema imune ativados pelos linfócitos T auxiliares durante o processo de apresentação de antígenos, destacam-se os linfócitos B. Estas células estão geneticamente programadas para codificar receptores específicos para um determinado antígeno. Uma vez ativadas, as células B produzem e secretam, na forma solúvel, uma enorme quantidade de moléculas receptoras, que são conhecidas como anticorpos ou imunoglobulinas. (ABBAS *et. al.*, 2005)

As células mononucleares, como os linfócitos e monócitos são pré-cursoras de células que geram radicais livres como elas mesmas geram. Os monócitos ativados, essenciais no extermínio de bactérias, devem ser regulados para que não haja excesso na liberação de espécies reativas, e esta regulação é feita pelo balanço de NADPH oxidase e

fatores antioxidantes celulares. Caso ocorra um desequilíbrio, instala-se o processo de estresse oxidativo.(ELBIM *et. al.*, 1999)



O estresse oxidativo se refere a um perigoso desbalanço entre a produção de radicais livres e a defesa antioxidante. É um distúrbio no balanço pro-oxidante / antioxidante levando a um dano potencial. É o dano biomolecular causado por espécies reativas nos constituintes do organismo vivo. (HALLIWELL, 2007)

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos. Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Uma ampla definição de antioxidante é: qualquer substância que, presente em baixas concentrações

quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz. Uma estratégia preventiva antioxidante pode ser arquitetada em canalizar as espécies para produtos menos reativos, diminuindo o risco de danos maiores. (SIES, 1993)

Os antioxidantes podem ser classificados em enzimáticos e não-enzimáticos:

Tabela 1. Defesas antioxidantes nos sistemas biológicos: Lista condensada de compostos e enzimas antioxidantes. Adaptado de SIES, 1993

| Sistema | Observações |
|------------------------------|--|
| Não enzimáticos | |
| ó Tocoferol (Vitamina E) | Quebra de radicais |
| ó Caroteno | Neutralizador de oxigênio ôsingletô |
| Licopeno | Neutralizador de oxigênio ôsingletô |
| Ubiquinol-10 | Varredor de radicais |
| Ascorbato (Vitamina C) | Diversas funções antioxidantes |
| Glutationa (GSH) | Diversas funções antioxidantes |
| Urato | Varredor de radicais |
| Bilirrubina | Antioxidante plasmático |
| Flavonóides | Antioxidante de plantas |
| Proteínas Plasmáticas | Quelador de metais, ex. ceruloplasmina |
| Químicos | Aditivos, fármacos |
| Enzimáticos (Diretos) | |
| Superóxido dismutase | Enzima Cu/Zn, enzima Mn, enzima Fe |
| Glutationa peroxidase | enzimas |
| Catalase | Prtoteína heme, peroxissomos |
| Enzimáticos | |
| Enzimas conjugadas | Glutation-S-transferases |
| NADPH-quinona oxidoreductase | UDP-glucuronosil-transferases |
| GSSG redutase | Manter níveis de GSH |
| NADPH de transporte | NDPH para GSSG redutase |
| | Exportação de GSSG |
| | Exportação de tio-éster (S-conjugado) |
| Sistema reparador | Sistema reparador de DNA |
| | ôturnoverô de proteínas oxidadas |
| | ôturnoverô de fosfolipídeos oxidados |

Atualmente, os cientistas tem centrado no papel que os nutrientes podem desempenhar na manutenção da saúde, mais especificamente, na redução do risco de desenvolvimento de situações crônicas como doenças coronarianas, cardiopatias e determinadas formas de cânceres. Muitas destas investigações tem focado nos nutrientes

que contém vitaminas C, E e beta caroteno (um pré-cursor da vitamina A). (PEREIRA, 2005)

A ação principal da vitamina C é na síntese do colágeno (modernamente sabe-se que age diretamente estimulando a síntese do peptídeo do colágeno), dos proteoglicanos e outros constituintes da matriz intercelular em todos os tecidos do organismo, como o osso, o dente, e o endotélio (revestimento interno) capilar. A vitamina C também tem importância na ativação de uma enzima que age na síntese de alguns hormônios peptídicos, como o hormônio anti-diurético e a oxitocina. Por sua ação na redução da forma férrica do ferro à forma ferrosa, no estômago, aumenta a absorção intestinal do ferro. Embora pouco conhecido, a vitamina C tem efeito na esteroidogênese provocada pelas glândulas adrenais. Facilita a conversão do ácido fólico em ácido folínico, portanto, é um dos fatores importantes para evitar a anemia megaloblástica. Atua no metabolismo da tirosina e da fenilalanina. Aumenta a atividade de enzimas como a desidrogenase succínica e fosfatase sérica em crianças. (PEREIRA, 2005)

A absorção da vitamina C pelo intestino é feita por processo ativo dependente de energia. Esse processo de absorção é saturável e dose dependente. A dose diária recomendada para um adulto em condições normais pelo RDA (Recommended Dietary Allowance), 60 mg, é capaz de manter de manter concentração plasmática de 0.8 mg/dl e um estoque de 1500 mg, bem acima dos 0.15 mg/dl capazes de provocar sinais de escorbuto. Nos fumantes, consumidoras de contraceptivos orais e em algumas doenças infecciosas as doses diárias devem ser aumentadas para 100 mg. Uma pessoa adulta possui 1.5 a 3.0 g de vitamina C no seu organismo; nas dietas deficientes, há perda de até 4% desse total por dia, o que, leva ao escorbuto em uns dois ou três meses ou até menos.

As principais fontes da vitamina C são as frutas cítricas, o melão, a acerola, os tomates, as batatas, os morangos e folhas da couve e de outros vegetais bem verdes (o brócolis na liderança), mas não nas sementes. O fígado, os rins, o leite e os peixes também contêm vitamina C. O leite humano chega a ter 55 mg de vitamina C por litro, na dependência do bom consumo pela mãe. O calor, os álcalis e os oxidantes destroem a vitamina C. (PEREIRA, 2005)

A vitamina C é um potente agente redutor que protege contra a peroxidação lipídica. Oxidação de proteínas, oxidação de DNA, declínio cognitivo e alguns cânceres. No entanto, os dados dos estudos são bastante divergentes e ainda tentam alcançar uma conclusão. (SELMAN *et. al.*, 2006)

Os carotenóides funcionam como pré-cursors da vitamina A, a qual é necessária para boa visão, crescimento, diferenciação celular, morfogênese e várias outras funções celulares e fisiológicas. Os carotenóides são eficientes queladores do oxigênio singlet, extinguem diretamente os radicais livres e inibem a peroxidação lipídica. (ROCK, 1997)

A absorção dos carotenóides ocorre na mucosa intestinal, pelo que parece ser difusão passiva. Em seguida são incorporados por quilomícrons e secretados pela linfa até absorção no intestino. São, então, liberados na circulação em associação com lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e de baixa densidade (LDL). O tecido adiposo e o fígado são os maiores estoques de carotenos no corpo humano, mas ainda encontra-se no pulmão, próstata, rins e outros tecidos. (ROCK, 1997)

Mais de 600 carotenóides foram isolados na natureza, sendo o beta-caroteno, o mais conhecido. Aproximadamente 50 estão na dieta humana e 20 foram identificados no plasma e tecidos. (PATRICK, 2000)

O beta-caroteno tem dois anéis beta, e, como os outros carotenos tem ação de varredura contra os radicais peroxilas. Este é o caroteno mais estudado e mostrou maior ação protetora contra a peroxidação do LDL quando comparado à sua classe. (PAIVA & RUSSELL, 1999)

Por não se considerar suficientes os dados consignados na literatura, não se emitiram DRI (Dietary Reference Intake), ou doses dietéticas recomendadas, nem AI (Adequate Intake), ingestão adequada para beta-caroteno, mesmo na sua atividade pró-vitamínica. A divergência entre alguns estudos também impede a convenção de uma UL (Tolerable Upper Intake Level), nível de ingestão máxima tolerável, para os carotenóides. (AMAYA-FARFAN *et. al.*, 2001)

De acordo com o estudo "The Supplémentation em Vitamines et Minéraux Antioxydants (SU.VI.MAX)", a ingestão de 6 mg de beta-caroteno não alterou a concentração plasmática deste em relação ao grupo controle que ingeria placebo. Homens tiveram uma concentração plasmática por volta de 36 µg/dL e mulheres 25 µg/dL. (HERCBERG *et. al.*, 2004)

A ingestão de beta-caroteno tem sido relacionada com a prevenção de câncer, degeneração macular e doenças cardiovasculares. O beta-caroteno é considerado um potente antioxidante, mas seus efeitos via suplementação são pouco efetivos. (WOODALL *et. al.*, 1997)

Das oito formas de vitamina E existentes, apenas o alfa-tocoferol é mantido no plasma humano. A maior função descrita desta vitamina é a quebra dos radicais livres como antioxidante. Esta é um varredor quando seu grupo fenólico hidroxila reage com o radical peroxil orgânico formando o hidroxiperóxido e o radical tocoferoxil. Este radical, pode, então, ser reduzido por outros antioxidantes, reagir para formar outros produtos e atuar

como pró-oxidante em lipídeos. O alfa-tocoferol também tem funções moleculares ao inibir a atividade da proteína cinase C, envolvida em proliferação e diferenciação celular. (KRINSKY, 2000)

A Vitamina E é absorvida pelo trato gastrointestinal por mecanismos muito provavelmente igual àquele observado com as outras vitaminas lipossolúveis (exemplo: beta-caroteno) e tendo a bile um papel importante. Suas formas esterificadas são hidrolisadas pelas células da parede intestinal, ganham a bile, se associam aos quilomícrons e chegam à circulação sanguínea; no fígado é captada dos restos dos quilomícrons, secretada fazendo parte das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e logo associa-se a lipoproteína plasmáticas sendo distribuída a todos os tecidos. Os estoques, principalmente do fígado e tecido adiposo, constituem fontes por longo tempo da vitamina E. As principais fontes são os vegetais, principalmente aqueles ricos em óleos e nos folhosos, nos cereais, e produtos integrais. (PEREIRA, 2005)

Resumindo:

Tabela 2. Correlação entre doses das vitaminas C, alfa-tocoferol e beta-caroteno.

| | Dose recomendada | Equivalente | Doses Antioxidantes | Dose Suplementada |
|--------------------------------------|-------------------------|--|----------------------------|--------------------------|
| Vit. C | 60 mg | 200 mL suco de laranja | 200 ó 300 mg | 1 ó 2 g |
| α-tocoferol | 10 mg | 2,9 mg em 1 colher de sopa de óleo de canola | 10 mg | 30 UI = 20 mg |
| β-caroteno | 1,8 ó 6 mg | 1/2 cenoura média | 2,7 mg | 5.000 UI = 1,5 g |

Fonte: United States Department of Agriculture

As três vitaminas atuam não somente isoladas, mas, mais eficientemente em conjunto. A interação de ácido ascórbico e alfa-tocoferol é ainda mais efetiva na inibição da oxidação. Estão localizados em diferentes domínios e interagem entre membrana,

lipoproteínas ou água. O ácido ascórbico reduz o alfa-tocoferil (radical gerado na membrana após ação do alfa-tocoferol) impedindo sua disseminação como radical livre. A interação entre o alfa-tocoferol e o beta-caroteno ainda não está tão evidente, mas estudos já demonstram que o efeito dos dois antioxidantes juntos é mais potente que separadamente. O caroteno age como varredor de radicais ao invés de doador de elétrons. Portanto, beta-caroteno e alfa-tocoferol podem exercer um efeito sinérgico por agir em diferentes porções da membrana e LDL (lipoproteína de baixa densidade) o alfa-tocoferol na superfície e beta-caroteno no interior ó concomitante coma varredura do alfa-tocoferol aos radicais peroxil produzidos pelo beta-caroteno. (NIKI *et. al.*, 1995)

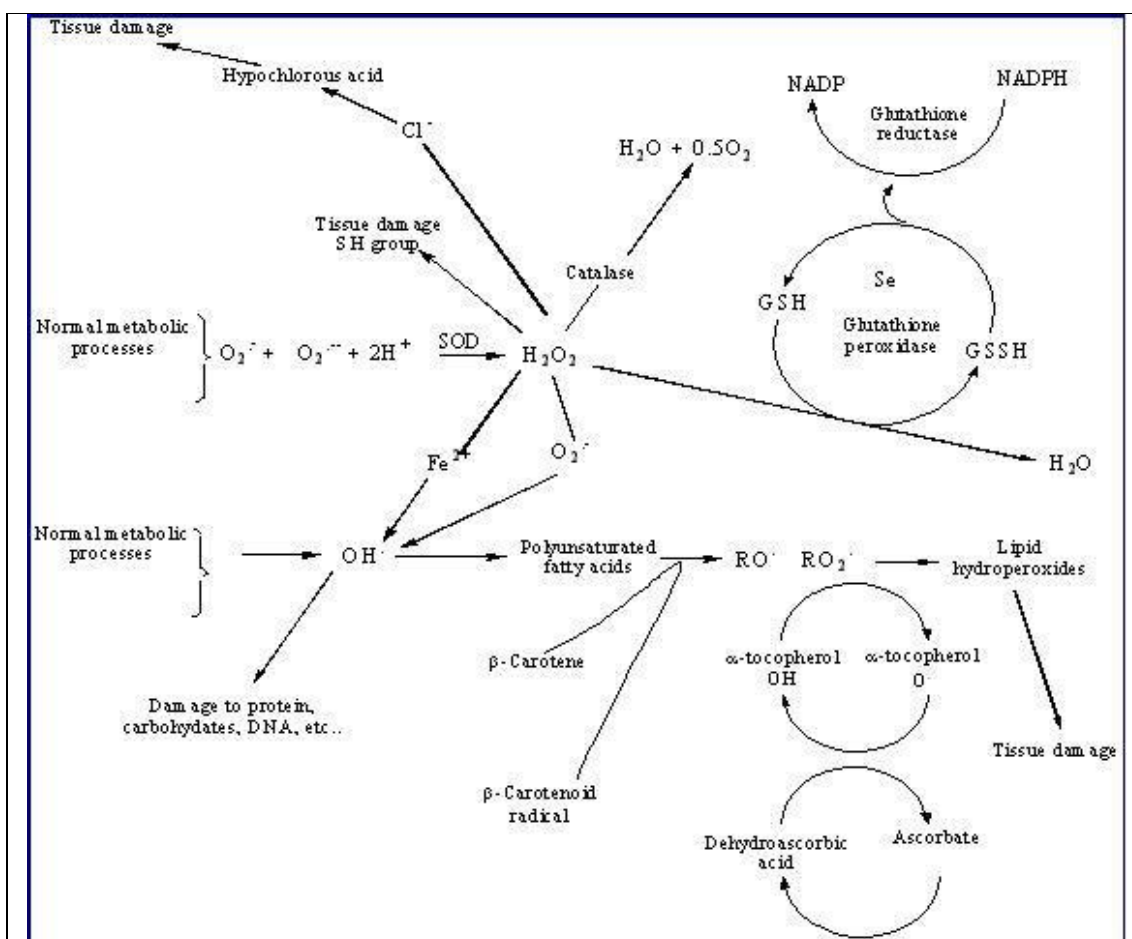


Figura 3. Interação entre radicais livres e antioxidantes.

Fonte: BAHORUN *et. al.*, 2006

O ácido ascórbico age na fase aquosa enquanto o alfa-tocoferol e beta-caroteno em compartimentos lipofílicos. Quimicamente, o beta-caroteno é menos reativo diante dos radicais que o ácido ascórbico e alfa-tocoferol. Em conclusão, a combinação de alfa-tocoferol, beta-caroteno e ácido ascórbico pode ser efetiva na inibição de danos oxidativos. (NIKI *et. al.*, 1995)

Vários estudos correlacionaram a alta ingestão de frutas e verduras (ricos nas vitaminas citadas acima) com a diminuição da incidência de doenças crônicas. No entanto, exatamente qual constituinte dietético é responsável por estes benefícios ainda não é claro. Os antioxidantes despertam a maior atenção e as vitaminas estão incluídas. Portanto, há uma grande busca pelo efeito benéfico dos suplementos visando melhorar a saúde. (BJELAKOVIC *et. al.*, 2008)

A busca pelo adiamento do envelhecimento e doenças correlacionadas tem sido desenfreada e gera inúmeras conseqüências. Em uma ciência mutante de poucas deliberações conclusivas, continuam as investigações pelos benefícios, ou será, malefícios dos antioxidantes não apenas visando as pessoas enfermas, mas dando atenção ao maior público consumidor, a população sadia.

2- OBJETIVOS

Avaliar o possível efeito dual (anti-oxidante e pró-oxidante) do complexo vitamínico (Ácido Ascórbico, α -Tocoferol e β -Caroteno) em células mononucleares e plasma de doadores não portadores e portadores de Alzheimer durante o processo de envelhecimento.

3- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1-Avaliação dos compartimentos oxidativos e redutores em células mononucleares e plasma

3.1.1-Avaliação da produção de ROS por ensaio de quimioluminescência dependente de luminol em células mononucleares

Este procedimento foi realizado:

- a) Em ausência do Complexo Vitamínico:** permitiu avaliar o comportamento do metabolismo basal das células mononucleares.
- b) Em presença do Complexo Vitamínico:** permitiu avaliar o comportamento das células mononucleares com as vitaminas antioxidantes.

3.1.2-Avaliação do poder redutor em células mononucleares e plasma através de ensaio com MTT

Este procedimento foi realizado:

- a) Em ausência do Complexo Vitamínico:** permitiu avaliar o comportamento das células mononucleares e plasma, individualmente.
- b) Em presença do Complexo Vitamínico:** permitiu avaliar o comportamento das células mononucleares e plasma com as vitaminas antioxidantes.

3.1.3-Verificação dos Valores de Albumina e Ácido Úrico plasmáticos

Aferição dos valores de albumina e ácido úrico nos plasmas de doadores não portadores de Alzheimer e portadores de Alzheimer através dos Kits LabTest® respectivos.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Aparelhos e Equipamentos

1. Agulhas descartáveis
2. Banho maria a 37° C
3. Centrífuga
4. Grades para apoio de tubos
5. Luminômetro
6. Pipetas de 10-1000µL
7. Pipetas graduadas de 5mL
8. Pipetas plásticas
9. Placas de Neubauer
10. Microscópio
11. Tubos de hemólise de vidro
12. Tubos de vidro
13. Tubos de polietileno siliconizados próprios para Luminômetro
14. Tubos heparinizados a vácuo

4.2- Reagentes

1. Bicarbonato de Sódio - ECIBRA
2. Cápsula de Vitaminas ó Drogaria Araújo
3. Dimetil-sulfóxido ó Sigma
4. Isopropanol ó Vetec
5. Kit de Albumina ó LabTest
6. Kit de Ácido Úrico - LabTest
7. KH_2PO_4
8. Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4phthalozinedione) ó Sigma
9. Monopaque ó Bion Ltda
10. MTT ó 3-(4,5 dimethylazol-2yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide - Sigma
11. Na_2HPO_4
12. NaCl
13. RPMI ó 1640 ó Sigma

4.3-Soluções

4.3.1- Solução Salina de PBS

Para o preparo de PBS, foram misturados os seguintes sais: Na_2HPO_4 (8,12g), KH_2PO_4 (1,35g), NaCl (8g), sendo o volume final completado para 1 L. O pH da solução era de 7,3.

4.3.2- RPMI

Um frasco de RPMI com HEPES foi diluído em 900mL de água destilada. Em seguida foram adicionados 2,0g de bicarbonato de sódio e 1 ampola de antibiótico (garamicina

120 mg). O pH foi ajustado para a faixa de 7,3 ó 7,4, utilizando-se NaOH 0,5N. O volume final da solução foi ajustado para 1000mL. Em seguida a solução foi filtrada em membrana de porosidade de 0,22microns, e colocada em recipiente estéril.

4.3.3- Gradiente de separação de células

Para separação das mononucleares foi utilizado o gradiente Monopaque: (d = 1,08) (Bion Ltda).

4.3.4- Solução de Luminol

Luminol: 1,77mg

Dimetil-sulfóxido: 1,00mL

Esta solução (10^{-2} M) foi estocada sem contato com a luz. Para uso, diluíu-se 100 vezes (1:100) a solução estoque em solução salina de PBS.

4.3.5- MTT

A solução de MTT foi preparada com 5mg de MTT para 1 mL de PBS a pH 7,3 e estocada em recipiente fechado, vedado de luz e ar sob refrigeração até 8° C.

4.3.6- Complexo Vitamínico

Cápsula contendo: 28.176 µg de Ácido ascórbico, 34.458 µg de Alfa-tocoferol e 859,04 µg de Beta-caroteno, como proposto por ZHANG & OMAYE, 2000, manipuladas na Drogaria Araújo.

A cápsula foi submetida à diluição em 10mL de DMSO e posteriormente diluída 10 vezes com PBS. As concentrações para ambos os procedimentos foram:

Tabela 3. Quantidade (μg) das vitaminas ácido ascórbico, alfa-tocoferol e beta-caroteno em cada volume estudado e correlação com dose oral.

| VITAMINAS | [A] = 10 μL | [B] = 20 μL | [C] = 50 μL | [D] = 100 μL |
|---------------------|----------------------------------|--------------------------------------|------------------------|--|
| ÁC. ASCÓRBICO | 2,82 μg | 5,64 μg | 14,09 μg | 28,18 μg |
| α -TOCOFEROL | 3,45 μg | 6,89 μg | 17,23 μg | 68,92 μg |
| β -CAROTENO | 0,09 μg | 0,17 μg | 0,43 μg | 0,86 μg |
| | Dose abaixo da recomendação oral | Dose equivalente à recomendação oral | Dose intermediária | Dose equivalente à suplementação oral. |

4.4- Metodologia

4.4.1. Seleção de Doadores

Foram selecionados indivíduos dos sexos masculino e feminino, divididos em 2 faixas etárias (20-49) e (50-80) anos, como sujeitos de pesquisa. Os critérios de inclusão e exclusão dos doadores deste projeto de pesquisa foram definidos pela equipe médica responsável pela seleção dos sujeitos de pesquisa. Doadores foram selecionados pelo serviço de geriatria e endocrinologia do hospital da Santa Casa de Misericórdia (SCMBH) através do Núcleo de Pesquisa e Pós-graduação; escolhidos aleatoriamente pela pesquisadora responsável em parceria com o Ambulatório de Nutrição do Centro Universitário de Belo Horizonte e os doadores com Alzheimer foram encaminhados pelo Dr. Edgar Nunes de Moraes e Dr. Rodrigo Ribeiro dos Santos, do Centro de Referência do Idoso do Hospital das Clínicas / MG. A realização deste projeto mereceu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP) ó Parecer n° ETIC 343/08.

Tabela 4. Características da população controle e portadora de Alzheimer.

| FAIXAS ETÁRIAS / SEXO / NÚMERO DE INDIVÍDUOS | | | | | | |
|--|-----------|-----------|---------------------|-----------|----------|---------------------|
| Faixa etária | Controle | | | Alzheimer | | |
| | Masculino | Feminino | Média (anos) | Masculino | Feminino | Média (anos) |
| 20-29 anos | 4 | 4 | 23,5 ± 1,77 | - | - | |
| 30-39 anos | 5 | 4 | 34,1 ± 3,14 | - | - | |
| 40-49 anos | 9 | 2 | 44,3 ± 2,61 | - | - | |
| 50-59 anos | 1 | 4 | 53,8 ± 3,49 | - | - | |
| 60-69 anos | 2 | 6 | 64,0 ± 3,04 | 1 | 1 | 68,5 ± 0,71 |
| 70-85 anos | 3 | 3 | 74,2 ± 3,66 | 5 | 5 | 79,25 ± 4,62 |
| TOTAL | 24 | 23 | - | 6 | 6 | - |
| TOTAL GERAL | 47 | | 48,98 ± 2,95 | 12 | | 73,88 ± 2,67 |

4.4.2- Obtenção de células mononucleares e plasma

As células mononucleares e plasma foram obtidos a partir do sangue periférico, segundo a técnica descrita por BICALHO *et. al.*, 1981.

Em síntese, 4 mL de sangue heparinizado foram adicionados sobre 3 mL de gradiente Monopaque (densidade = 1,12) em tubos de vidro. Após centrifugação a 2500 rpm por 40 minutos foram obtidas duas fases distintas separadas por anel interfásico. Acima, foi retirado o plasma e colocado em tubo separado, em seguida o anel de mononucleares. As hemácias, ao fundo, foram dispensadas. O anel de mononucleares foi transferido para outro tubo, completado com PBS (pH = 7,3) para duas sessões de lavagem a 1500rpm por 15 minutos cada. Após as duas lavagens as células foram suspensas em 1,0 mL de RPMI. Para utilização, foram diluídas 100 vezes em PBS e contadas em placa de Neubauer. Ajustou-se o volume final para 1×10^6 células em 100µL.

4.4.3- Ensaio de Quimioluminescência

Permite avaliar, diretamente, a atividade da NADPH-oxidase, a enzima responsável pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), durante a ativação de células mononucleares. Esta técnica baseia-se na reação entre luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione) e as espécies reativas geradas na ausência ou presença das concentrações vitamínicas citadas acima (Tabela 3).

Foram utilizados para o ensaio: 500 μL de Luminol (10^{-2}) (da solução descrita no item 4.3.4.); células mononucleares 1×10^6 a cada 100 μL ; o complexo Vitamínico diluído 10 vezes em PBS nos volumes descritos abaixo; e PBS para completar o Volume final de 700 μL .

Em tubos específicos para Luminômetro foram, então, distribuídos os conteúdos abaixo.

Tabela 5. Distribuição dos Tubos para o ensaio de quimioluminescência.

| Tubos | Quantidade de Complexo Vitamínico (μL) | Quantidade de PBS (μL) para completar volume final | Quantidade Luminol (μL) | Quantidade de célula (μL) |
|-------|---|---|--------------------------------------|--|
| Basal | 0 | 100 | 500 | 100 |
| [A] | 10 | 90 | 500 | 100 |
| [B] | 20 | 80 | 500 | 100 |
| [C] | 50 | 50 | 500 | 100 |
| [D] | 100 | 0 | 500 | 100 |

A leitura foi feita em corridas de 30 minutos para cada tubo.

Após o tempo decorrido, retirava-se o tubo e a fita de papel com os valores de RLU/minuto, colocando novo tubo para leitura. O processo foi repetido para os cinco tubos.

Foi feita, então, a média dos minutos de todos os doadores separados em grupos (não portadores de Alzheimer e portadores de Alzheimer) e por volume das vitaminas.

4.4.4- Ensaio de MTT

Permite avaliar o poder redutor dos tubos de leitura com conteúdos basais, o plasma na ausência ou presença das concentrações de vitaminas citadas acima (item 4.3.6). O uso de MTT forneceu leitura em espectrofotômetro (570nm).

Os tubos de hemólise foram montados com volume final de 1.100 μL com as seguintes configurações:

Tabela 6. Distribuição dos Tubos para o ensaio de MTT.

| Tubos | Quantidade de Complexo Vitamínico (μL) | Quantidade de Meio RPMI (μL) | Quantidade de célula OU plasma (μL) |
|----------------|---|---|--|
| Basal | 0 | 980 | 100 |
| [A] | 10 | 970 | 100 |
| [B] | 20 | 960 | 100 |
| [C] | 50 | 930 | 100 |
| [D] | 100 | 880 | 100 |
| Basal (branco) | 0 | 1080 | 0 |
| [A] (branco) | 10 | 1070 | 0 |
| [B] (branco) | 20 | 1060 | 0 |
| [C] (branco) | 50 | 1030 | 0 |
| [D] (branco) | 100 | 980 | 0 |

Após 30 minutos em banho de 37° C, acrescentou-se 20 μL de MTT em cada tubo, completando o volume final de 1.100 μL . O MTT foi adicionado à solução.

Os tubos voltaram ao banho de 37° C por 60 minutos.

O conteúdo de 1 mL de Isopropanol HCl foi acrescentado em cada tubo e misturado no vortex para homogeneizar os cristais. Os tubos foram centrifugados no ponto 3 (1500rpm) por 10 minutos para sedimentação das vitaminas e plasma.

Os tubos foram retirados da centrífuga e os sobrenadantes foram lidos no espectrofotômetro a 570nm. Os tubos brancos respectivos de cada volume de vitamina

foram utilizados para zerar o aparelho, em seguida foram feitas as leituras dos tubos correspondentes. Os valores foram anotados.

4.5- Análise Estatística

O teste estatístico utilizado foi o não paramétrico de Mann & Whitney.

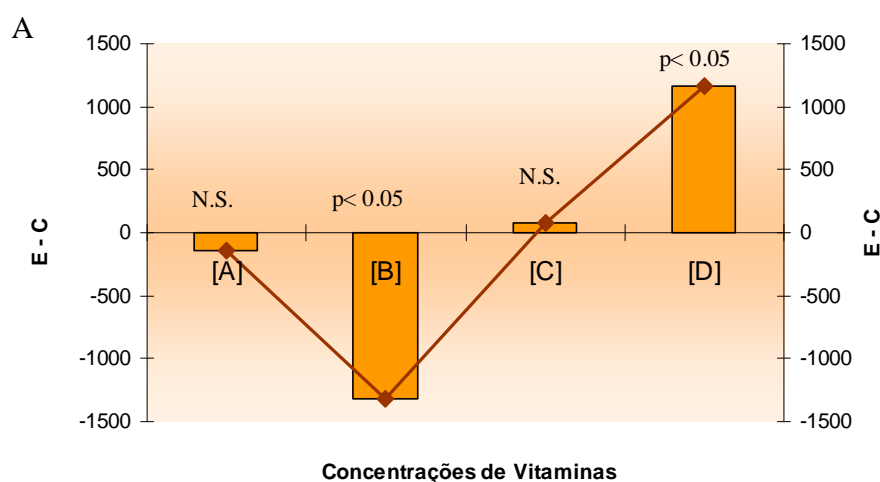
O teste de Mann & Whitney corresponde ao teste t para amostras independentes no caso paramétrico e avalia se existe diferença significativa entre duas variáveis distintas. Por exemplo, quando tiver a existência de 2 grupos.

5- RESULTADOS

A Tabela 7 mostra os efeitos antioxidantes e pró-oxidantes do complexo vitamínico em células mononucleares de doadores não portadores de Alzheimer na faixa etária de 20 a 80 anos. Os nossos resultados demonstraram que a concentração [A], dose abaixo da recomendada e [C] dose intermediária, não foram significativas $p > 0,05$ pelo Teste de Mann-Whitney, o suficiente para alterar a produção dos radicais livres quando comparadas às taxas basais, no entanto, revelam as tendências seguidas pelas doses [B], recomendada e [D] suplementada. A concentração [B] mostrou ser extremamente antioxidante e significativo ($p < 0,05$), enquanto a concentração [D], demonstrou um perfil pró-oxidante significativo ($p < 0,05$), aumentando a produção de radicais livres além da produção basal. Entretanto quando comparamos as concentrações [A] e [B], [C] e [D] entre si, verificamos que são significativas, $p < 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney. O painel A mostra os dados expressos em E ó C {Experimento ó Controle (M + RPMI)}. Nossos resultados mostram o alto potencial antioxidante da concentração recomendada [B] e o alto potencial oxidante da concentração suplementada [D].

Tabela 7. Demonstração do perfil antioxidante e pró-oxidante do complexo vitamínico (beta-caroteno, alfa-tocoferol e ácido ascórbico) em células mononucleares de doadores não portadores de Alzheimer na faixa etária de 20-80 anos.

| Experimentos | Quimioluminescência (RLU/minuto \pm EP) | E ó C |
|--------------|--|-------|
| M + RPMI | 3900 \pm 89 | - |
| M + [A] | 3763 \pm 65 | -137 |
| M + [B] | 2577 \pm 111* | -1323 |
| M + [C] | 3973 \pm 154 | 73 |
| M + [D] | 5058 \pm 154* | 1158 |



Os valores representam a média de 40 experimentos \pm E.P.

A geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) foi expressa em RLU/minuto (Relative Light Units = Unidade Relativa de Luz) em reação de 30 minutos, M = células mononucleares, RPMI = meio de cultura. E ó C = Experimento ó Controle (M+RPMI).

[A] Ácido Ascórbico = 2,82 μ g, Alfa-tocoferol = 3,45 μ g, Beta-Caroteno = 0,09 μ g;

[B] Ácido Ascórbico = 5,64 μ g, Alfa-tocoferol = 6,90 μ g, Beta-Caroteno = 0,18 μ g;

[C] Ácido Ascórbico = 14,09 μ g, Alfa-tocoferol = 17,23 μ g, Beta-Caroteno = 0,43 μ g;

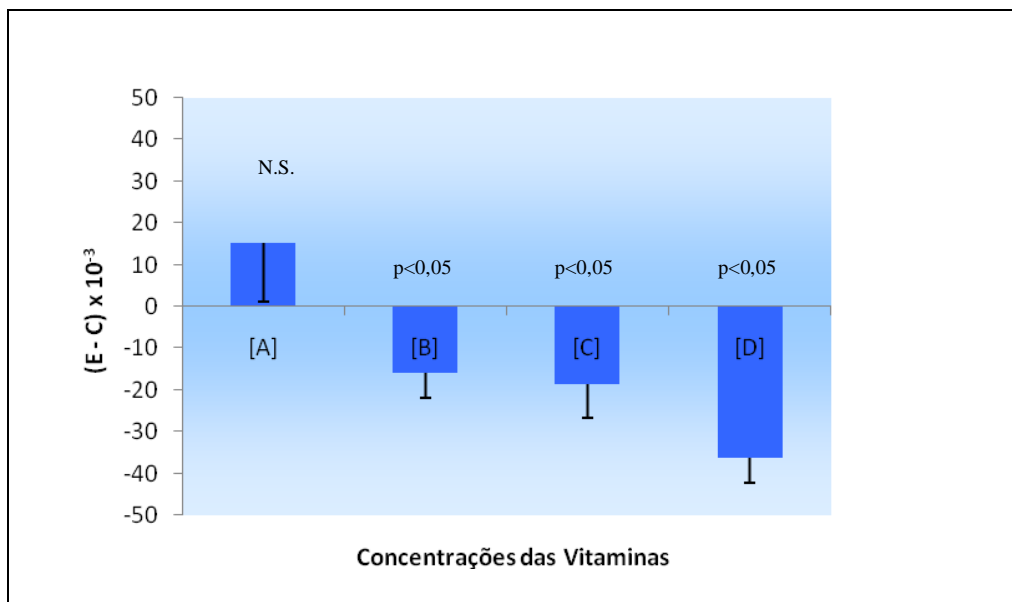
[D] Ácido Ascórbico = 28,18 μ g, Alfa-tocoferol = 34,46 μ g, Beta-Caroteno = 0,86 μ g

[A] e [C] não são significativas ($p > 0.05$) quando comparados a M + RPMI pelo teste Mann-Whitney.

[B] e [D] significativos ($p < 0.05$) quando comparados a M + RPMI pelo teste Mann-Whitney.

Após observarmos que na faixa etária de 20 a 80 anos ocorre um efeito dual antioxidante e pró-oxidante em células mononucleares de doadores não portadores de Alzheimer, partimos para a análise do poder redutor das mesmas, a fim de avaliarmos o possível estresse oxidativo gerado. O que podemos observar foi uma diminuição, da capacidade redutora provocada pelo complexo vitamínico nas concentrações [B], [C] e [D], mas significativa, $p < 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney, apenas para as concentrações: [C], intermediária e [D] suplementada. Na concentração [A], não houve diferença significativa, $p > 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney, mas uma tendência ao aumento do poder redutor celular (Figura 4).

Figura 4. Demonstração do perfil redutor do complexo vitamínico (beta-caroteno, alfa-tocoferol e ácido ascórbico) em células mononucleares de doadores não portadores de Alzheimer na faixa etária de 20 a 80 anos.



Os valores representam a média de 30 experimentos \pm E.P.
E ó C = Experimento ó Controle. D.O.=densidade óptica (570nm).

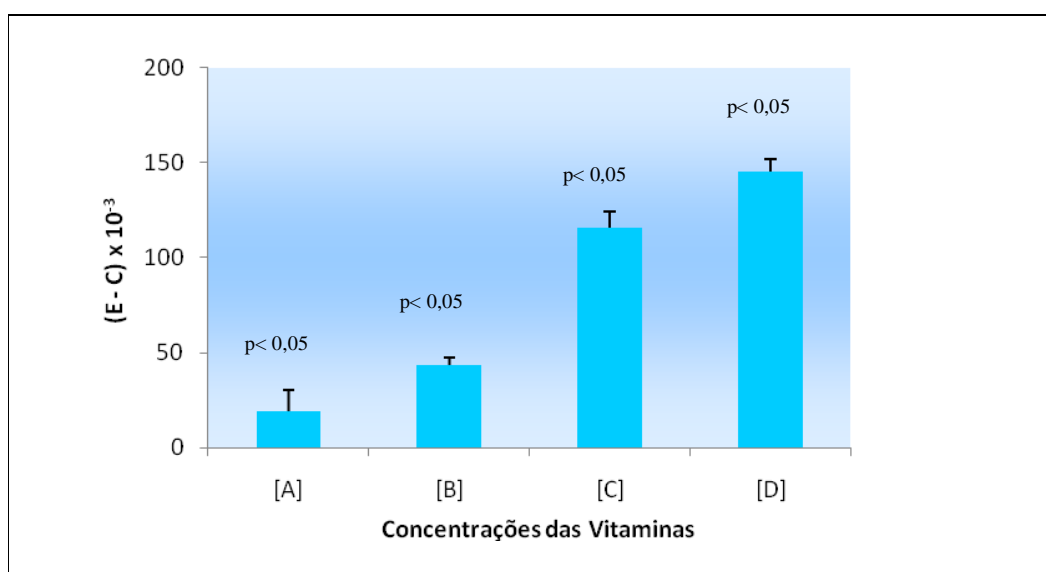
[A] Ácido Ascórbico = 2,82 μ g, Alfa-tocoferol = 3,45 μ g, Beta-Caroteno =0,09 μ g;
[B] Ácido Ascórbico = 5,64 μ g, Alfa-tocoferol = 6,90 μ g, Beta-Caroteno =0,18 μ g;
[C] Ácido Ascórbico = 14,09 μ g, Alfa-tocoferol = 17,23 μ g, Beta-Caroteno =0,43 μ g;
[D] Ácido Ascórbico = 28,18 μ g, Alfa-tocoferol = 34,46 μ g, Beta-Caroteno =0,86 μ g

[A] não significativa ($p>0.05$) quando comparada ao Controle pelo teste Mann-Whitney.
[B], [C] e [D] são significativas ($p>0.05$) quando comparadas ao Controle pelo teste Mann-Whitney.

Uma vez verificada a diminuição do poder redutor do compartimento celular, foi nosso interesse verificar a capacidade redutora do compartimento plasmático. Todas as concentrações do complexo vitamínico geraram aumentos significativos, $p<0,05$ pelo teste de Mann-Whitney, do poder redutor plasmático, como mostra a Figura 5. Entretanto, este aumento se mostrou mais exacerbado nas concentrações: [C], intermediária e [D],

suplementada. Estes resultados analisados em conjunto com a Figura 4 mostram um perfil contrário do que foi observado com o poder redutor celular.

Figura 5. Demonstração do perfil redutor do complexo vitamínico (beta-caroteno, alfa-tocoferol e ácido ascórbico) no plasma de doadores não portadores de Alzheimer na faixa etária de 20 a 80 anos.



Os valores representam a média de 40 experimentos \pm E.P.
E ó C = Experimento ó Controle. D.O.=densidade óptica (570nm).

[A] Ácido Ascórbico = 2,82 μ g, Alfa-tocoferol = 3,45 μ g, Beta-Caroteno =0,09 μ g;
[B] Ácido Ascórbico = 5,64 μ g, Alfa-tocoferol = 6,90 μ g, Beta-Caroteno =0,18 μ g;
[C] Ácido Ascórbico = 14,09 μ g, Alfa-tocoferol = 17,23 μ g, Beta-Caroteno =0,43 μ g;
[D] Ácido Ascórbico = 28,18 μ g, Alfa-tocoferol = 34,46 μ g, Beta-Caroteno =0,86 μ g

[A], [B], [C] e [D] são significativas ($p < 0,05$) quando comparados ao Controle pelo teste Mann-Whitney.

Entretanto, os resultados da Figura 5 poderiam não ser conclusivos, pois sabemos que no compartimento plasmático existem substâncias antioxidantes que poderiam estar aumentadas, justificando estes resultados. Assim, os conteúdos de albumina e ácido úrico foram dosados de cada doador. Nossos resultados mostram que os doadores se encontraram

na faixa de normalidade para albumina, dentro dos valores de referência de 3,5 a 5,5 g/dL, como demonstrado na Figura 6. Os valores para ácido úrico, em que a faixa de referência é de 2,4 a 5,7 mg/dL para mulheres e 3,4 a 7 mg/dL para homens, nossos doadores se enquadraram, como demonstrado nas Figuras 7 e 8, respectivamente.

Figura 6. Dosagem de albumina plasmática de doadores não portadores de Alzheimer na faixa etária de 20-80 anos.

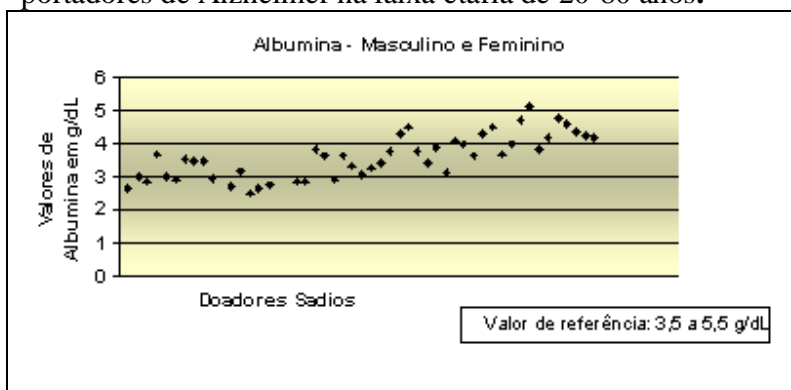


Figura 7. Dosagem de ácido úrico plasmático de doadores do sexo feminino não portadoras de Alzheimer na faixa etária de 20-80 anos.

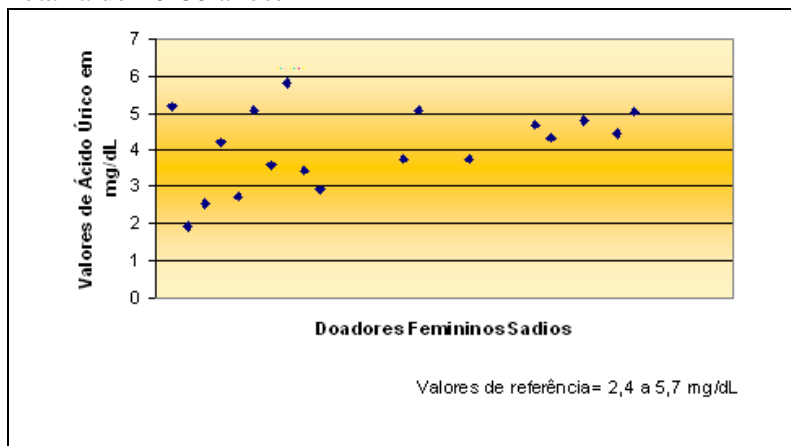
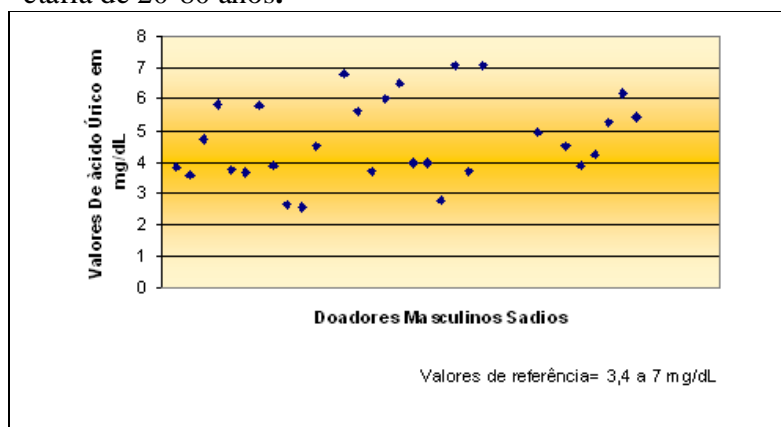


Figura 8. Dosagem de ácido úrico plasmático de doadores do sexo masculino não portadores de Alzheimer na faixa etária de 20-80 anos.



Após avaliação do efeito dual (anti e pró-oxidante) do complexo vitamínico de doadores não portadores de Alzheimer na faixa etária de 20-80 anos, começamos a questionar se estes resultados seriam os mesmos quando fossem analisados em duas faixas etárias distintas (20-49 anos e 50-80 anos). Esta análise, a nosso ver, se faz pertinente, pois trabalhos do laboratório comprovaram diferença na reatividade celular durante o processo de envelhecimento. Neste contexto, a Tabela 8 mostra um perfil pró-oxidante gerado pelas células mononucleares em todas as concentrações do complexo vitamínico. Entretanto, apesar da tendência pró-oxidante, as concentrações [A] e [B] não foram significativas, $p > 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney. Em contrapartida, as concentrações [C] e [D] foram significativamente $p < 0,05$ maiores que a produção basal (M+RPMI), pelo teste de Mann-Whitney. A Tabela 8, painel A, demonstra claramente esses efeitos exacerbados nos valores de E ó C (Experimento ó Controle) e o aumento gradativo da produção de radicais livres com o aumento das concentrações das vitaminas.

Tabela 8. Demonstração do perfil antioxidante e pró-oxidante do complexo vitamínico (beta-caroteno, alfa-tocoferol e ácido ascórbico) em células mononucleares de doadores não portadores de Alzheimer na faixa etária de 20-49 anos.

| Experimentos | Quimioluminescência (RLU/minuto \pm EP) | E ó C | <u>20 a 49 anos</u> |
|--------------|---|-------|---|
| M + RPMI | 1798 \pm 136 | - | <p>A</p> <p>Concentrações das Vitaminas</p> |
| M + [A] | 1883 \pm 90 | 85 | |
| M + [B] | 2084 \pm 139 | 286 | |
| M + [C] | 3185 \pm 40* | 1387 | |
| M + [D] | 4121 \pm 78* | 2323 | |

Os valores representam a média de 18 experimentos \pm E.P.

A geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) foi expressa em RLU/minuto (Relative Light Units = Unidade Relativa de Luz) em reação de 30 minutos, M = células mononucleares, RPMI = meio de cultura. E ó C = Experimento ó Controle (M+RPMI).

[A] Ácido Ascórbico = 2,82 μ g, Alfa-tocoferol = 3,45 μ g, Beta-Caroteno = 0,09 μ g;
 [B] Ácido Ascórbico = 5,64 μ g, Alfa-tocoferol = 6,90 μ g, Beta-Caroteno = 0,18 μ g;
 [C] Ácido Ascórbico = 14,09 μ g, Alfa-tocoferol = 17,23 μ g, Beta-Caroteno = 0,43 μ g;
 [D] Ácido Ascórbico = 28,18 μ g, Alfa-tocoferol = 34,46 μ g, Beta-Caroteno = 0,86 μ g.

[A] e [B] não são significantes ($p > 0.05$) quando comparados a M + RPMI pelo teste Mann-Whitney.

[C] e [D] são significantes ($p < 0.05$) quando comparados a M + RPMI pelo teste Mann-Whitney

Ao realizarmos a mesma avaliação na faixa etária de 50-80 anos, verificamos um perfil diferente. As concentrações [A] e [B] do complexo vitamínico conseguem reduzir, significativamente, $p < 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney, a produção de radicais livres em relação ao controle, como observado na Tabela 9. A concentração [C], intermediária apresentou uma capacidade antioxidante não significativa, $p > 0,05$, mas que ao observarmos os dados, poderíamos analisar como transitório do anti para pró-oxidante.

Assim, quando comparamos o perfil pró e antioxidante nas duas faixas etárias estudadas, verificamos que o processo de envelhecimento influencia a metabolização do complexo vitamínico estudado (Tabela 8 e 9, painéis A).

Tabela 9. Demonstração do perfil antioxidante e pró-oxidante do complexo vitamínico (beta-caroteno, alfa-tocoferol e ácido ascórbico) em células mononucleares de doadores não portadores de Alzheimer na faixa etária de 50-80 anos.

| Experimentos | Quimioluminescência (RLU/minuto ± EP) | E ó C | <u>50 a 80 anos</u> |
|--------------|---------------------------------------|-------|---|
| M + RPMI | 3172 ± 300 | - | <p>A</p> <p>Concentrações das Vitaminas</p> |
| M + [A] | 2406 ± 194* | -766 | |
| M + [B] | 2131 ± 99* | -1041 | |
| M + [C] | 3037 ± 135 | -135 | |
| M + [D] | 3861 ± 176* | 686 | |

Os valores representam a média de 12 experimentos ± E.P.

A geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) foi expressa em RLU/minuto (Relative Light Units = Unidade Relativa de Luz) em reação de 30 minutos, M = células mononucleares, RPMI = meio de cultura. E ó C = Experimento ó Controle (M+RPMI).

[A] Ácido Ascórbico = 2,82µg, Alfa-tocoferol = 3,45µg, Beta-Caroteno =0,09µg;
 [B] Ácido Ascórbico = 5,64µg, Alfa-tocoferol = 6,90µg, Beta-Caroteno =0,18µg;
 [C] Ácido Ascórbico = 14,09µg, Alfa-tocoferol = 17,23µg, Beta-Caroteno =0,43µg;
 [D] Ácido Ascórbico = 28,18µg, Alfa-tocoferol = 34,46µg, Beta-Caroteno =0,86µg.

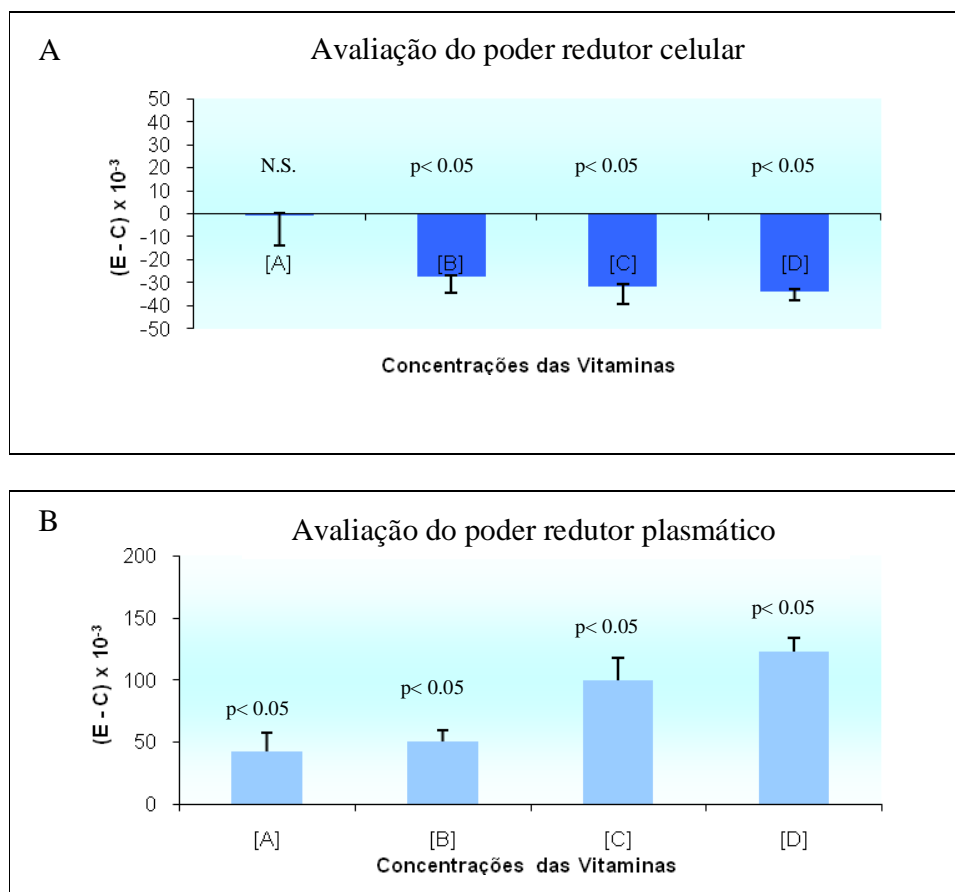
[C] não significativo ($p>0.05$) quando comparado a M + RPMI pelo teste Mann-Whitney
 [A], [B] e [D] significativos ($p<0.05$) quando comparados a M + RPMI pelo teste Mann-Whitney.

Após análise do poder oxidativo nas faixas etárias, passamos para a verificação do poder redutor celular e plasmático nestas mesmas faixas etárias.

Todas as concentrações do complexo vitamínico diminuíram o poder redutor celular de doadores de 20-49 anos, sendo [B], [C] e [D] significantes, $p<0,05$ pelo teste de Mann-Whitney, e [A] não significativa $p>0.05$ pelo mesmo teste, como demonstra a Figura 9, painel A.

Em contrapartida, houve aumento significativo, $p < 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney, do poder redutor plasmático em todas as concentrações do complexo vitamínico nesta mesma faixa etária, observado na Figura 9, painel B.

Figura 9. Avaliação do poder redutor celular e plasmático de doadores não portadores de Alzheimer na faixa etária de 20 a 49 anos.



Os valores representam a média de 15 experimentos \pm E.P.

E ó C = Experimento ó Controle. D.O.=densidade óptica (570nm)

[A] Ácido Ascórbico = 2,82 μ g, Alfa-tocoferol = 3,45 μ g, Beta-Caroteno =0,09 μ g;

[B] Ácido Ascórbico = 5,64 μ g, Alfa-tocoferol = 6,90 μ g, Beta-Caroteno =0,18 μ g;

[C] Ácido Ascórbico = 14,09 μ g, Alfa-tocoferol = 17,23 μ g, Beta-Caroteno =0,43 μ g;

[D] Ácido Ascórbico = 28,18 μ g, Alfa-tocoferol = 34,46 μ g, Beta-Caroteno =0,86 μ g

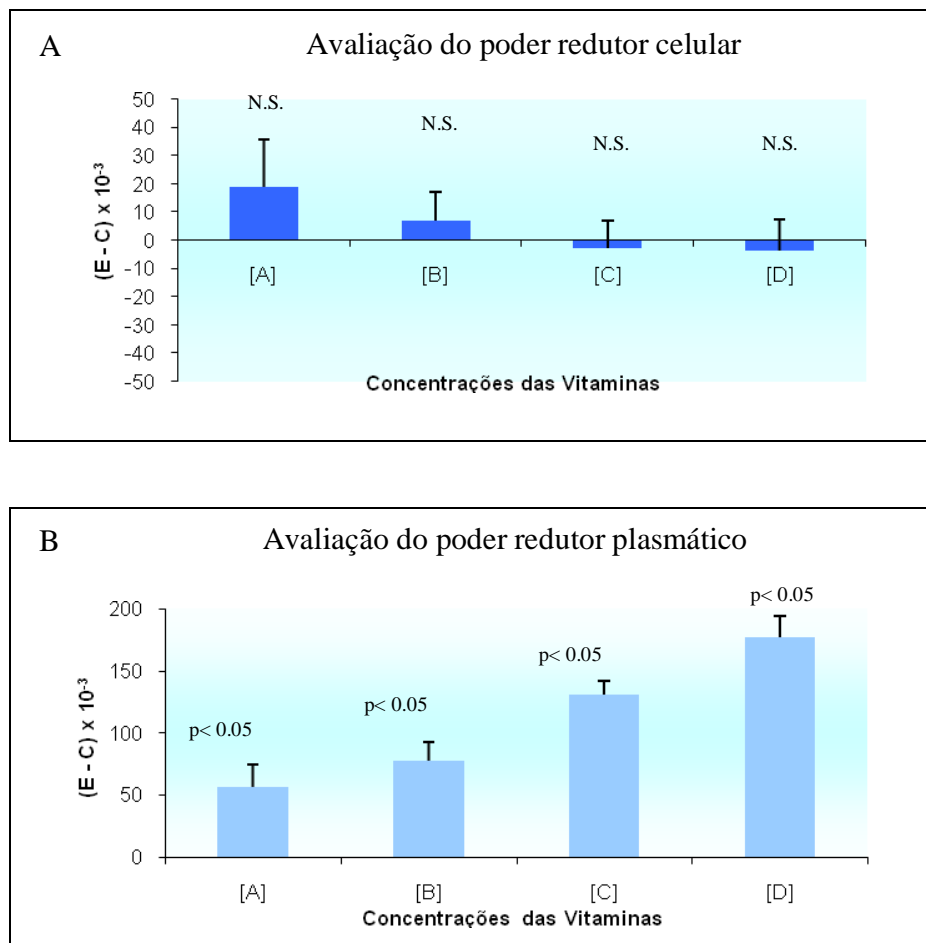
$p < 0,05$ = significativo quando comparados ao controle pelo teste de Mann-Whitney.

N.S. = não significativo quando comparados ao controle pelo teste de Mann-Whitney.

Na faixa etária de 50 a 80 anos, o poder redutor celular começa mais elevado na concentração [A], mas diminui com o aumento das doses do complexo vitamínico. Esta é apenas uma tendência pois nenhuma das doses do complexo vitamínico foi significativa em relação ao basal, $p > 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney. Na Figura 10, painel A, observamos a tendência á diminuição do poder redutor celular, mas, o complexo vitamínico não é significativo nesta faixa etária.

Seguindo o mesmo perfil antes mencionado na faixa de 20-49 anos, o poder redutor plasmático da faixa etária de 50-80 anos aumenta significativamente, $p < 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney, com relação ao controle. Como demonstrado em figuras anteriores, a Figura 10, painel B, mostra o aumento gradativo do poder redutor do plasma. Há aumento do poder redutor plasmático com o aumento da concentração do complexo de vitaminas.

Figura 10. Avaliação do poder redutor celular e plasmático de doadores não portadores de Alzheimer na faixa etária de 50 a 80 anos.



Os valores representam a média de 15 experimentos \pm E.P.
E ó C = Experimento ó Controle. D.O.= densidade óptica (570nm).

[A] Ácido Ascórbico = 2,82 μ g, Alfa-tocoferol = 3,45 μ g, Beta-Caroteno =0,09 μ g;
[B] Ácido Ascórbico = 5,64 μ g, Alfa-tocoferol = 6,90 μ g, Beta-Caroteno =0,18 μ g;
[C] Ácido Ascórbico = 14,09 μ g, Alfa-tocoferol = 17,23 μ g, Beta-Caroteno =0,43 μ g;
[D] Ácido Ascórbico = 28,18 μ g, Alfa-tocoferol = 34,46 μ g, Beta-Caroteno =0,86 μ g

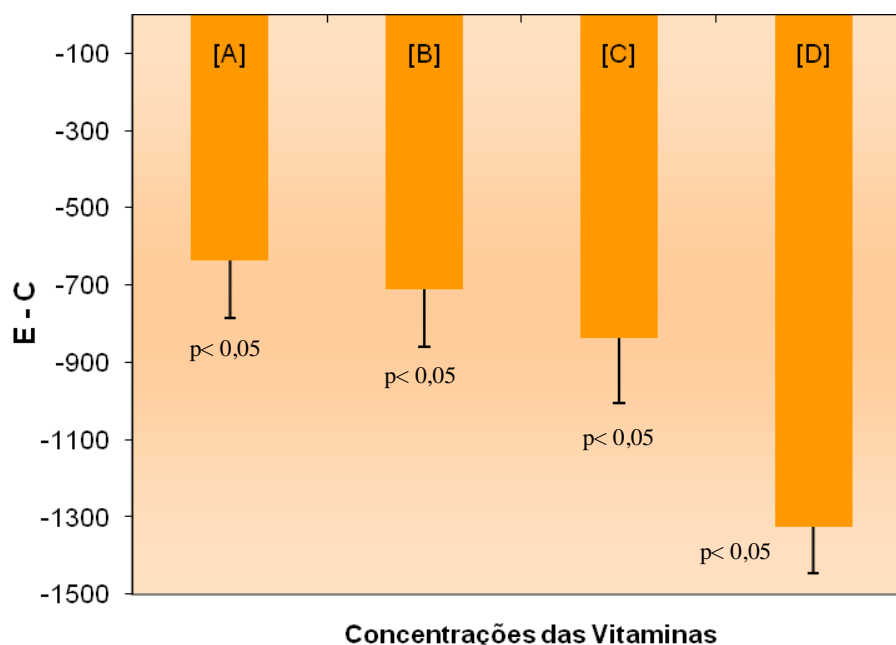
p<0,05 = significativo quando comparados ao controle pelo teste de Mann-Whitney.
N.S. = não significativo quando comparados ao controle pelo teste de Mann-Whitney.

Sabemos também, que o estresse oxidativo está presente não apenas no envelhecimento isolado, mas especialmente em co-morbidades associadas a ele como doenças neurodegenerativas, o que torna preocupante a suplementação destes pacientes com vitaminas. Neste contexto, resolvemos estender os nossos estudos, avaliando este balanço em doadores portadores de Alzheimer.

O perfil oxidativo deste grupo é diferente dos doadores não portadores de Alzheimer pois as células apresentam intensa redução na produção de radicais livres, ao receberem as quatro concentrações do complexo vitamínico. Como demonstrado pela Tabela 10, o poder antioxidante das vitaminas nas células mononucleares é evidente e altamente significativo, $p < 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney. Todos os valores de E ó C (Experimento ó Controle) são negativos, indicando a redução na geração de espécies oxidantes em relação ao controle.

Tabela 10. Demonstração do perfil antioxidante e pró-oxidante do complexo vitamínico (beta-caroteno, alfa-tocoferol e ácido ascórbico) em células mononucleares de doadores com Alzheimer na faixa etária de 60-85 anos.

| Experimentos | Quimioluminescência (RLU/minuto \pm EP) | E ó C |
|--------------|--|-------|
| M + RPMI | 2117 \pm 218 | - |
| M + [A] | 1481 \pm 150* | -636 |
| M + [B] | 1407 \pm 150* | -710 |
| M + [C] | 1280 \pm 168* | -837 |
| M + [D] | 792 \pm 121* | -1325 |



Os valores representam a média de 12 experimentos \pm E.P.

A geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) foi expressa em RLU/minuto (Relative Light Units = Unidade Relativa de Luz) em reação de 30 minutos, M = células mononucleares, RPMI = meio de cultura. E ó C = Experimento ó Controle (M+RPMI).

[A] Ácido Ascórbico = 2,82 μ g, Alfa-tocoferol = 3,45 μ g, Beta-Caroteno = 0,09 μ g;

[B] Ácido Ascórbico = 5,64 μ g, Alfa-tocoferol = 6,90 μ g, Beta-Caroteno = 0,18 μ g;

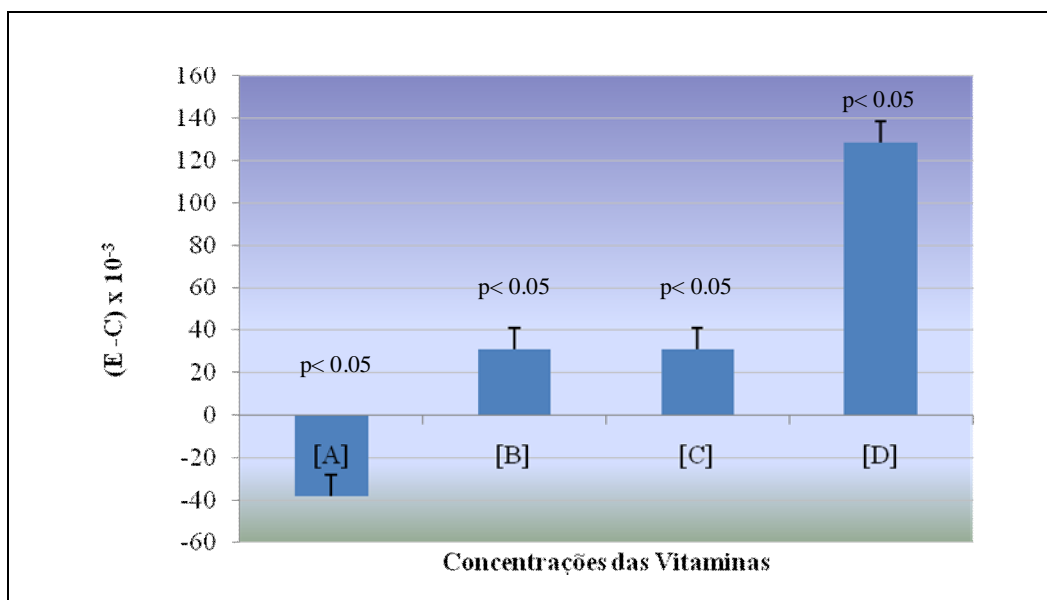
[C] Ácido Ascórbico = 14,09 μ g, Alfa-tocoferol = 17,23 μ g, Beta-Caroteno = 0,43 μ g;

[D] Ácido Ascórbico = 28,18 μ g, Alfa-tocoferol = 34,46 μ g, Beta-Caroteno = 0,86 μ g.

[A], [B], [C] e [D] são significativos ($p < 0,05$) quando comparados a M + RPMI pelo teste Mann-Whitney.

O poder redutor celular deste mesmo grupo, é reduzido na concentração [A] do complexo vitamínico de maneira significativa, $p < 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney. Entretanto nas concentrações [B], [C] e [D] ocorre uma inversão na função do complexo vitamínico, o qual aumenta o poder redutor celular significativamente, $p < 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney (Figura 11).

Figura 11. Avaliação do poder redutor celular de portadores de Alzheimer na faixa etária de 60 a 85 anos.



Os valores representam a média de 12 experimentos \pm E.P.

E ó C = Experimento ó Controle, D.O.= densidade óptica (570nm).

[A] Ácido Ascórbico = 2,82 μ g, Alfa-tocoferol = 3,45 μ g, Beta-Caroteno = 0,09 μ g;

[B] Ácido Ascórbico = 5,64 μ g, Alfa-tocoferol = 6,90 μ g, Beta-Caroteno = 0,18 μ g;

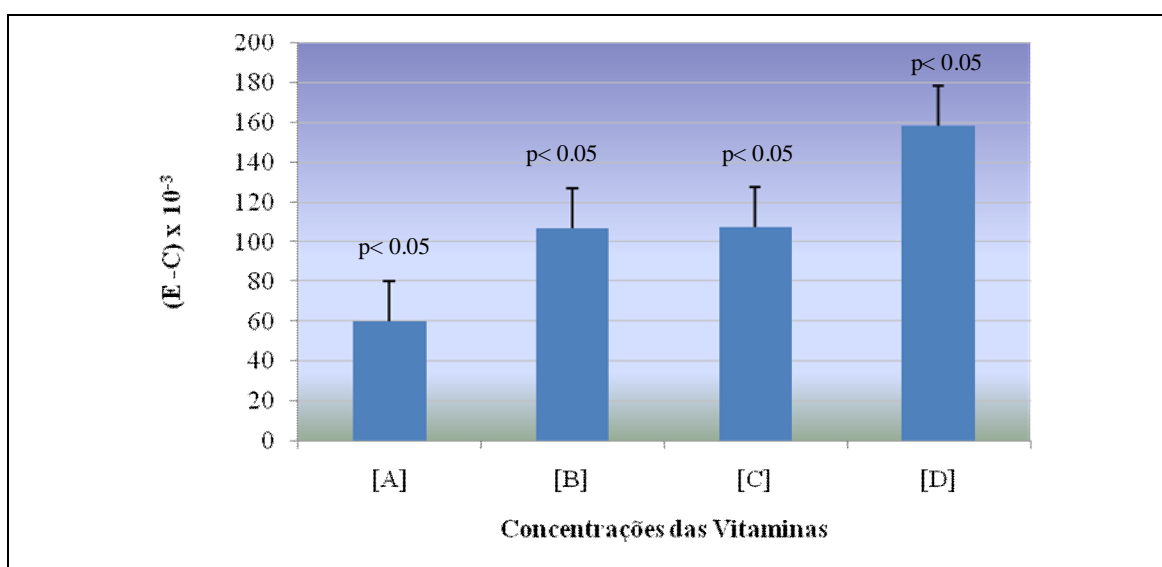
[C] Ácido Ascórbico = 14,09 μ g, Alfa-tocoferol = 17,23 μ g, Beta-Caroteno = 0,43 μ g;

[D] Ácido Ascórbico = 28,18 μ g, Alfa-tocoferol = 34,46 μ g, Beta-Caroteno = 0,86 μ g

[A], [B], [C] e [D] são significativos ($p < 0,05$) quando comparados ao Controle pelo teste Mann-Whitney.

O perfil redutor plasmático segue a mesma linha dos doadores não portadores de Alzheimer. Há um aumento do poder redutor plasmático de doadores com Alzheimer em todas as concentrações e de maneira gradual. Todos os aumentos detectados no poder redutor plasmático dos doadores com Alzheimer foram significativos, $p < 0,05$, pelo teste de Mann-Whitney (Figura 12).

Figura 12. Avaliação do poder redutor plasmático de portadores de Alzheimer na faixa etária de 60 a 85 anos.



Os valores representam a média de 12 experimentos \pm E.P.

E ó C = Experimento ó Controle, D.O. = Densidade óptica (570nm).

[A] Ácido Ascórbico = 2,82 μ g, Alfa-tocoferol = 3,45 μ g, Beta-Caroteno = 0,09 μ g;

[B] Ácido Ascórbico = 5,64 μ g, Alfa-tocoferol = 6,90 μ g, Beta-Caroteno = 0,18 μ g;

[C] Ácido Ascórbico = 14,09 μ g, Alfa-tocoferol = 17,23 μ g, Beta-Caroteno = 0,43 μ g;

[D] Ácido Ascórbico = 28,18 μ g, Alfa-tocoferol = 34,46 μ g, Beta-Caroteno = 0,86 μ g

[A], [B], [C] e [D] são significativos ($p < 0,05$) quando comparados ao Controle pelo teste Mann-Whitney.

Sabemos que no compartimento plasmático existem substâncias antioxidantes que poderiam estar aumentadas interferindo nos resultados vistos na Figura 12. Assim, os conteúdos de albumina e ácido úrico foram dosados de cada doador. Nossos resultados mostram que os doadores se encontraram na faixa de normalidade para albumina, dentro dos valores de referência de 3,5 a 5,5 g/dL, como demonstrado na Figura 13. Os valores para ácido úrico, em que a faixa de referência é de 2,4 a 5,7 mg/dL para mulheres e 3,4 a 7 mg/dL para homens, enquadraram nossos doadores, como demonstrado nas Figuras 14 e 15, respectivamente.

Figura 13. Dosagem de albumina plasmática de doadores com Alzheimer na faixa etária de 60-85 anos.

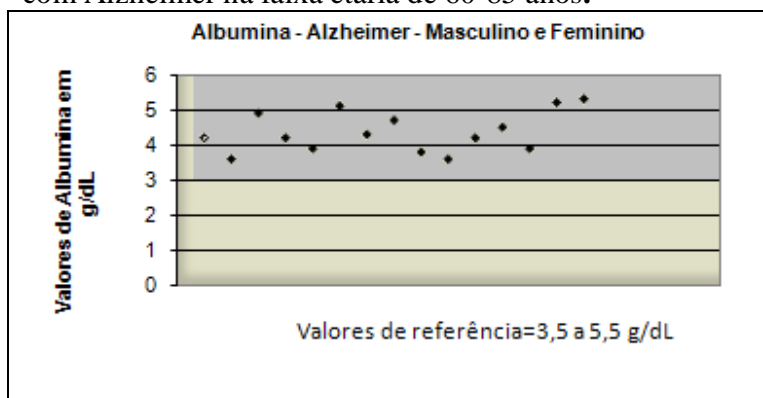


Figura 14. Dosagem de ácido úrico plasmático de doadores do sexo feminino com Alzheimer.

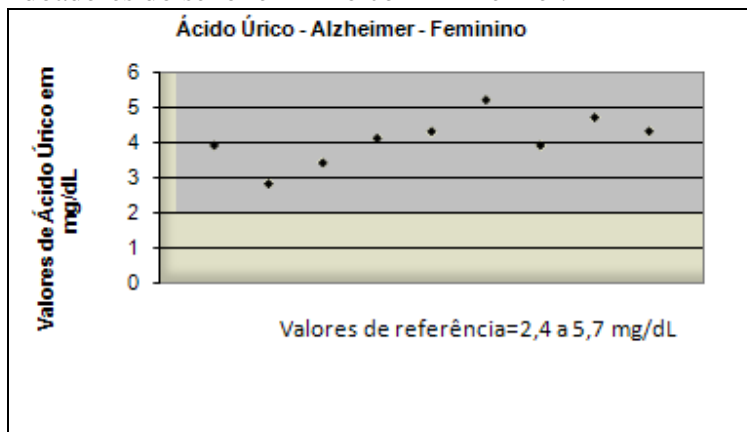
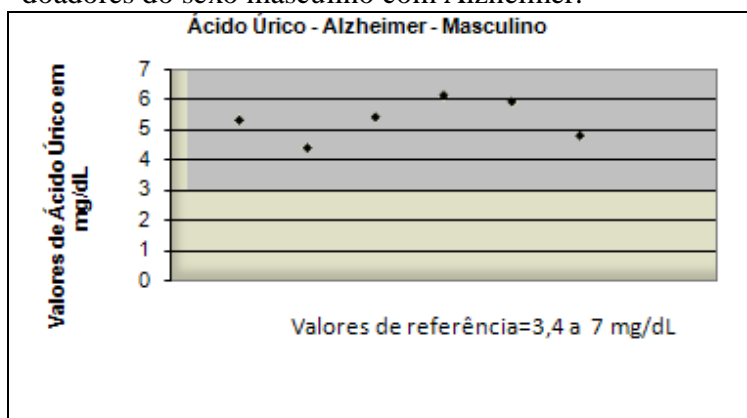
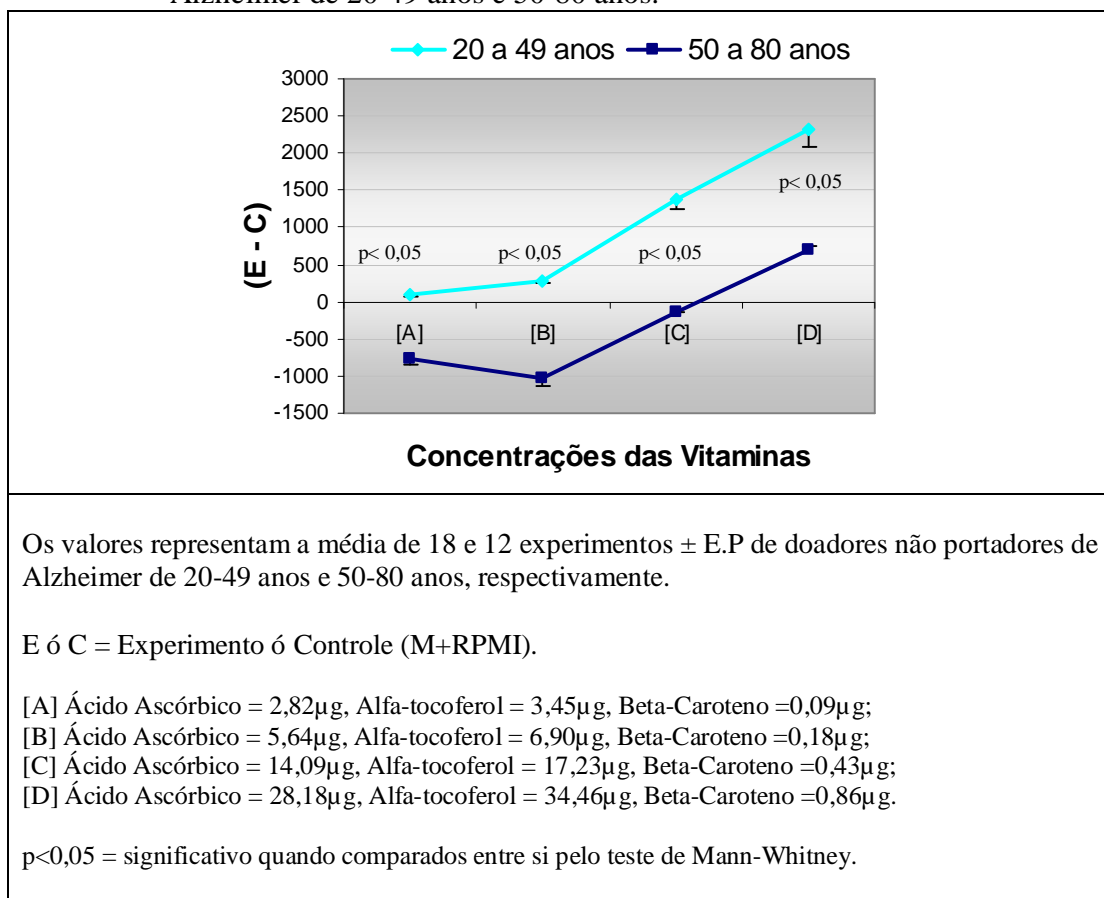


Figura 15. Dosagem de ácido úrico plasmático de doadores do sexo masculino com Alzheimer.



Como visto até o presente momento o envelhecimento por si só altera a reatividade celular demonstrando alterações na capacidade anti e pró-oxidante do complexo vitamínico. Esta alteração foi também observada quando avaliamos os portadores de Alzheimer. Assim o nosso próximo passo foi o de verificar se estas diferenças entre as faixas etárias durante o processo de envelhecimento seriam significativas e também as possíveis diferenças quando comparadas aos portadores de Alzheimer. A Figura 16 compara os perfis oxidativos entre as faixas etárias de doadores não portadores de Alzheimer. O painel A demonstra que todas as doses do complexo vitamínico foram significativamente diferentes $p < 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney entre as faixas de 20 a 49 anos e 50 a 80 anos. Ao analisar a figura 16, verificamos que a curva da faixa etária de 50-80 anos está abaixo da faixa de 20-49 anos demonstrando maior poder antioxidante das vitaminas nesta faixa etária.

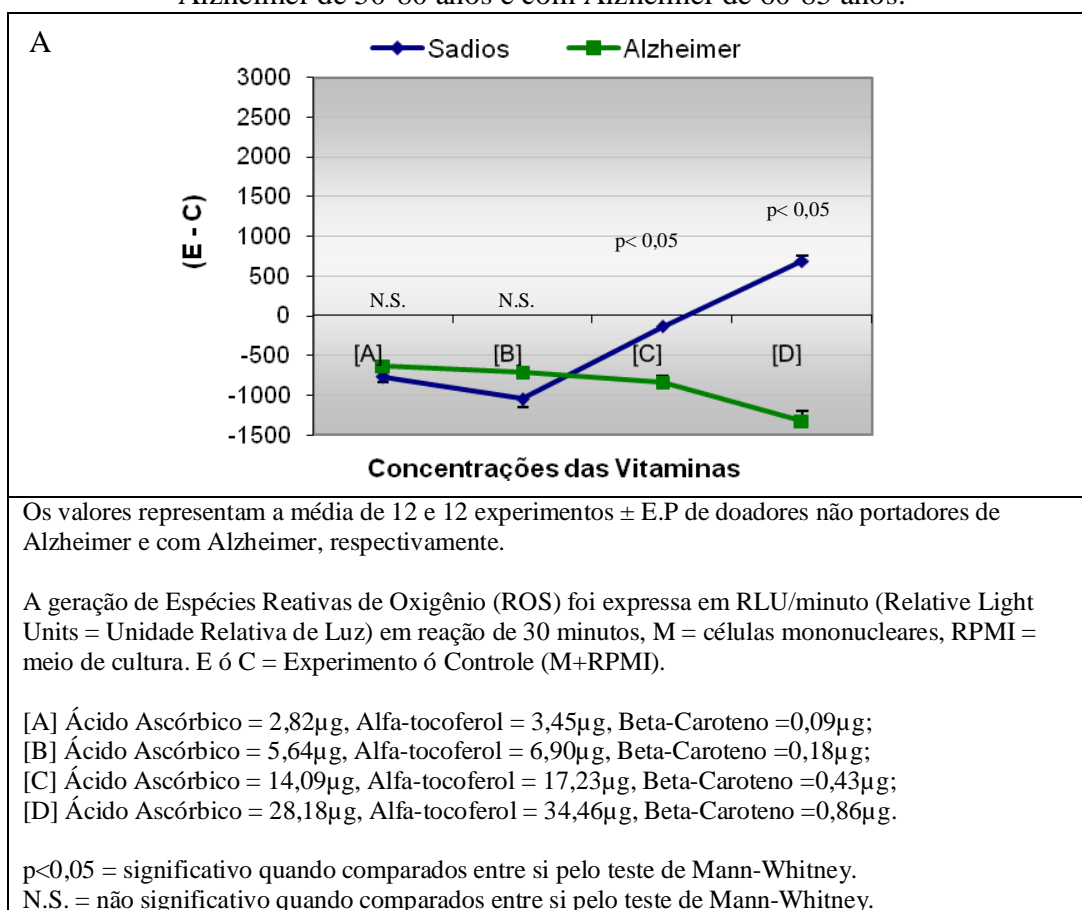
Figura 16. Comparação entre os perfis oxidativos de doadores não portadores de Alzheimer de 20-49 anos e 50-80 anos.



Após comparação das faixas etárias de doadores saudáveis, comparamos pacientes com Alzheimer e pacientes não portadores de Alzheimer da mesma faixa etária a fim de verificar se os compartimentos oxidativos e redutores desta população de pacientes era influenciado pelo complexo vitamínico. A Figura 17, mostra a diferença no perfil de doadores não portadores de Alzheimer e com Alzheimer nas concentrações [C] e [D], significativas $p < 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney, do complexo de vitaminas. As linhas têm inicialmente trajetórias iguais nas doses [A] e [B], as quais não tiveram diferença significativa nos dois grupos, $p > 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney, e trajetórias opostas a partir da dose [C]. O complexo vitamínico tem efeito antioxidante nos pacientes com

Alzheimer, indicado pela curva descendente e efeito pró-oxidante em não portadores de Alzheimer de mesma faixa etária, indicado pela curva ascendente.

Figura 17. Comparação entre os perfis oxidativos de doadores não portadores de Alzheimer de 50-80 anos e com Alzheimer de 60-85 anos.

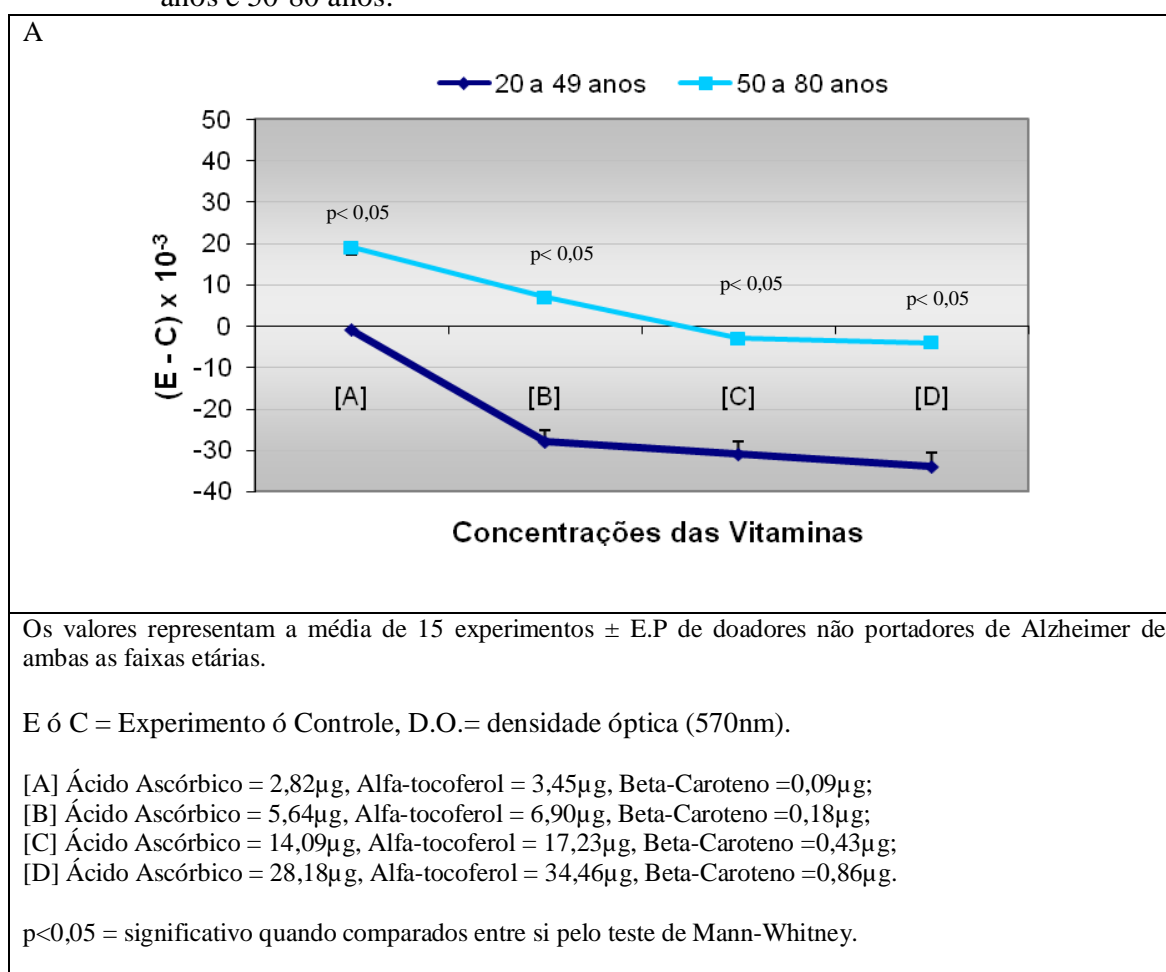


Após análise do compartimento oxidativo das faixas etárias, prosseguirmos nossa análise comparativa dos grupos e faixas etárias em seus poderes redutores, celulares e plasmáticos.

A Figura 18 compara o poder redutor celular de doadores saudáveis de 20-49 anos e 50-80 anos. No painel A, percebemos que doadores não portadores de Alzheimer tem o mesmo perfil redutor celular quando as faixas etárias são comparadas. Verificamos,

entretanto, que a capacidade redutora celular é mais eficiente na faixa etária de 20-49 anos. Quando comparamos concentração por concentração de ambas as faixas etárias verificamos que em todas, a saber [A], [B], [C] e [D] do complexo vitamínico, há diferença significativa, entre estas, $p < 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney.

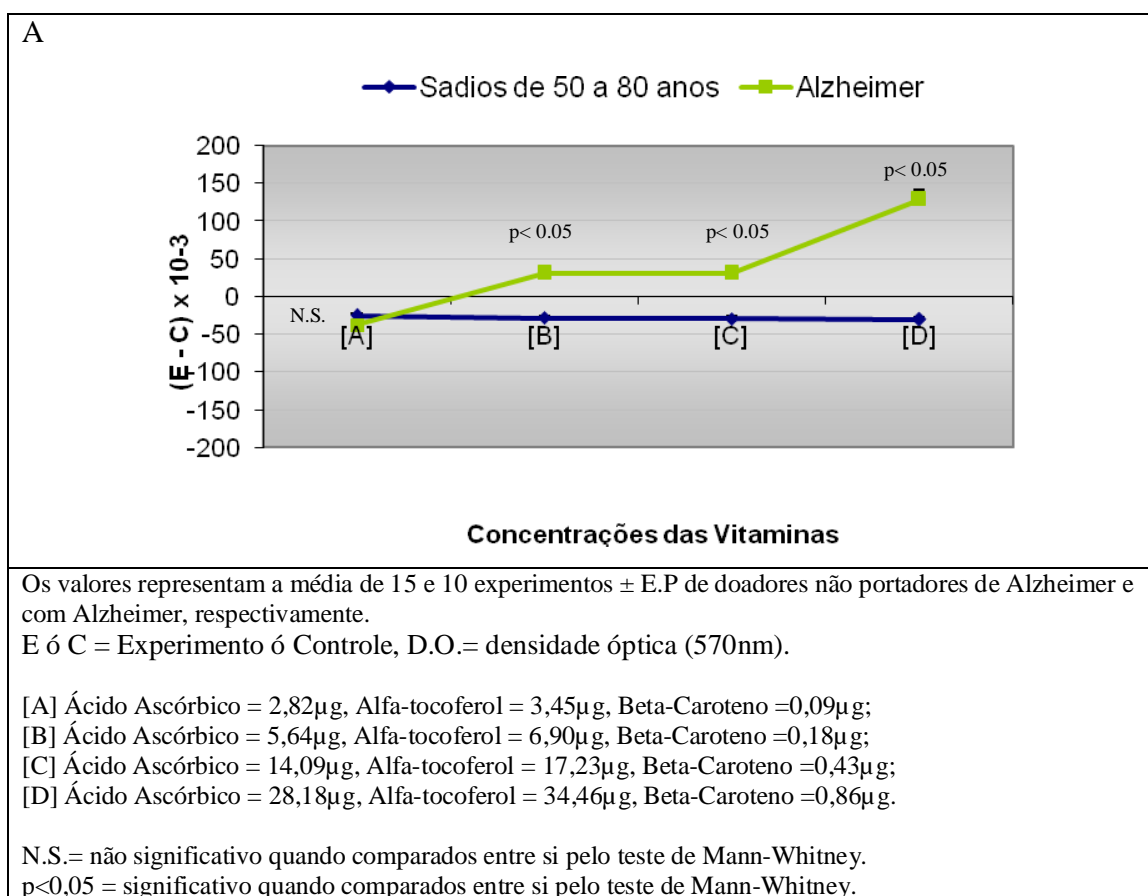
Figura 18. Comparação entre os perfis redutores celulares de doadores sadios de 20-49 anos e 50-80 anos.



Continuando a análise do poder redutor celular, comparamos os doadores não portadores de Alzheimer de 50-80 anos e pacientes com Alzheimer, de 60-85 anos (Figura 19).

Todas as concentrações foram significativamente diferentes entre os dois grupos, $p < 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney, exceto na concentração [A]. A curva de não portadores é próxima de zero e a de Alzheimer é positiva demonstrando aumento do poder redutor celular deste último. A tendência da curva de Alzheimer é aumentar o poder redutor com o aumento da concentração do complexo vitamínico, enquanto a curva dos sadios de 50 a 80 anos tem perfil linear, a qual recebe menos influência das vitaminas.

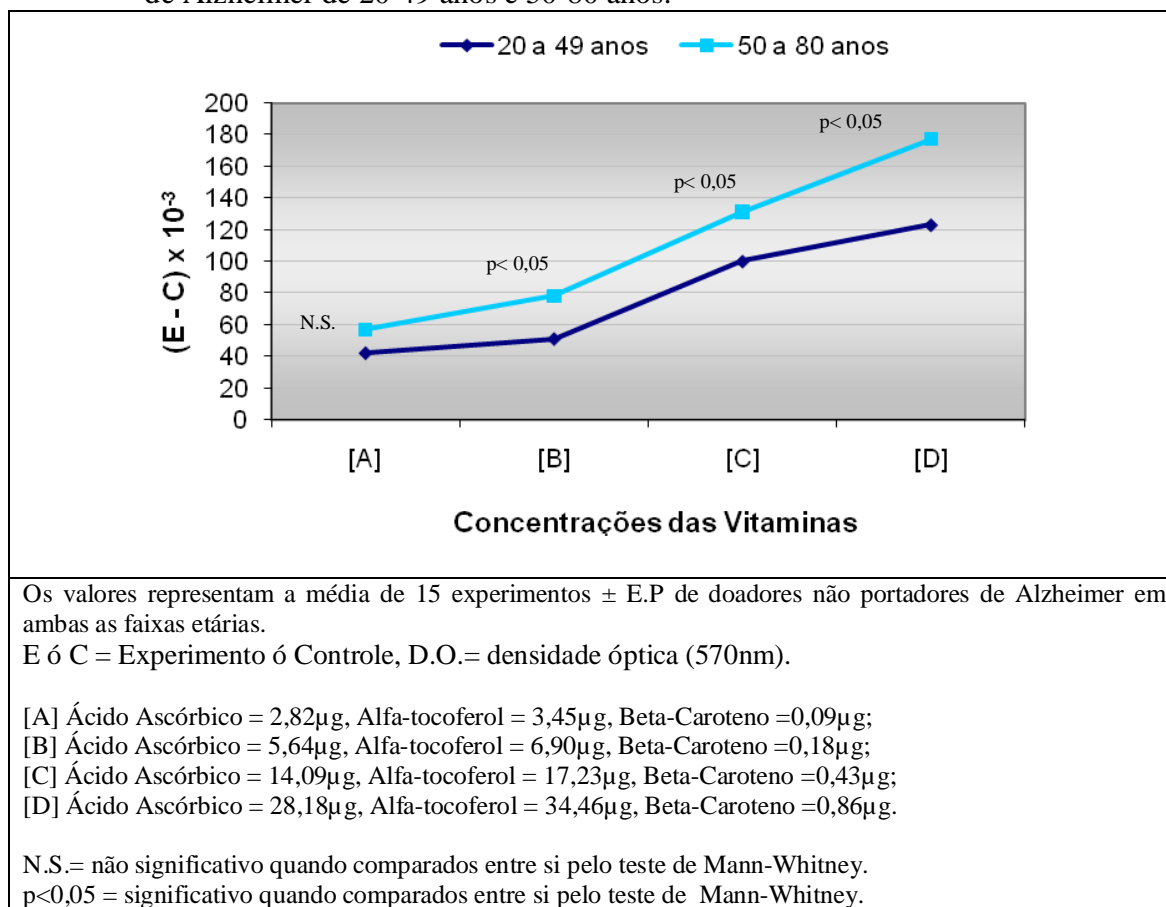
Figura 19. Comparação entre os perfis redutores celulares de doadores sadios de 50-80 anos e com Alzheimer de 60-85 anos.



Após análise do poder redutor celular das faixas etárias de doadores não portadores de Alzheimer e de doadores com Alzheimer, analisamos o poder redutor plasmático, visto que um compartimento complementa o outro em suas ações oxidantes.

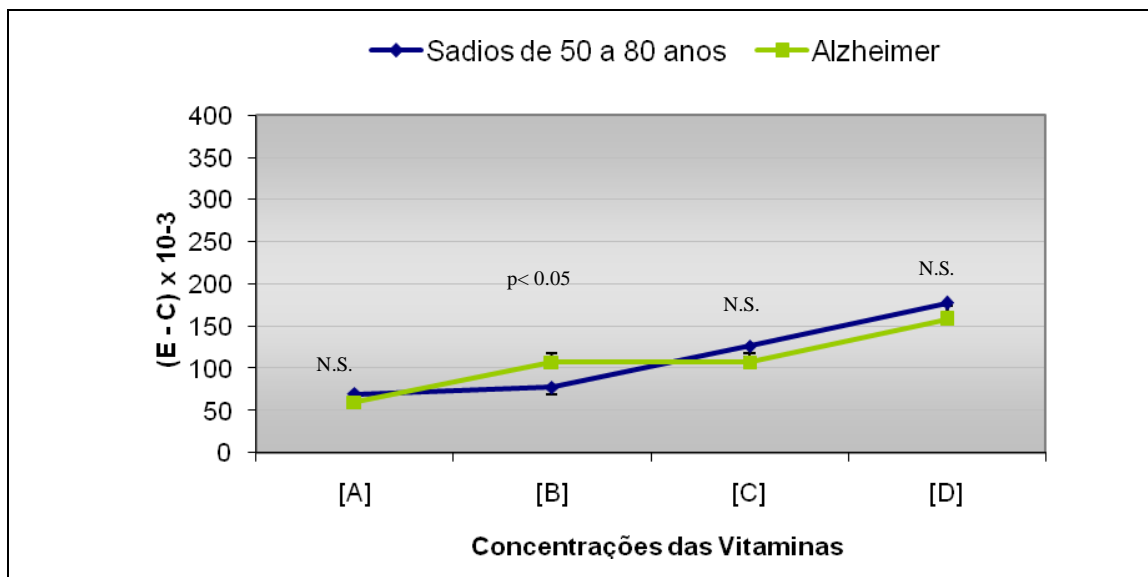
A Figura 20 compara as faixas etárias (20-49 anos e 50-80 anos) dos doadores não portadores de Alzheimer. Percebemos que a dose [A] não difere significativamente, $p > 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney, entre as faixas etárias. As concentrações [B], [C] e [D] são diferentes com significância $p < 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney. As vitaminas foram mais efetivas em aumentar o poder redutor plasmático da faixa etária de 50 a 80 anos e menos efetivas sobre poder redutor plasmático da faixa entre 20 e 49 anos.

Figura 20. Comparação entre os perfis redutores plasmáticos de doadores não portadores de Alzheimer de 20-49 anos e 50-80 anos.



Com relação à comparação de doadores não portadores de Alzheimer de 50 a 80 anos e doadores com Alzheimer, houve diferença significativa apenas na concentração [B], $p < 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney. As outras concentrações: [A], abaixo da recomendação, [C] intermediária e [D], suplementada, não foram diferentes significativamente, $p > 0,05$ por Mann-Whitney, confirmando um perfil redutor plasmático semelhante.

Figura 21. Comparação entre os perfis redutores plasmáticos de doadores não portadores de Alzheimer de 50-80 anos e com Alzheimer de 60-85 anos.



Os valores representam a média de 15 e 10 experimentos \pm E.P de doadores não portadores de Alzheimer e com Alzheimer, respectivamente.

E ó C = Experimento ó Controle, D.O.= densidade óptica (570nm).

[A] Ácido Ascórbico = 2,82 μ g, Alfa-tocoferol = 3,45 μ g, Beta-Caroteno =0,09 μ g;

[B] Ácido Ascórbico = 5,64 μ g, Alfa-tocoferol = 6,90 μ g, Beta-Caroteno =0,18 μ g;

[C] Ácido Ascórbico = 14,09 μ g, Alfa-tocoferol = 17,23 μ g, Beta-Caroteno =0,43 μ g;

[D] Ácido Ascórbico = 28,18 μ g, Alfa-tocoferol = 34,46 μ g, Beta-Caroteno =0,86 μ g.

p<0,05 = significativo quando comparados entre si pelo teste de Mann-Whitney.

N.S. = não significativo quando comparados entre si pelo teste de Mann-Whitney

6- DISCUSSÃO

A vida aeróbica depende da combustão controlada de energia e esta é controlada, catalisada e regulada por uma maquinaria metabólica que pode ser danificada por reações oxidativas incontroláveis associadas com a produção de energia. Devido à extrema ameaça desta oxidação, seres aeróbios desenvolveram um sistema antioxidante complexo para controlar essas reações e reparar ou substituir a maquinaria afetada (JONES, 2006).

Os radicais livres se formam durante toda nossa vida, mas são mais sentidos da idade adulta em diante. Várias substâncias contribuem para o combate aos radicais livres, entre elas o pantotenato de cálcio, as vitaminas A, E e B6, que agem contra os peróxidos lipídicos, e a vitamina C, que protege as vitaminas A e E dos processos oxidativos, varrendo os radicais hidroxila, que são os radicais livres responsáveis pelas agressões às células e conseqüente envelhecimento de nosso organismo.

Os antioxidantes têm papel vital na defesa dos sistemas contra o estresse oxidativo induzido por espécies reativas de oxigênio. As vitaminas C, E e beta-caroteno são conhecidas particularmente como importantes em seus papéis de manter a saúde e prevenir doenças.

Os estudos sobre os antioxidantes têm ressaltado, principalmente, o uso de nutrientes isolados no tratamento e prevenção de doenças. Entretanto, nos alimentos é encontrada uma grande variedade de substâncias que podem atuar em sinergismo na proteção das células e tecidos (NIKI *et. al.*, 1995; HERCBERG *et. al.*, 2004).

Assim, diante do fator cooperador entre as vitaminas C, E e A freqüentemente mencionado na literatura, que mostra a interação dessas vitaminas é efetiva na inibição da peroxidação dos lipídeos da membrana e na proteção do DNA, suas utilizações em conjunto tornam-se mais efetivas.(HAMILTON *et. al.*, 2000, FOTOUHI *et. al.*, 1996; NIKI *et. al.*,

1995). Diante disso, nos nossos estudos utilizamos um complexo vitamínico contendo ácido ascórbico, alfa-tocoferol e beta-caroteno.

Escolhemos para este estudo a avaliação de dois compartimentos, a saber, celular e plasmático. O estudo conjunto nestes dois compartimentos nos deu uma visão mais detalhada do real efeito do complexo vitamínico quanto ao seu poder anti e pró-oxidante uma vez que os estudos da literatura não fazem esta avaliação em conjunto. Neste contexto, as células mononucleares vem sendo estudadas com o propósito de serem utilizadas para diagnóstico. A vantagem deste tipo de célula é sua acessibilidade e fácil isolamento do sangue. Vários estudos têm caracterizado as células mononucleares como relatoras de efeitos nutricionais específicos, metabolismo e controle homeostático, levando à prevenção de doenças e intervenções precoces. Portanto, a habilidade de detectar mudanças induzidas pela dieta na expressão destas células pode ser não só valioso para a identificação de mecanismos moleculares baseados na nutrição, mas também importante no estudo de desordens crônicas relativas à dieta. (BOUWENS *et. al.*, 2007). Outra possível correlação que podemos inferir ao estudar estas células é o efeito das vitaminas sobre a resposta específica do sistema imunológico.

Assim, em decorrência do exposto acima, a nossa primeira indagação consistiu: As vitaminas ora estudadas podem ter efeito dual (anti e pró-oxidante) em células mononucleares dose dependente?

Para respondermos esta pergunta começamos nosso estudo avaliando células mononucleares de doadores não portadores de Alzheimer na faixa etária de 20-80 anos. Nossos resultados mostraram que o complexo de vitaminas, na faixa etária estudada, exerce efeito antioxidante em doses abaixo da recomendada [A] e recomendada [B], como também efeito pró-oxidante nas doses intermediária [C] e suplementada [D] (Tabela 7). Assim,

nossos resultados mostraram que em células mononucleares existe um efeito dual anti e pró-oxidante quando estas são incubadas com o complexo vitamínico. Nossos resultados estão de acordo com Palozza *et. al.*, 2006 o qual encontraram um efeito pró e anti-oxidante com a suplementação de beta-caroteno e alfa-tocoferol em pulmões de doadores fumantes e não fumantes em diferentes pressões de oxigênio. De acordo com Zureik *et. al.*, 2008 (Estudo da American Heart Association) não há efeito benéfico no uso a longo termo e em pequenas doses de vitaminas suplementadas na estrutura da carótida ou rigidez arterial. Bjelakovic *et. al.*, 2008, concluíram em sua revisão, após análise de 67 artigos, a não ação benéfica dos antioxidantes em população saudável ou com doenças, sendo que o beta-caroteno e vitamina E aumentaram a mortalidade. Este resultado é apoiado por Crisostomo *et. al.*, 2007, e Miller *et. al.*, 2005, que observaram aumento de mortalidade geral com o uso de vitamina E. Entretanto, Evans & Halliwell, 2001, não encontraram efeitos danosos com a suplementação de 500mg/dia de vitamina C, mas também não viram benefícios. Nossos resultados corroboraram com ambos os achados descritos na literatura que demonstraram um efeito antioxidante e pró-oxidante das vitaminas.

Entretanto os resultados encontrados acima onde demonstraram a capacidade pró-oxidante do complexo vitamínico podem não ser validados se não forem avaliadas as capacidades redutoras celulares destes doadores uma vez que estudos realizados por Chaves *et.al.*, 1998, demonstraram a importância do balanço oxidante redutor para a manutenção do equilíbrio metabólico. Neste contexto, os resultados da Figura 4 mostram que o complexo vitamínico diminuiu significativamente $p < 0,05$ a capacidade redutora celular nas concentrações recomendada [B], intermediária [C] e suplementada [D] o que pode gerar um desequilíbrio no balanço oxidante redutor proporcionado um ambiente propício para o desenvolvimento de um estresse oxidativo. Entretanto, para uma avaliação completa foi

necessária a inclusão da avaliação do poder redutor plasmático. O compartimento plasmático tem sido utilizado corriqueiramente para estudo das vitaminas, para avaliar o resultado da ingestão oral e reflexo da metabolização através de dosagem plasmática.

Hercberg *et. al.*, 2004, utilizaram o plasma como avaliador da suplementação de vitaminas e minerais. Este estudo nos auxiliou na estimativa das correspondências orais e plasmáticas das doses de vitaminas utilizadas no nosso estudo. Hallfrisch *et. al.*, 1994 foram mais próximo do nosso proposto avaliando beta-caroteno e alfa-tocoferol não só em linfócitos, como também no plasma. Foram encontrados níveis baixos e extremamente altos de ambas as vitaminas, diversificando a necessidade na população. Os nossos resultados demonstraram um efeito antioxidante provocado pelas vitaminas no plasma. Apesar de não haver dosagem das vitaminas estudadas, como os outros estudos fizeram, nossa proposta foi inovadora no sentido de determinar a necessidade de um complexo vitamínico como antioxidante. Como mostrado na Figura 5, os maiores níveis do complexo de vitaminas resultaram em maiores aumentos no poder redutor plasmático.

No entanto, outro ponto passível de discussão em relação a este aumento da capacidade redutora plasmática seria se este aumento era devido a atuação das vitaminas ou não poderia estar relacionado com o aumento de albumina e ácido úrico substâncias sabidamente anti-oxidantes na população estudada (SIES, 1993 e ISHIZAKA *et. al.*, 2006). As Figuras 6, 7 e 8 mostraram que os valores de albumina e ácido úrico foram normais para todos os doadores, demonstrando assim não haver aumento destes antioxidantes no plasma o que poderia gerar conclusões errôneas.

Assim, de posse dos resultados encontrados até o presente momento, verificamos que a ingestão de vitaminas em dose suplementada pode gerar um desequilíbrio metabólico a nível celular produzindo um estresse metabólico que por nossos resultados não foi

percebido pelo plasma. Estes dados tornam-se preocupantes à medida que as avaliações quanto a eficácia do poder anti-oxidante das vitaminas são realizadas através de dosagens plasmáticas.

Sabe-se que o processo de envelhecimento envolve numerosas reações bioquímicas com alterações moleculares em cada célula como bem em todo o organismo. O envelhecimento reflete o somatório de todas as mudanças que ocorrem no homem durante a vida podendo levar a um estado patológico. A associação da idade com a diminuição da função do sistema imune aumenta a suscetibilidade a doenças infecciosas, câncer e doenças degenerativas. Neste contexto, achamos que seria importante verificarmos se ao dividir nossa população em duas faixas etárias a saber 20-49 anos (adultos) e 50-80 (adultos e idosos) teríamos diferença no padrão até agora encontrado. Este questionamento se faz pertinente pois resultados do laboratório demonstraram que estudos com faixas etárias de 20-50 anos divididos de 10 em 10 anos, quanto ao seu poder oxidante e redutor, os autores verificaram que a partir dos 40 anos ocorre um desequilíbrio entre a capacidade oxidante e redutora celular em granulócitos humanos (CHAVES *et. al.*, 1998). Chaves *et. al.*, 2000 demonstraram ainda uma diferente produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio durante o processo de envelhecimento, demonstrando que as mudanças iniciavam a partir de 40 anos para a produção de (ROS) e a partir de 50 anos para a produção de (RNS). Em 2002, Chaves *et. al.*, demonstraram que a produção de radicais livres por granulócitos era diferenciada a partir dos 50 anos. Assim, como verificamos este efeito dual em doadores de uma faixa etária onde os doadores eram de 20-80 anos surgiu o seguinte questionamento: seria este mesmo efeito observado quando esta população fosse dividida em duas faixas etárias distintas ou este efeito era representativo da população como um todo? Dessa

maneira, como foi verificado que a maioria das alterações ocorria a partir dos 50 anos resolvemos dividir a nossa população em duas faixas etárias : 20-49 e 50-80 anos.

Nossos resultados mostraram que ao dividirmos a nossa população inicial em dois grupos verificamos que doadores não portadores de Alzheimer, entre 20 e 49 anos, apresentaram um perfil distinto da população inicial. A incubação de células mononucleares com as quatro concentrações de vitaminas gerou um aumento da produção de radicais livres que foi significativo $p < 0,05$ a partir da dose intermediária [C](Tabela 8). Este aumento na produção destas espécies oxidantes pode gerar um estresse oxidativo prejudicando a resposta imunológica destes doadores. Na literatura existem poucos relatos dos efeitos da ingestão de vitaminas em doadores jovens sem doenças associadas, entretanto estudos relatam que mesmo assim o consumo de suplementos vitamínicos nesta faixa etária é alto (SANTOS *et. al.*, 2002).

Entretanto, na literatura verificamos que existem vários questionamentos quanto à ingestão de antioxidantes artificiais em populações mais idosas ou com complicações cardíacas, fumo, câncer, diabetes e outras doenças associadas (STANNER *et.al.*, 2009; MILLER *et. al.*, 2005).

Neste contexto, verificamos que ao estudarmos células mononucleares, os doadores na faixa etária de 50-80 anos, demonstraram um perfil antioxidante em doses abaixo da recomendada [A] e recomendada [B] do complexo vitamínico, como também efeito pró-oxidante em dose suplementada [D], como mostra a Tabela 9. Estes resultados mostraram que o processo de envelhecimento modifica a reatividade celular provocando uma alteração no aproveitamento das vitaminas ingeridas na alimentação. Entretanto, este déficit deve ser avaliado com cuidado, pois pelos nossos resultados doses suplementares podem ser de grande prejuízo para esta faixa etária. Nossos resultados estão de acordo com a literatura.

Daudu *et. al.*, 1994 , não encontraram qualquer benefício na suplementação com beta-caroteno em mulheres adultas. Órgãos como a Sociedade Americana do Câncer e Associação Cardíaca Americana, não indicam doses acima das recomendações de vitaminas, sugerindo formas naturais de antioxidantes (U.S. Preventive Services Task Force, 2003)

Diante destas constatações se fez necessário mais uma vez não só o estudo do compartimento oxidativo, mas também do compartimento redutor. Nossos resultados mostraram que todas as concentrações do complexo vitamínico diminuíram o poder redutor das células de doadores de 20-49 anos, entretanto, estas mesmas concentrações aumentaram o poder redutor plasmático (Figura 9 - painéis A e B). Assim podemos verificar que nesta faixa etária a ingestão deste complexo vitamínico gera um estresse metabólico celular que não é mostrado pelo plasma. Jones summer/2006 aponta que os estudos envolvendo radicais livres tem sido inconclusivos devido à restrita definição de que estresse oxidativo é definido como um balanço único e global. Ele sugere, então, uma definição mais ampla para o estresse oxidativo envolvendo condições também dos compartimentos redutores. Tal definição, fornece uma avaliação mais significativa dos mecanismos de estresse oxidativo. Este pensamento já vem sendo aplicado em nosso laboratório desde 1998, onde nossos estudos sempre levam em conta o balanço oxidante e redutor. Por isso nossa opção em avaliar ambos os compartimentos.

Avaliando, a faixa etária de 50-80 anos em doadores não portadores de Alzheimer observamos o mesmo perfil, diminuição do poder redutor celular à medida que aumentamos a concentração do complexo vitamínico. Nenhuma das doses do complexo vitamínico foi significativa, mas demonstram uma tendência à redução. Na análise do poder redutor plasmático verificamos mais uma vez o aumento da capacidade redutora com o

aumento das concentrações do complexo de vitaminas de [A] a [D]. Estes resultados em conjunto mostram que existe a geração de um estresse oxidativo a nível celular que não é percebido pelo plasma. Assim o problema desta faixa etária é a pouca capacidade em lidar com o excesso de vitaminas gerado pela suplementação. Enquanto a faixa etária de 20-49 anos consegue eliminar os excessos sem provocar maiores danos, os indivíduos de 50-80 anos têm um compartimento redutor prejudicado, não conseguindo eliminar eficientemente os excessos, os quais acabam gerando mais espécies reativas e maiores danos celulares e moleculares. Isso já havia sido constatado por Chaves *et. al.*, 1998, que o grupo de 50-59 anos demonstrou diminuição no poder redutor gerando uma deficiência no balanço oxidante/redutor.

Após termos constatado que existe um estresse metabólico no compartimento celular principalmente de doadores na faixa etária de 50-80 anos resolvemos averiguar se este desequilíbrio metabólico também poderia estar presente em uma doença relacionada ao envelhecimento. Partindo desta premissa e pelos achados da literatura onde doenças neurodegenerativas apresentam um aumento de espécies oxidantes, resolvemos direcionar nossos estudos neste sentido. Existe um grande interesse no papel da nutrição em doenças relacionadas ao envelhecimento como a demência, e principalmente a ocorrência de Alzheimer. Até recentemente evidências sugerem que alimentos e componentes alimentares contribuem para a prevenção e diminuição do risco para Alzheimer. O paciente com Alzheimer parece ser deficiente em nutrientes específicos, o que poderia muito bem ser consequência do processo patológico ou reflexo de baixa ingestão combinada com reduzida biodisponibilidade (VAN DER BEEK & KAMOHUIS, 2008). Lin & Beal, 2006, confirmaram os achados da literatura que demonstraram que o paciente com Alzheimer é

caracterizado por uma disfunção mitocondrial e apresenta um estado de estresse oxidativo que precede à doença e permanece durante a sua evolução.

Neste contexto, buscamos avaliar se a ingestão do complexo contendo vitaminas C, alfa-tocoferol e beta-caroteno seria prejudicial ou benéfico para estes pacientes e para isto avaliamos os compartimentos oxidativos (celular) e redutores (celular e plasmático).

Nossos resultados demonstraram uma significativa ($p < 0,05$) redução na produção de radicais livres, pelo teste de Mann-Whitney, por todas as concentrações estudadas (Tabela 10). Os doadores com Alzheimer parecem ter a necessidade destes antioxidantes e conseguiram melhorar o perfil oxidativo reduzindo a produção de radicais livres em relação à produção basal. Este resultado pode ser relacionado aos baixos níveis de alfa-tocoferol encontrados em 20 pacientes com Alzheimer no estudo de Marchasson *et. al.*, 2001. Mas, a literatura ainda se encontra em conflito, pois alguns autores não conseguiram associar a ingestão de suplementos vitamínicos, geralmente ácido ascórbico e alfa-tocoferol, com a diminuição do risco para desenvolvimento à doença de Alzheimer (LUCHSINGER *et. al.*, 2003 ; GRAY *et. al.*, 2008). Mas estariam os antioxidantes vitamínicos relacionados com uma melhora do perfil redutor após instalação da doença?

A fim de investigar mais profundamente, seguimos com a análise do perfil redutor celular e plasmático dos doadores com Alzheimer. O que pôde ser visto através da Figura 11 foi uma significativa melhora do poder redutor celular, $p < 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney em comparação com o basal. A concentração [A] não melhorou o poder redutor celular, demandando ao paciente com Alzheimer, doses recomendadas e acima de recomendadas das três vitaminas estudadas, em questão.

O poder redutor plasmático também teve um aumento significativo, $p < 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney, em todas as concentrações do complexo vitamínico indicando um

conjunto de reações que abrangeu a redução de poder oxidante e o aumento do poder redutor celular e plasmático simultaneamente (Figura 12). Os valores de albumina e ácido úrico dos doadores com Alzheimer também estavam na faixa de referência (Figuras 13-15) resultado, portanto, que não interferiu no poder redutor plasmáticos desses doadores. Estes achados também foram demonstrados por Wang *et. al.*, 2004. Sabemos que somente os ensaios *in vitro* não podem ser conclusivos para detectar alterações que ocorrem *in vivo*, mas estes nos dão indícios do que pode estar ocorrendo *in vivo* e nos dão suporte para direcionarmos os próximos estudos. Assim os nossos estudos somados aos já existentes na literatura sugerem que um maior aporte vitamínico para esses pacientes, poderia ajudar não apenas na busca do adiamento da doença, mas ser um auxílio na qualidade de vida, e melhora das funções cognitivas destes. Neste sentido, Viña *et. al.*, 2004 observaram melhoras cognitivas em pacientes com Alzheimer após suplementação com vitamina E. O mesmo foi descrito por Praticó, 2008 que observou uma melhora cognitiva após suplementação com vitamina C e E. Entretanto outros estudos verificaram efeitos benéficos, mas um possível efeito danoso causado por excesso de vitamina E, a qual pode tornar-se oxidativa.

Como visto até o presente momento o envelhecimento por si só altera a reatividade celular demonstrando alterações na capacidade anti e pro-oxidante do complexo vitamínico. Esta alteração foi também observada quando avaliamos os portadores de Alzheimer. Para podermos quantificar estas diferenças nosso próximo passo foi realizar as comparações entre as faixas etárias para avaliarmos o efeito do envelhecimento sobre a necessidade de suplementação com vitaminas e num processo neurodegenerativo como o Alzheimer.

Assim nosso primeiro passo foi compararmos as faixas etárias de 20-49 e 50-80 anos de doadores não portadores de Alzheimer, em cada concentração do complexo vitamínico.

A Figura 16, mostra que na concentração abaixo da recomendada [A] ocorreu uma diminuição do poder oxidante da faixa de 50-80 anos significativo $p < 0,05$ em relação à faixa etária de 20-49 anos. Esta diferença foi exacerbada a partir da concentração recomendada [B]. Ao compararmos a concentração intermediária [C] esta mostrou uma diferença significativa $p < 0,05$ entre as duas faixas etárias mas apresentou um perfil diferenciado onde ocorreu uma exacerbção do poder oxidante na faixa etária de 20-49 anos e um início de reversão do poder anti-oxidante na faixa etária de 50-80 anos. Na concentração suplementada [D] encontramos também diferenças significativas $p < 0,05$ entre as faixas etárias mas o perfil de ambas foi pró-oxidante.

Estes dados confirmam que a reatividade celular de doadores na faixa etária de 50-80 anos sofre a interferência do processo de envelhecimento e podemos verificar também que existe uma deficiência de vitaminas na dose recomendada desta faixa etária. Entretanto deve-se observar atentamente que esta deficiência não pode ser corrigida através da dose suplementada pois podemos obter um resultado pró-oxidante ao invés de anti-oxidante.

Na faixa etária de 20-49 anos em todas as doses estudadas, o efeito foi pró-oxidante (Figura 16). Entretanto este efeito pró-oxidante das vitaminas para indivíduos da faixa etária de 20-49 anos, pode não ser tão maléfico por esta faixa etária ter um equilíbrio oxidante redutor satisfatório como demonstrado por Chaves *et. al.*, 1998, onde indivíduos de 20-39 anos tem um balanço oxidativo/redutor adequado e indivíduos de 40-49 anos geram mais espécies oxidativas mas não perdem o poder redutor. Este mesmo trabalho também mostra que a partir dos 50 anos, além de aumentar a produção oxidativa, diminui o poder redutor. Nesse aspecto, as vitaminas suplementadas para a faixa etária de 50-80 anos podem tornar-se perigosas já que o poder em reduzir a pró-oxidação provocada pelo excesso das vitaminas está comprometido.

Outro aspecto importante que tem que ser levado em conta é o efeito desta suplementação sobre a resposta específica do sistema imune. Dentre as teorias que procuram explicar o envelhecimento, existem as teorias do desequilíbrio gradual que, afirmam que o cérebro, as glândulas endócrinas e o sistema imunológico começam a deixar de funcionar gradualmente. Deficiências do sistema imunológico deixam os indivíduos idosos vulneráveis a doenças de vários tipos, à chamada senilidade, ou seja envelhecimento com doença. O outro tipo de envelhecimento chama-se senescência, que é o envelhecimento sem doença. O envelhecimento do sistema imunológico recebe o nome científico de imunosenescência em que todo o organismo sofre perda da sua capacidade com o avançar da idade do indivíduo, levando ao aparecimento de um número maior de infecções e resposta terapêutica menor, além do surgimento de cânceres. (CHANDRA,1999;MARKO *et. al.*,2007;DELAFUENTE,2002)

A progressiva involução do timo (glândula marcadora dos linfócitos T) tem importante papel no desenvolvimento da imunodeficiência dos idosos. Sabidamente, os linfócitos T dos idosos são deficientes quanto à sua capacidade para ativar, para proliferar e responder a um determinado antígeno. Com a idade, os linfócitos T diminuem a produção e secreção de interleucina-2 (citocina necessária ao recrutamento de outras células de defesa). (CHANDRA,1999;MARKO*et. al.*,2007)

O linfócito T helper ou auxiliar (CD4+) deficiente leva a uma resposta alterada dos anticorpos para antígenos. O recrutamento de macrófagos por células T também está diminuído nos idosos, assim como a quimiotaxia dos neutrófilos polimorfonucleares e a fagocitose. Este fato, pode ser explicado pela carência nutricional, geralmente presente nos idosos. A nutrição é um importante determinante da imunocompetência (capacidade de resposta do sistema imunológico). Em certos estados de deficiência relacionados à má

nutrição ocorre diminuição da resposta aos mitógenos e antígenos, das células CD4+ (linfócitos T-auxiliar ou helper) , da taxa CD4+/CD8+ (relação entre linfócitos auxiliares e supressores), da produção dos imunocomplexos, dos neutrófilos killing (NK) e hipersensibilidade tardia. Os micronutrientes melhoram a imunidade mediada por células e reduzem o estresse oxidativo. A ingestão de vitamina E em idosos saudáveis aumenta a proliferação de linfócitos e resposta de hipersensibilidade tardia, assim como diminui a formação de prostaglandinas imunossupressoras. A vitamina C regenera a forma antioxidante da vitamina E, sendo importante na destruição dos patógenos (bactérias e vírus) pelos neutrófilos. (LESOURD, 1999)

Como relatado por Denham, 1981, acreditava-se em benefícios de antioxidantes visando diminuir atividades oxidativas e seus danos durante o envelhecimento. Ainda acredita-se nessa teoria, mas iniciam as especulações de que populações saudáveis devem, sim, aumentar a quantidade de antioxidantes da dieta, mas em formas naturais e não artificiais. Dragsted *et. al.*, 2004 comprovaram que a ingestão de frutas e vegetais em quantidades recomendadas tem efeito nos marcadores oxidativos em proteínas plasmáticas, lipoproteínas e defesas enzimáticas. Os mesmos alimentos foram efetivos em aumentar os níveis séricos de vitamina C e beta-caroteno em 3521 sujeitos de 35 a 60 anos pelo estudo de Dauchet *et. al.*, 2008, mostrando a presença destas vitaminas no organismo de indivíduos da faixa etária estudada. Assim, nossos resultados caminham no sentido de concordar com os achados de Dragsted *et. al.*, 2004 que verificaram que a dose recomendada é benéfica para os idosos e a suplementada pode ser altamente prejudicial para esta faixa etária.

Nosso próximo passo foi comparar doadores não portadores de Alzheimer com portadores de Alzheimer a fim de verificarmos se a patologia do Alzheimer pode alterar a reatividade celular na faixa etária de 50-80 anos. A Figura 17 mostra que não existe diferença significativa ($p > 0,05$) entre células mononucleares de doadores portadores e não portadores de Alzheimer nas concentrações [A] e [B]. Estes resultados nos mostraram que a patologia não influencia a resposta metabólica de doadores não portadores de Alzheimer quanto ao seu poder anti-oxidante. Entretanto ao desafiar as células mononucleares de doadores portadores de Alzheimer com as concentrações [C] e [D] verificamos que estas apresentaram um comportamento distinto do observado em doadores não portadores de Alzheimer. As vitaminas nestas concentrações foram anti-oxidantes para os doadores com Alzheimer e se mostraram pró-oxidantes para doadores não portadores de Alzheimer (Figura 17).

Na literatura existem resultados contraditórios quanto à suplementação ou não de vitaminas para pacientes com Alzheimer. Em nosso estudo observamos uma significativa $p < 0,05$ redução na produção de espécies oxidantes com doses suplementadas das vitaminas C, alfa-tocoferol e beta-caroteno. Tal benefício pode ser corroborado por Marchasson *et al.*, 2001 que detectou níveis baixos de alfa-tocoferol em pacientes com Alzheimer em relação aos controles e portanto a necessidade do consumo de antioxidantes para redução da produção de radicais livres. Em compensação, há evidências de aumento da mortalidade por ingestão de doses suplementadas de vitamina E (BJELAKOVIC *et al.*, 2008; MILLER *et al.*, 2005; AMES & RITCHIE, 2007).

Assim, os nossos resultados analisados em conjunto com a literatura nos mostraram que a avaliação metabólica de patologias relacionadas com o envelhecimento tem que ser

feita com cuidado, em relação à questão da suplementação com vitaminas, pois podem apresentar particularidades, sendo influenciadas ou não pelo processo de envelhecimento.

Diante dos resultados acima, como estaria o perfil redutor celular? A Figura 18 mostra a comparação do perfil redutor celular de indivíduos não portadores de Alzheimer nas faixas etárias 20-49 e 50-80 anos na presença do complexo vitamínico. Observamos que em todas as concentrações ocorreram diferenças significativas ($p < 0,05$) quando as duas faixas etárias foram comparadas entre si. O perfil redutor mostrou diminuição na sua capacidade com o aumento das concentrações das vitaminas. Entretanto na faixa etária de 50-80 anos esta diminuição foi menos acentuada do que na faixa etária de 20-49 anos. Estes achados estão de acordo com os estudos de Chaves *et. al.*, 1998, 2000 e 2001, onde foi vista a deficiência no poder redutor celular a partir dos 50 anos de idade.

O poder redutor celular de pacientes com Alzheimer quando são comparados com os doadores não portadores de Alzheimer de 50-80 anos, também mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$), em todas as concentrações do complexo vitamínico, exceto na concentração [A], quando comparadas entre si. O perfil do paciente com Alzheimer é contrário ao doador sem a doença. Enquanto o doador portador de Alzheimer melhora seu perfil redutor celular com o aumento da concentração do complexo de vitaminas, os doadores sem Alzheimer diminuem o poder redutor celular. Esta melhora do poder redutor celular mostra que em patologias onde o comprometimento do estresse oxidativo é um fator importante para o desenvolvimento e manutenção da doença, terapias com anti-oxidantes poderiam ser testadas a fim de se gerar um equilíbrio metabólico.

Visando complementar a avaliação do poder redutor celular, comparamos o poder redutor plasmático dos grupos em questão. O plasma tem sido alvo da maioria dos estudos relacionados aos antioxidantes e radicais livres (HALLFRISCH *et. al.*, 1994; HERCBERG

et. al., 2004; MILLER *et. al.*, 1994; DAUCHET *et. al.*, 2008). O sistema antioxidante não enzimático localiza-se principalmente no plasma, daí o interesse neste compartimento. Ele é composto por um grupo de antioxidantes produzidos como a ubiquinona, glutathione, albumina e ácido úrico, como também os obtidos da dieta como as vitaminas E, C e carotenos. A natureza única do plasma humano, enquanto fonte não só de proteínas clássicas utilizadas no diagnóstico de doenças mas em nível de proteômica, torna esse biofluido um desafiante meio de investigação e aponta para o desenvolvimento de técnicas capazes de identificar biomarcadores mais específicos, inclusive o ambiente redox (VASCONCELOS *et. al.*, 2007).

Ao compararmos o poder redutor do plasma de doadores não portadores de Alzheimer, nas duas faixas etárias observamos, que as curvas de ambas as faixas etárias tem a mesma trajetória sendo a primeira concentração do complexo vitamínico, [A], a única que não foi significativa, $p < 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney, quando comparadas entre si. Notou-se que ambas as curvas foram ascendentes, indicando aumento do poder redutor plasmático com o aumento da concentração do complexo de vitaminas. Nesta avaliação, o complexo vitamínico foi mais efetivo em aumentar o poder redutor plasmático de indivíduos de 50-80 anos, com valores maiores que indivíduos de 20-49 anos.

Sugerimos que o poder redutor plasmático tem o intuito de compensar o poder redutor celular. Enquanto este último foi diminuindo com o aumento da concentração do complexo de vitaminas, o poder redutor plasmático foi aumentando em ambas as faixas etárias de doadores não portadores de Alzheimer. Mas a compensação dos sistemas antioxidantes entre eles pode não ser a melhor opção para o organismo. Halliwell, 2007, pontuou que a manutenção de defesas antioxidantes em excesso tem um custo energético alto. Seu papel está mais relacionado com o controle do nível de radicais livres que sua

eliminação. Seria mais compensador reparar ou substituir as moléculas danificadas, e, além do mais, os antioxidantes nem sempre são eficientes em interceptar a ação das espécies oxidantes.

O estímulo maior do poder redutor no plasma pode ter explicação embasada no estudo de Duarte & Lunec, 2005, que comprovaram uma saturação de vitamina C em células mononucleares antes da saturação no plasma. O beta-caroteno não teve diferenças significativas no plasma ou em células mononucleares, relatado por Fotouhi *et. al.*, 1996. A vitamina E aumentou três vezes no plasma e em células mononucleares de doadores idosos no estudo de Meydani *et. al.*, 1990, após suplementação, mostrando alteração igual em ambos os compartimentos.

A Figura 21 mostra que o perfil redutor plasmático de idosos sem a doença de Alzheimer é próximo aos idosos portadores de Alzheimer. Só houve diferença significativa entre os dois grupos na concentração [B], dose recomendada. Essas similaridades entre o grupo não portador de Alzheimer e com Alzheimer no compartimento plasmático podem ser explicadas devido à semelhante ingestão de micronutrientes entre os dois grupos, como visto por Marchasson *et. al.*, 2001. Com isso, o perfil redutor plasmático de indivíduos de 50-80 anos é muito semelhante aos indivíduos de 60-85 anos com Alzheimer.

Bergman, 2002, já havia identificado diferença entre a apoptose de células de indivíduos com e sem Alzheimer, mas, nenhuma diferença entre seus compartimentos plasmáticos. Sabe-se que o processo inflamatório e os marcadores pró-inflamatórias são maiores no paciente com Alzheimer (TEIXEIRA *et. al.*, 2008). Então, seriam as células mais influenciadas pelos antioxidantes vitamínicos que o plasma em indivíduos com Alzheimer? Nossos resultados mostraram que sim, já que a diferença entre o poder redutor plasmático de doadores com e sem Alzheimer foi muito pequena; ao passo que a diferença

do poder oxidativo e redutor celular foi extremamente significativa, $p < 0,001$, pelo teste de Mann-Whitney entre os grupos não portadores de Alzheimer e portadores de Alzheimer.

7-CONCLUSÃO

Assim diante do que foi exposto anteriormente, podemos concluir que para a população, de um modo geral, não deve ser recomendada a suplementação vitamínica com o intuito de ser antioxidante. Esta provou ser prejudicial em todos os compartimentos, oxidativo/redutor e celular/plasmático para pessoas não portadoras de Alzheimer de 20 a 80 anos.

Quanto a pacientes portadores de Alzheimer, percebemos que o envelhecimento por si só não é motivo para a necessidade de um aporte vitamínico maior, visto que idosos não portadores de Alzheimer não beneficiaram da suplementação. Não há, também comprovação científica da redução do risco para a Doença de Alzheimer com a suplementação prévia. Advinda a doença, pode ser que a suplementação de vitaminas antioxidantes melhore o perfil de estresse oxidativo característico destes pacientes. Melhoras nos sintomas, como déficit cognitivo são resultados ainda obscuros na literatura e nossos estudos, por serem *in vitro*, são limitados para obter tais respostas, mas podem funcionar como balizadores para futuras intervenções terapêuticas.

Mais uma vez, os estudos de cunho nutricional apontam o favorecimento do estilo de vida saudável e principalmente composto de uma dieta diversificada e a mais natural possível. Mas o que se vê é o aumento assustador do consumo, venda e fabricação de nutrientes sintéticos e artificiais visando substituir os alimentos *in natura*. Além de fortificações vitamínicas em vários alimentos industrializados a propaganda e venda de complexos vitamínicos, complexos vitamínicos e minerais e as vitaminas isoladas tem aumentado muito no Brasil, imitando a cultura americana, que sabemos, não ser exemplo de hábitos alimentares. Nesse contexto, o influxo de vitaminas artificiais pode prejudicar aqueles sem necessidade para tal. Portanto, a tecnologia e indústria alimentar nos levam a

uma realidade nem sempre saudável, uma vez que a ciência continua nos remetendo às origens de preparações caseiras, alimentos orgânicos e naturais.

A busca por estilo de vida adequado não é embasado no sintético, no excesso ou no oneroso. O envelhecimento saudável e livre de complicações associadas não tem formulação excêntrica. Seguir o equilíbrio, em todos os aspectos, ainda é o ponto chave para a senescência.

8-PERSPECTIVAS

Temos como perspectivas:

- 1-Verificar em doadores não portadores de Alzheimer por qual via de sinalização celular ocorrem as alterações provocadas pela suplementação do complexo vitamínico;
- 2-Verificar em doadores não portadores de Alzheimer qual via de sinalização celular está envolvida na modificação do poder redutor celular nas duas faixas etárias estudadas;
- 3-Verificar em doadores portadores de Alzheimer qual via de sinalização celular está alterada pelo estresse oxidativo gerado por esta patologia e tentar nortear algum caminho terapêutico advindo destes estudos.

9-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H. 2005. *Imunologia celular e molecular*. São Paulo, Elsevier. 5 ed., 576 p.

AMAYA-FARFAN, J., DOMENE, S.M.A., PADOVANI, R.M. DRI: Síntese Comentada das Novas Propostas sobre Recomendações Nutricionais para Antioxidantes. **Revista de Nutrição**. v. 14, n. 1, 2001.

AMES, D., RITCHIE, C. Antioxidants and Alzheimer's disease: time to stop feeding vitamin E to dementia patients? **International Psychogeriatrics**. v. 19, n. 1, p. 1-8, 2007.

BAHORUN, T., SOOBRAATTEE, M.A., LUXIMON-RAMA, V., ARUOMA, O.I. Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease. **Internet Journal of Medical Update**. v. 1, n.2, 2006.

BALLUZ, L.S., KIESZAK, S.M., PHILEN, R.M., MULINARE, J. Vitamina and Mineral Supplement use in the United States- Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **American Medical Association**. v. 9, 2000.

BICALHO, H.M.S., GONTIJO, M.C., NOGUEIRA-MACHADO, J.A. A simple technique for simultaneous human leukocytes separation. **Journal of Immunology Methods**. v. 40, n. 1, p.115-116, jan.1981.

BERGMAN, M., SALMAN, H., BELOOSESKY, Y., DJALDETTI, M., BESSLER, H. Are peripheral blood cells from patients with Alzheimer disease more sensitive to apoptotic stimuli? **Alzheimer Disease and Associated Disorders**. v. 16, n. 3, p. 156-160, set. 2002.

BJELAKOVIC, G., NIKOLOVA, D., GLUUD, L.L., SIMONETTI, R.G., GLUUD, C. Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. **The Cochrane Collaboration**. is. 2, 2008.

BOUWENS, M., AFMAN, L.A., MULLER, M. Fasting induces changes in peripheral blood mononuclear cell gene expression profiles related to increases in fatty acid - oxidation: functional role of peroxisome proliferator-activated receptor in human peripheral blood mononuclear cells. **The American Journal of Clinical Nutrition**. n. 86, p. 1515-1523, 2007.

CHANDRA, R.K. Nutrition and Immunology: from the clinic to cellular biology and back again. **Proceedings of the Nutrition Society**. v. 58, p. 681-683, 1999.

CHANG, A.M., HALTER, J.B. Aging and insulin secretion. **American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism**, v. 284, p.E7-E12, 2003.

CHAVES, M.M., ROCHA-VIEIRA, E., REIS, A.P., SILVA, R.L., GERZSTEIN, N.C., NOGUEIRA-MACHADO, J.A. Increase of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species generated by phagocytosing granulocytes related to age. **Mechanisms of Aging and Development**. v. 119, p. 1-8, 2000.

CHAVES, M.M., ROCHA-VIEIRA, E., SILVA, R.L., REIS, A.P., NOGUEIRA-MACHADO, J.A. Host defenses in the aged: evaluation of the balance between oxidizing species generation and reducing power in phagocytosing human granulocytes. **Mechanisms of Aging and Development**. v. 104, n. 1, p. 103-109, 1998.

CHAVES, M.M., RODRIGUES, A.L.P., REIS, A.P., GERZSTEIN, N.C., NOGUEIRA-MACHADO, J.A. Correlation between NADPH Oxidase and Protein Kinase C in the ROS Production by Human Granulocytes Related to Age. **Gerontology**. v. 48, p.354-359, 2002.

CRISOSTOMO, A.G., MORENO, R.B., NAVARATNAM, S., WILKINSON, J.A., BISBY, R.H. Generation of superoxide and singlet oxygen from atocopherolquinone and analogues. **Free Radical Research**. v. 41, n. 6, p. 730-737, 2007.

CUMMINGS, S.R. The Biology of Aging. **Journal of Musculoskeleton Neuronal Interaction**, v.7, n.4, p.340-341, aug.2007.

DAUCHET, L., PÉNEAU, S., BERTRAI, S., VERGNAUD, A.C., ESTAQUIO, C., KESSE-GUYOT, E., CZERNICHOW, S., FAVIER, A., FAURE, H., GALAN, P., HERCBERG, S. Relationships between different types of fruit and vegetable consumption and serum concentrations of antioxidant vitamins. **British Journal of Nutrition**. p. 1-9, 2008.

DAUDU, P.A., KELLEY, D.S., TAYLOR, P.C., BURRI, B.J., WU, M.M. Effect of a low beta-carotene diet on the immune functions of adult women. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 60, p. 969-972, 1994.

DE LA FUENTE, M. Effects of antioxidants on immune system aging. **European Journal of Clinical Nutrition**. v. 56, n. 3, p. S5-S8, 2002.

DENHAM, H. The aging process. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.78, n.11, p.7124-7128, nov.1981.

DUARTE, T.L., LUNEC, J. When is an antioxidant not an antioxidant? **Free Radical Research**. v. 39, n. 7, p. 671-686, 2005.

ELBIM, C., PILLET, S., PREVOST, M.H., PREIRA, A., GIRARD, P.M., ROGINE, N., MATUSANI, H., HAKIM, J., ISRAEL, N., GOUGEROT-POCIDALO, M.A. Redox and activation status of monocytes from human immunodeficiency virus-infected patients: relationship with viral load. **Journal of Virology**.v.73, n. 6, p. 4561-4566, 1999.

EVANS, P., HALIWELL, B. Micronutrientes: oxidant/antioxidant status. **British Journal of Nutrition**. n. 85, p. S67-S94, 2001.

FOOD AND NUTRITION BOARD/INSTITUTE OF MEDICINE/NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. Dietary Reference Intake for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. **National Academy Press**. 2000.

FORLENZA, O.V., Tratamento Farmacológico de Doença de Alzheimer. **Revista de Psiquiatria Clínica**. 2005.

FOTOUHI, N., MEYDANI, M., SANTOS, M.S., MEYDANI, S.N., HENNEKENS, C.H., GAZIANO, J.M. Carotenoid and tocopherol concentrations in plasma, peripheral blood mononuclear cells, and red blood cells after long-term beta-carotene supplementation in men. **The Journal of Clinical Nutrition**. v. 63, p. 553-558, 1996.

GRAGSTED, L.O., PEDERSEN, A., HERMETTER, A., BASU, S., HANSEN, M., HAREN, G.R., KALL, M., BREINHOLT, V., CASTENMILLER, J.M., STAGSTED, J., JAKOBSEN, J., SKIBSTED, L., RASMUSSEN, S.E., LOFT, S., SANDSTROM, B. The 6-a-day study: effects of fruit and vegetables on markers of oxidative defense in healthy nonsmokers. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 79, p. 1060-1072, 2004.

GRAY, S.L., ANDERSON, M.L., CRANE, P.K., BREITNER, J.C.S., McCORMICK, W., BOWEN, J.D., TERI, L., LARSON, E. Antioxidant vitamin supplement use and risk of dementia or Alzheimer's disease in older adults. **Journal of American Geriatric Society**. v. 56, p. 291-195, 2008.

HALLFRISCH, J., MULLER, D.C., SINGH, V.N. Vitamin A and E intakes and plasma concentrations of retinol, β -carotene, and α -tocopherol in men and women of the Baltimore Longitudinal Study of Aging. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 60, p.176-182, 1994.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemistry society transactions**. v. 35, n. 5, p. 1147-1150, may, 2007.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemistry Journal**. v. 219, p. 1-14, 1984.

HAMILTON, I.M.J., GILMORE, W.S., BENZIE, I.F.F., MULHOLLAND, C.W., STRAIN, J.J. Interactions between vitamins c and E in human subjects. **British Journal of Nutrition**. v. 84, p.261-267, 2000.

HERCBERG, S., GALAN, P., PREZIOSI, P., BERTRAIS, S., MENNEN, L., MALVY, D., ROUSSEL, A.M., FAVIER, A., BRIANÇON, S. The SU.VI.MAX Study ó A Randomized, Placebo-Controlled Trial of the Health Effects of Antioxidant Vitamins and Minerals. **Archive of International Medicine**. v.164, p. 2335-2342, 2004.

JONES, D.P. Extracellular Redox State: Refining the Definition of Oxidative Stress in Aging. **Rejuvenation Research**. v. 9, n. 2, p. 169-181, summer/2006.

JONES, D.P. Redefining Oxidative Stress. **Antioxidants and Redox Signaling**. v. 8, n. 9 e 10, 2006.

KIRKHAM, P., RAHMAN, I. Oxidative stress in asthma and COPD: Antioxidants as a therapeutic strategy. **Pharmacology & Therapeutics**, v.111, p.476 ó 494, 2006.

KRINSKY, N.I. Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds. Food and Nutrition Board ó Institute of Medicine. **National Academy Press**. 2000.

LEANDRO, C.G., CASTRO, R.M., NASCIMENTO, E., PITHON-CURI, T.C., CURI, R. Mecanismos adaptativos do sistema imunológico em resposta ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. v.13, n. 5, 2007.

LESOURD, B., MAZARI, L. Nutrition and immunity in the elderly. **Proceedings of Nutrition Society**. v. 58, p. 685-695, 1999.

LIMA-COSTA, M.F., VERAS, R. Envelhecimento e saúde pública. **Caderno de Saúde Pública do Rio de Janeiro**, v. 19, n. 3, p.700-701, mai./jun. 2003.

LIN, M.T., BEAL, M.F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**. v. 443, n. 19, 2006.

LUCHSINGER, J.A., TANG, M.X., SHEA, S., MAYEUX, R. Antioxidant vitamin intake and risk of Alzheimer disease. **Archives of Neurology**. v. 60, p. 203-208, 2003.

MARCHASSON, I.B., BEAUVIEUX, M.C.D., PEUCHANT, E., HARSTON, S.R., DECAMPS, A., REIGNIER, B., EMERIAU, J.P., RAINFRAY, M. Antioxidant defences and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients. **Age and Ageing**. v. 30, p.235-241, 2001.

MARKO, M.G., AHMED, T., BUNNELL, S.C., WU, D., CHUNG, H., HUBER, B.T., MEYDANI, S.M. Age-associated decline in effective immune synapse formation of CD4+ T cells is reversed by vitamin E supplementation. **The Journal of Immunology**. v. 178, p. 1443-1449, 2007.

MEYDANI, S.N., BARKLUND, M.P., LIU, S., MEYDANI, M., MILLER, R.A., CANNON, J.G., MORROW, F.D., ROCKLIN, R., BLUMBERG, J.B. Vitamin E supplementation enhances cell-mediated immunity in healthy elderly subjects. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 52, p. 557-563, 1990.

MILLER, R.E., BARRIUSO, R.P., DALAL, D., RIEMERSMA, R.A., APPEL, L.J., GUALLAR, E. Meta-Analysis: high dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. **Annals of Internal Medicine**. v. 142, p. 37-46, 2005.

MONACK, D.M., MUELLER, A., FALKOW, S. Persistent bacterial infections: the interface of pathogen and the host immune system. **Nature Reviews Microbiology**. v. 2, p. 747-765, 2004.

NIKI, E., NOGUCHI, N., TSUCHIHASHI, H., GOTOH, N. Interaction among vitamin C, vitamin E and beta-carotene. **American Journal of Clinical Nutrition**. n.62, p. 1322-1326, 1995.

PAIVA, S.A.R., RUSSELL, R.M. Beta-Carotene and other Carotenoids as Antioxidants. **Journal of American College of Nutrition**. v. 18, n. 5, p. 426-433, 1999.

PALOZZA, P., SERINI, S., TROMBINO, S., LAURIOLA, L., RANELLETTI, F.O., CALVIELLO, G. Dual role of beta-carotene in combination with cigarette smoke aqueous extract on the formation of mutagenic lipid peroxidation products in lung membranes: dependence on pO₂. **Carcinogenesis**. v. 27, n.12, p. 2383-2391, 2006.

PATRICK, L. Beta-Carotene: The Controversy Continues. **Alternative Medicine Review**. v. 5, n. 6, p. 530-545, 2000.

PEREIRA, J.C. Nutrição e Alimentação- Vitaminas Hidro e Lipossolúveis. **Boletim do criadouro Campo das Caviúnas**. n. 17, julho, 2005.

PRATICÒ, D. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal. **Cell Press**. 2008.

RAY, S., BRITSCHGI, M., HERBERT, C., UCHIMURA, Y.T., BOXER, A., BLENNOW, K., FRIEDMAN, L.F., GALASKO, D.R., JUTEL, M., KARYDAS, A., KAYE, J.A., LESZEK, J., MILLER, B.L., MINTHON, L., QUINN, J.F., RABINOVICI, G.D., ROBINSON, W.H., SABBAGH, M.N., SO, Y.T., SPARKS, D.L., TABATON, M., TINKLENBERG, J., YESAVAGE, J.A., TIBSHIRANI, R., CORAY, T.W. Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. **Nature Medicine**. v. 13, n. 11, 2007.

ROBERTS, S.B., ROSENBERG, I. Nutrition and Aging: Changes in the Regulation of Energy Metabolism With Aging. **Physiological Review**, v.86, p.651-667, 2006.

ROCK, C. L. Carotenoids: Biology and Treatment. **Pharmacological Therapy**. v. 75, n. 3, p. 185-197, 1997.

SANTOS, K.M.O., BARROS FILHO, A.A. Consumo de produtos vitamínicos entre universitários de São Paulo, SP. **Revista de Saúde Pública**. v. 3, n. 2, 2002.

SELMAN, C., MCLAREN, J.S., MEYER, C., DUNCAN, J.S., REDMAN, P., COLLINS, A.R., DUTHIE, G.G., SPEAKMAN, J.R. Life-long Vitamin C supplementation in combination with cold exposure does not affect oxidative damage or lifespan in mice, but decreases expression of antioxidant protection genes. **Mechanims of Ageing and**

Development. v. 127, p. 897-904, 2006.

SIES, H. Strategies of Antioxidant Defenses. **European Journal of Biochemistry.** v. 215, p. 213-219, 1993.

SPIRDUSO, W.W., FRANCIS, K. L., MACRAE, P.G. Physical Dimensions of Aging. **Human Kinetics**, 2ed. 2005.

STANNER, S.A., HUGHES, J., KELLY, C.N.M., BUTTRISS, J. A review of the epidemiological evidence for the antioxidant hypothesis. **Public Health Nutrition.** v.7, n. 3, p. 407-422, 2003.

TEIXEIRA, A.L., REIS, H.J., COELHO, F.M., CARNEIRO, D.S., TEIXEIRA, M.M., VIEIRA, L.B., MUKHAMEDYAROV, M.A., ZEFIROV, A.L., JANKA, Z., PALOTÁS, A. All-or-nothing type biphasic cytokine production of human lymphocytes after exposure to Alzheimer's β -amyloid peptide. **Biological Psychiatry.** v. 64, p. 891-895, 2008.

TERMAN A., GUSTAFSSON B., BRUNK U.T. Mitochondrial Damage and Intralysosomal degradation in cellular aging. **Molecular Aspects of Medicine**, v.27, p.471-482, 2006.

U.S. Preventive Services Task Force. Routine Vitamin Supplementation to prevent cancer and cardiovascular disease: recommendations and rationale. **Annals of Internal Medicine.** v. 139, p. 51-55, 2003.

VALKO, M., RHODES, C.J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M., MAZUR, M. Free radicals, metals, and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions.** v. 160, p. 1-40, jan., 2006.

VAN DER BEEK, E.M., KAMOHUIS, P.J.G.H. The potential role of nutritional components in the management of Alzheimer's Disease. **European Journal of Pharmacology.** 2008.

VASCONCELOS, S.M.L., GOULART, M.O.F., MOURA, J.B.F., BENFATO, V.M.M.S., KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova.** v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VIÑA, J., LLORET, A., ORTÍ, R., ALONSO, D. Molecular basis of the treatment of Alzheimer disease with antioxidants: prevention of oxidative stress. **Molecular Aspects of Medicine.** v. 25, p. 117-123, 2004.

WANG, P.N., YANG, C.L., LIN, K.N., CHEN, W.T., CHWANG, L.C., LIU, H.C. Weight loss, nutritional status and physical activity in patients with Alzheimer's disease. **Journal of Neurology.** v. 251, p. 314-320, 2004.

WOODALL, A.A., LEE, S.W.M., WEESIE, R.J., JACKSON, M.J., BRITTON, G. Oxidation of carotenoids by free radicals: relationship between structure and reactivity. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1336, p. 33-42, 1997.

ZHANG, P., OMAYE, S.T. Beta-carotene and Protein Oxidation: effects of ascorbic acid and alpha-tocopherol. **Toxicology**, v.146, p.37-47, jan. 2000.

ZUREIK, M., GALAN, P., BERTRAIS, S., MENNEN, L., CZERNICHOW, S., BLACHER, J., DUCIMETIÈRE, P., HERCBERG, S. Effects of Long-Term Daily Low-Dose Supplementation with Antioxidant Vitamins and Minerals on Structure and Function of Large Arteries. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology-Journal of the American Heart Association**. v. 24, n. 8, p. 1485-1491, 2004.

10-ANEXOS

10.1-Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 343/08

Interessado(a): **Profa. Mirian Martins Chaves**
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 10 de setembro de 2008, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Estudo do efeito dual (anti-oxidante) do complexo vitamínico (Ácido Ascórbico, b-Caroteno e a-Tocoferol) em indivíduos diabéticos tipo 1 e não diabéticos durante o processo de envelhecimento**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

10.2-Prêmio de Melhor Trabalho em Nutrição Clínica pelo Congresso Internacional de Nutrição, Longevidade e Qualidade de Vida.



**8º Congresso Internacional de Nutrição, Longevidade & Qualidade de Vida
8º Congresso Internacional de Gastronomia e Nutrição
3º Fórum Nacional de Nutrição
2º Simpósio Internacional da American Dietetic Association**

**4 a 6 de outubro de 2007
Centro de Convenções Frei Caneca - São Paulo - SP**

Veja a divulgação do Mega Evento Nutrição 2007 na Nutrition Society Gazette (Inglaterra).

Nutrição Clínica:

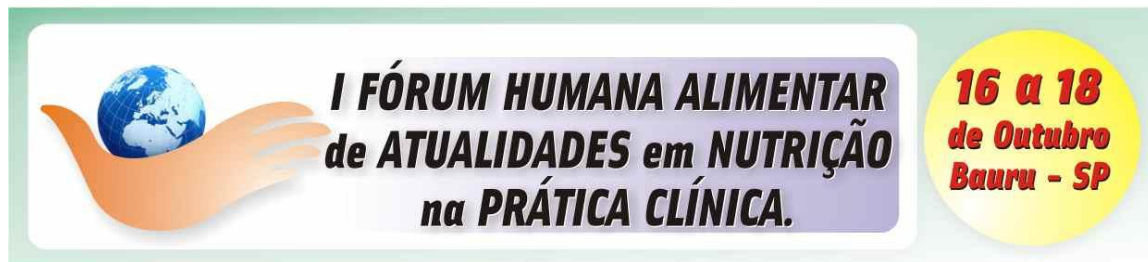
Barbara de Oliveira

DEMONSTRAÇÃO DO EFEITO ANTI-OXIDANTE E PRO-OXIDANTE DO COMPLEXO VITAMÍNICO BETA-CAROTENO, ALPHA-TOCOFEROL E ÁCIDO ASCÓRBICO EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE DOADORES SADIOS.

1OLIVEIRA, B.F., 2NOGUEIRA-MACHADO, J.A., 1CHAVES, M.M.- 1Laboratório de Bioquímica do Envelhecimento e Doenças Correlacionadas, ICB/UFMG, BH – Brasil. 2Núcleo de Pós Graduação do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte/MG, Brasil.

Mais informações: www.nutricaoempauta.com.br

10.3-5 Prêmio de Incentivo à Pesquisa Científica Eliete Salomon Tudisco pelo I Fórum Humana Alimentar de Atualidades em Nutrição na Prática Clínica.



**Vencedores do PREMIO DE INCENTIVO A PESQUISA EM NUTRIÇÃO CLÍNICA
ELIETE SALOMON TUDISCO**

1o Lugar

Barbara Fonseca de Oliveira
Míriam Marins Chaves
José Augusto Nogueira Machado

**SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINAS, UM FATOR COMPLICADOR OU
BENÉFICO PARA PORTADORES DE DIABETES TIPO 1?**

Mais informações:

http://www.forumnutricaoclinica.blogspot.com.br/2008_10_01_archive.html

10.4-Artigos submetidos

10.4.1-

Lack of IL-10 effect on ROS production in old, but not young person depends on p38 MAPK.

Míriam Martins Chaves^{1*}, Daniela Caldeira Costa³, Bárbara Fonseca de Oliveira¹, José Augusto Nogueira-Machado².

¹Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627 CP 486, 30161-970

² Santa Casa Hospital of Belo Horizonte, 9^o andar . ala D - Av. Francisco Sales, 1111 . Santa Efigênia CEP: 30150-221, Belo Horizonte, MG, Brazil.

³ Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Moro do Cruzeiro, 35400-000, Ouro Preto . MG, Brazil.

RUNNING TITLE: Differential signaling of IL-10 age related

Key words: Age, neutrophil, PKA, p38 MAPK, Akt/PKB.

Corresponding Author:

*Dr. Míriam Martins Chaves: Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais - Caixa Postal 486, 30161-970, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Telephone: 55 31 3409 2660 - Fax: 55 31 3409 2614

E-mail: chavesmm@icb.ufmg.br

Ms. Ref. No.: MAD-D-09-00037

Title: Lack of IL-10 effect on ROS production in old person: role of p38 MAPK.
Mechanisms of Ageing and Development

Dear Professor Chaves,

Your submission "Lack of IL-10 effect on ROS production in old person: role of p38 MAPK." will be handled by Rajindar S. Sohal.

You may check on the progress of your paper by logging into the Elsevier Editorial System as an author at

<http://ees.elsevier.com/mad/> :

Your username is: chavesmm

If you can't remember your password please click the 'Send Password' link on the Login page.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Mechanisms of Ageing and Development

For further assistance, please visit our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives

Beta-carotene, alpha-tocopherol and ascorbic acid induce oxidative stress in human peripheral blood mononuclear cells from healthy donors.

Barbara F. Oliveira¹, Araci P. Krauss¹, José Augusto Nogueira-Machado², Míriam M. Chaves^{1*}

¹Laboratório de Bioquímica do Envelhecimento e Doenças Correlacionadas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627 CP 486, 30161-970, BH/MG . Brasil.

² Santa Casa Hospital of Belo Horizonte, 9^o andar . ala D - Av. Francisco Sales, 1111 . Santa Efigênia CEP: 30150-221, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Keywords: Vitamins, mononuclear cells, oxidative stress, immune system, reducing power

Running Title : Vitamins E, C and A present oxidative stress

Contact with the author:

*Míriam Martins Chaves, PhD: Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais - Caixa Postal 486, 30161-970, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Telephone: 55 31 3409 2660 - Fax: 55 31 3409 2614

e-mail: chavesmm@icb.ufmg.br

BJN-2009-013995

Beta-carotene, alpha-tocopherol and ascorbic acid induce oxidative stress in human peripheral blood mononuclear cells from healthy donors.

Dear Dr. Chaves,

Thank you for making all the amendments we have requested for. I am pleased to inform you that your paper has been accepted for the initial stage of the peer review and is being considered for publication. You will be notified of our decision in due course.

To check the status of the paper select the "Check Status" link at the following URL:

<http://bjn.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?el=A2P5EBR7A5OWL7F6A9E74TOb4YElgXYuxRL15ztgZ>

You can access your paper by logging into the BJN on-line peer-review system at <http://bjn.msubmit.net> using your unique Username: chavesmm and Password.

Thank you for your interest in the British Journal of Nutrition.

Yours sincerely,
Hajnal Zdravics
Publications Office

On behalf of,
Professor Philip Calder
Editor-in-Chief
British Journal of Nutrition
The Nutrition Society, 10 Cambridge Court, 210 Shepherds Bush Road, London W6 7NJ, UK
Tel: +44 (0)20 7605 6555
Fax: +44 (0)20 7602 1756
E-mail: edoffice@nutsoc.org.uk
BJN online submission: <http://bjn.msubmit.net>

10.5- Artigos em redação**10.5.1-**

**SUPPLEMENTING WITH VITAMINS COULD BE AN
ALTERNATIVE THERAPY FOR ALZHEIMER PATIENTS?****¹OLIVEIRA, B.F., ²NOGUEIRA-MACHADO, J.A., ^{1*}CHAVES, M.M**

¹Laboratório de Bioquímica do Envelhecimento e Doenças Correlacionadas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627 CP 486, 30161-970, BH/MG . Brasil.

² Santa Casa Hospital of Belo Horizonte, 9^o andar . ala D - Av. Francisco Sales, 1111 . Santa Efigênia CEP: 30150-221, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Short title: Effect of supplementation in Alzheimer patients

Contact with the author:

*Dra. Míriam Martins Chaves: Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais - Caixa Postal 486, 30161-970, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Telephone: 55 31 3409 2660 - Fax: 55 31 3409 2614

e-mail: chavesmm@icb.ufmg.br

**SUPPLEMENTING WITH VITAMINS, A COMPLICATING
OR BENEFICIAL FACTOR FOR DIABETES 1 PACIENTS
DURING THE AGING PROCESS?**

¹OLIVEIRA, B.F., ²NOGUEIRA-MACHADO, J.A., ^{1*}CHAVES, M.M

¹Laboratório de Bioquímica do Envelhecimento e Doenças Correlacionadas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627 CP 486, 30161-970, BH/MG . Brasil.

² Santa Casa Hospital of Belo Horizonte, 9^o andar . ala D - Av. Francisco Sales, 1111 . Santa Efigênia CEP: 30150-221, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Short title: Effect of supplementation in Diabetes patients

Contact with the author:

*Dra. Míriam Martins Chaves: Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais - Caixa Postal 486, 30161-970, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Telephone: 55 31 3409 2660 - Fax: 55 31 3409 2614

e-mail: chavesmm@icb.ufmg.br
