

BARBARA FONSECA DE OLIVEIRA

SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINAS, UM FATOR
COMPLICADOR OU BENÉFICO PARA PORTADORES OU
NÃO DE ALZHEIMER DURANTE O PROCESSO DE
ENVELHECIMENTO?

Belo Horizonte

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

2009

BARBARA FONSECA DE OLIVEIRA

SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINAS, UM FATOR
COMPLICADOR OU BENÉFICO PARA PORTADORES OU
NÃO DE ALZHEIMER DURANTE O PROCESSO DE
ENVELHECIMENTO?

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientadora: Profa. Dra. Míriam Martins Chaves

Belo Horizonte

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

2009

*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”*

Chico Xavier

À acolhedora e realmente professora, Míriam.

À minha mãe, pai, Marjorie e Felipe, minha família querida, estrutura da minha vida.

Ao Carlinhos, pessoa que sempre estive e tenho certeza, estará ao meu lado.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Imunologia: Carol, filha competente e querida;
Mariana, alegria em pessoa; Flávia, companheira e amiga; Gláucia, Sandra, Araci,
Lucinara, Marcela, Gil e Eliane.

À FAPEMIG e CAPES pela concessão de bolsa e incentivo.

Ao programa de Pós-Graduação em Neurociências.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O envelhecimento é uma experiência que todo ser humano compartilha, mas nem sempre compreende. 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 relacionadas ao envelhecimento são causados primariamente devido ao dano gerado pelos radicais livres.

Um exemplo destas patologias é o Alzheimer, a forma mais prevalente de demência, uma doença com perda cognitiva que ocorre durante o envelhecimento. É uma doença progressiva e altera o comportamento afetando a memória, aprendizagem, atividades do dia a dia e qualidade de vida.

O estresse oxidativo ocorre precocemente antes do estabelecimento das placas patológicas no Alzheimer. 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. As células mononucleares, como os linfócitos e monócitos são pré-cursoras de células que geram radicais livres como elas mesmas geram.

O estresse oxidativo é um desbalanço entre a produção de radicais livres e a defesa antioxidante. Os antioxidantes são responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Exemplo destes nos nutrientes são as vitaminas C, E e beta caroteno (um pré-cursor da vitamina A).

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.

Tivemos como objetivo, portanto, 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.

As células mononucleares e plasma foram obtidos a partir do sangue periférico e incubados com concentrações do complexo vitamínico, a saber: [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. Foram feitos dois ensaios: de quimioluminescência para avaliar o compartimento oxidativo e o ensaio com MTT para avaliar o compartimento redutor celular e plasmático. Foram aferidos também os valores de albumina e ácido úrico por kit LabTest®.

Os nossos resultados mostraram que grupos não portadores de Alzheimer não tem o benefício celular da suplementação pelo complexo vitamínico estudado e que deve haver uma compensação plasmática para os efeitos nas células. O ideal seria a dose recomendada das vitaminas, em forma de alimentos, para garantir um efeito antioxidante e não pró-oxidante como foi atestado. Conclui-se que diferentes faixas etárias necessitam de diferentes quantidades de vitaminas e que altas doses podem ser maléficas para indivíduos idosos.

Os pacientes com Alzheimer se beneficiaram em todos os compartimentos com todas as doses do complexo vitamínico. Conclui-se que o maior aporte vitamínico para este grupo, em forma de alimentos é recomendado para balancear os compartimentos oxidativo e redutor.

ABSTRACT

Aging is an experience every human being shares, but not always understands. The nature of aging process has been target for numerous speculations. Suggested possibilities include: change in the DNA code, reduction of protein synthesis, macromolecules links, auto-attack to immune system and damage caused by oxidative reactions. Evidences accumulated indicate that aging and diseases related to aging are caused primarily due to damage generated by free radicals.

An example of one of these diseases is Alzheimer, the most prevalent form of dementia, with cognitive loss that occurs during aging. It is a disease that alters behavior, memory, learning, daily activities and life quality.

Oxidative stress occurs before the establishment of pathological plaques in Alzheimer. The accumulation of reactive species by exogenous and endogenous production is called oxidative stress being common in many kinds of cells with reduced redox power. The mononuclear cells, as lymphocytes and monocytes are pre cells that generate free radical as do themselves.

Oxidative stress is an imbalance between free radical and antioxidant defense. Antioxidants are responsible for inhibition and reduction of lesions caused by free radicals in cells. Examples of these nutrients are vitamins C, E and beta-carotene.

In a mutant science of few conclusive results, investigations continue about the benefits, or maybe downside of antioxidants not only for sick people, but giving special attention to the highest consumers, the healthy population.

So, our objective was to evaluate the possible dual effect (antioxidant and prooxidant) of the vitamin complex (ascorbic acid, alpha-tocopherol and beta-carotene) in mononuclear cells and plasma of non Alzheimer and Alzheimer patients during the aging process.

Mononuclear cells and plasma were obtained from peripheral blood and incubated with the following concentrations of the vitamin complex: [A] Ascorbic acid = 2,82µg, Alpha-tocopherol = 3,45µg, Beta-Carotene =0,09µg; [B] Ascorbic acid = 5,64µg, Alpha-tocopherol = 6,90µg, Beta-Carotene =0,18µg; [C] Ascorbic acid = 14,09µg, Alpha-tocopherol = 17,23µg, Beta-Carotene =0,43µg; [D] Ascorbic acid = 28,18µg, Alpha-tocopherol = 34,46µg, Beta-Carotene =0,86µg. Two assays were done: chemiluminescence to evaluate the oxidative compartment and MTT to evaluate the reductive compartment in cells and plasma. Albumin and uric acid were also measured by kit LabTest®.

Our results demonstrated that non Alzheimer donors Don not have the cellular benefit of supplementation with the vitamins studied and that there may be a plasmatic compensation of the cellular effects. The recommended dos is ideal, as food, to guarantee an antioxidant effect and not pro-oxidant as shown. We concluded that different age groups need different quantities of vitamins and that high doses can be evil to elderly individuals.

Alzheimer patients benefited in all compartments with all vitamin doses of the complex. We conclude that a higher vitamin ingestion for this group, as food, is recommended to balance the oxidative and reductive compartments.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

[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 β =proteína amilóide

ABAD=proteína amilóide ligadora de álcool desidrogenase

AI=ingestão adequada

AP1=proteína ativadora 1 (fator de transcrição)

APP=proteína precursora do amilóide

C=controle

C-IV=complexo IV da cadeia respiratória

c-Jun=proteína que faz parte da transcrição de AP1

COEP=Comitê de Ética em Pesquisa

DA=Doença de Alzheimer

DNA=Ácido desoxirribonucléico

DO=densidade óptica

DRI=doses dietéticas recomendadas

E=experimento

EP=erro padrão

HTRA2=serina protease

IAPs=inibidor de apoptose de proteína

KGD=alfa-cetogluturato desidrogenase

LDL=lipoproteína de baixa densidade

M=mononuclear

MAPK=Map cinase

mtDNA=Ácido desoxirribonucléico mitocondrial

MTT= (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)=sal de tetrazólio

NADPH=

NK=natural killer

NS=não significativo

PBS=solução salina tamponada

PIN1=prolil isomerase 1

PS1=presenilina 1

PS2=presenilina 2

RLU=unidade relativa de luz

RNS=espécies reativas de nitrogênio

ROS=espécies reativas de oxigênio

RPMI=meio de cultivo celular

SCMBH=Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte

SU.VI.MAX=Estudo de Suplementação de Vitaminas e Minerais-França

TCD4=linfócito T com cluster de diferenciação 4

TCD8=linfócito T com cluster de diferenciação 8

UFMG=Universidade Federal de Minas Gerais

UL=nível de ingestão máxima tolerável

VLDL=lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: O papel da mitocôndria na doença de Alzheimer.....	18
Figura 2: Controle de infecção com interação dos linfócitos e macrófago com liberação de fatores oxidantes.....	22
Figura 3: Interação entre radicais livres e antioxidantes.....	28
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.....	42
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.....	43
Figura 6: Dosagem de albumina plasmática de doadores não portadores de Alzheimer na faixa etária de 20-80 anos.....	45
Figura 7: Dosagem de ácido úrico plasmático de doadores do sexo feminino não portadoras de Alzheimer na faixa etária de 20-80 anos.....	45
Figura 8: Dosagem de ácido úrico plasmático de doadores do sexo masculino não portadores de Alzheimer na faixa etária de 20-80 anos.....	45
Figura 9: Avaliação do poder redutor celular e plasmático de doadores não portadores de Alzheimer na faixa etária de 20 a 49 anos.....	50
Figura 10: Avaliação do poder redutor celular e plasmático de doadores não portadores de Alzheimer na faixa etária de 50 a 80 anos.....	52
Figura 11: Avaliação do poder redutor celular de portadores de Alzheimer na faixa etária de 60 a 85 anos.....	55
Figura 12: Avaliação do poder redutor plasmático de portadores de Alzheimer na faixa etária de 60 a 85 anos.....	56
Figura 13: Dosagem de albumina plasmática de doadores com Alzheimer na faixa etária de 60-85 anos.....	58
Figura 14: Dosagem de ácido úrico plasmático de doadores do sexo feminino com Alzheimer.....	58
Figura 15: Dosagem de ácido úrico plasmático de doadores do sexo masculino com Alzheimer.....	58

Figura 16: Comparação entre os perfis oxidativos de doadores não portadores de Alzheimer de 20-49 anos e 50-80 anos.....	60
Figura 17: Comparação entre os perfis oxidativos de doadores não portadores de Alzheimer de 50-80 anos e com Alzheimer de 60-85 anos.....	61
Figura 18: Comparação entre os perfis redutores celulares de doadores sadios de 20-49 anos e 50-80 anos.....	62
Figura 19: Comparação entre os perfis redutores celulares de doadores sadios de 50-80 anos e com Alzheimer de 60-85 anos.....	63
Figura 20: Comparação entre os perfis redutores plasmáticos de doadores não portadores de Alzheimer de 20-49 anos e 50-80 anos.....	65
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.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Defesas antioxidantes nos sistemas biológicos: Lista condensada de compostos e enzimas antioxidantes.....	23
Tabela 2: Correlação entre doses das vitaminas C, alfa-tocoferol e beta-caroteno.....	27
Tabela 3: Quantidade (µg) das vitaminas: ácido ascórbico, alfa-tocoferol e beta-caroteno em cada volume estudado e correlação com dose oral.....	34
Tabela 4: Características da população controle e portadora de Alzheimer.....	35
Tabela 5: Distribuição dos Tubos para o ensaio de quimioluminescência.....	36
Tabela 6: Distribuição dos Tubos para o ensaio de MTT.....	37
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.....	40
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.....	47
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.....	49
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.....	54

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
OBJETIVOS.....	30
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
MATERIAL E MÉTODOS.....	31
RESULTADOS.....	39
DISCUSSÃO.....	67
CONCLUSÃO.....	85
PERSPECTIVAS.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
ANEXOS.....	95