

**FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

BARBARA FONSECA DE OLIVEIRA

**INFLUÊNCIA DE UM COMPLEXO VITAMÍNICO (ÁCIDO
ASCÓRBICO, ALFA-TOCOFEROL E BETA-CAROTENO) NO
ESTRESSE OXIDATIVO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE
INDIVÍDUOS NÃO DIABÉTICOS E DIABÉTICOS TIPO 1.**

Belo Horizonte

2014



Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

FONSECA DE OLIVEIRA

INFLUÊNCIA DE UM COMPLEXO VITAMÍNICO (ÁCIDO ASCÓRBICO, ALFA-TOCOFEROL E BETA-CAROTENO) NO ESTRESSE OXIDATIVO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE INDIVÍDUOS NÃO DIABÉTICOS E DIABÉTICOS TIPO 1.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências
Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como
requisito parcial para obtenção do título de Doutor em
Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Míriam Chaves Schultz

Belo Horizonte

2014



*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

Este trabalho foi realizado no laboratório de Bioquímica do Envelhecimento e Doenças Correlacionadas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação da Dra. Míriam Chaves Schultz.

APOIO FINANCEIRO:

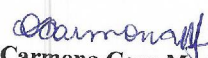
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

COLABORADORES:

- Dra. Daniela Caldeira Costa



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE BARBARA FONSECA DE OLIVEIRA. Aos nove dias do mês de junho de 2014 às 09:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Influência de um complexo vitamínico (ácido ascórbico, alfa-tocoferol e beta-caroteno) em células mononucleares de não diabéticos tipo 1", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Miriam Chaves Schultz, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Denise Carmona Cara Machado (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Ana Maria Caetano de Faria (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Riva de Paula Oliveira (Universidade Federal de Ouro Preto), aprovada; Dra. Maria Lúcia Pedrosa (Universidade Federal de Ouro Preto), aprovada; Dr. Miriam Chaves Schultz - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 09 de junho de 2014.

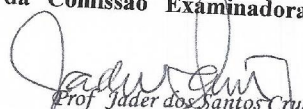

Dra. Denise Carmona Cara Machado (UFMG)


Dra. Ana Maria Caetano de Faria (UFMG)


Dra. Riva de Paula Oliveira (Universidade Federal de Ouro Preto)


Dra. Maria Lúcia Pedrosa (Universidade Federal de Ouro Preto)


Dr. Miriam Chaves Schultz - Orientadora (UFMG)


Prof. Jader dos Santos Cruz
Coordenador de Curso de Pós Graduação
em Bioquímica e Imunologia
ICB - UFMG

"O importante não é vencer todos os dias, mas lutar sempre."

Waldemar Valle Martins



Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

AGRADECIMENTOS

A luz da minha vida, meu filho Caio e à sementinha que está por vir.

A Míriam, orientadora presente e cheia de ensinamentos.

A 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, Mariana, Flávia, Gláucia, Sandra, Araci, Lucinara, Profa Eliane, Raquel, Clara e Andrea. Importância diária.

A *In Vitro* Cells Pesquisa Toxicológica S/A pela oportunidade.

A professora da UFOP Daniela Caldeira Costa.

À FAPEMIG e CAPES pela concessão de bolsa e incentivo.

Ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

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

RESUMO

Os pacientes diabéticos são expostos ao aumento do estresse oxidativo devido a vários mecanismos, principalmente hiperglicemia. Processos patológicos presentes nos indivíduos diabéticos do tipo 1, resultam em atividade diminuída do sistema de defesa antioxidante ou produção excessiva de oxidantes, gerando um desequilíbrio oxidante/antioxidante e desenvolvimento de estresse oxidativo. O objetivo deste estudo foi avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e capacidade de redução; expressão gênica de Zn-SOD, Mn-SOD e catalase, p91phox, p47phox e p22phox; dosagem de IL-6, TNF- α , IL-8, IL-10 e IL-4 e produção de ROS na ausência e presença de inibidores de vias de sinalização celular em células mononucleares de doadores não-diabéticos e diabéticos tipo 1 tratados com um complexo de vitaminas (ácido ascórbico, β -caroteno e α -tocoferol) em duas concentrações diferentes ([A]= ácido ascórbico = 0,08 M, α -tocoferol = 0,04 μ M, β -caroteno = 0,0008 μ M e [20A]= ácido ascórbico = 1.6 μ M, α -tocoferol= 0.82 μ M, β -caroteno = 0,016 μ M). A concentração [A] foi antioxidante ao reduzir a expressão das subunidades da NADPH-oxidase e aumentar a expressão de enzimas antioxidantes e reduzir citocinas pró-inflamatórias em células diabéticas tipo 1. A concentração [20A] foi pró-oxidante, aumentando a produção de ROS, subunidades da NADPH oxidase e citocinas pró-inflamatórias e reduzindo enzimas antioxidantes e citocinas anti-inflamatórias no grupo não diabético. Por outro lado, foi antioxidante nas células de pacientes diabéticos tipo 1, elevando enzimas antioxidantes e citocinas inflamatórias e reduzindo citocinas pró-inflamatórias. A produção de ROS aumentou com a inibição de vias de sinalização na presença de [A] para AKT/PKB, PKC, p38MAPK e PKA e para PKC e p38MAPK com [20A] em células não diabéticas. Nos diabéticos tipo 1, a produção de ROS aumentou na inibição de PKC, p38MAPK e PKA com [A] e PKC e p38MAPK com [20A]. A produção de ROS foi reduzida ao inibir AKT/PKB na presença de [20A] em células diabéticas. O complexo vitamínico tem um efeito dual, pró-oxidante e antioxidante, sendo também dose dependente, com diferentes perfis em células de indivíduos diabéticos tipo 1 ou não-diabéticos.

Palavras chaves: diabetes, vitaminas, células imunológicas, NADPH oxidase, enzimas antioxidantes

ABSTRACT

Diabetic patients are exposed to increased oxidative stress due to several mechanisms, mainly hyperglycaemia. Pathological processes, such as those in type 1 diabetes, include diminished activity of the antioxidant defense system(s) or excessive oxidative generation resulting in an oxidative/antioxidant imbalance and development of oxidative stress. The purpose of this study was to evaluate the production of reactive oxygen species (ROS) (chemiluminescence) and reduction capacity (MTT dye reduction), superoxide dismutase and catalase using quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction the expression of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase subunits, the levels of cytokines [interleukin (IL)-6, tumour necrosis factor- α , IL-8, IL-10 and IL-4] by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and ROS production with inhibition of signaling pathways in mononuclear cells from non-diabetic and diabetic donors treated with a vitamin complex (ascorbic acid, β -carotene and α -tocopherol) in two different concentrations ([A]=ascorbic acid=0.08 μ M, α -tocopherol=0.04 μ M, β -carotene=0.0008 μ M and [20A]=ascorbic acid=1.6 μ M, α -tocopherol=0.82 μ M, β -carotene=0.016 μ M). Concentration [A] was antioxidant reducing expression of NADPH oxidase subunits while raising the expression of antioxidant enzymes and reducing pro-inflammatory cytokines in both groups. Concentration [20A] was pro-oxidant by raising ROS production, NADPH oxidase subunits and pro-inflammatory cytokines and reducing antioxidant enzymes and anti-inflammatory cytokines in the non diabetic group but antioxidant in cells of type 1 diabetic patients by raising antioxidant enzymes and anti-inflammatory cytokines and reducing proinflammatory cytokines. ROS production raised with signaling pathway inhibition plus [A] for AKT/PKB, PKC, p38MAPK and PKA and plus [20A] for PKC and p38MAPK in non- diabetic. In diabetic cells ROS production raised with inhibition of PKC, p38MAPK and PKA with [A] and PKC and p38MAPK with [20A]. ROS production reduced inhibiting AKT/PKB and [20A] in diabetic cells. The vitamin complex has a dual effect, pro-oxidant and antioxidant, being also dose dependent with different profiles of cells of non-diabetic and type 1 diabetic patients.

Keywords diabetes; vitamins; immune cells; NADPH oxidase; antioxidant enzymes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo unificado de dano celular induzido pela hiperglicemia.....	13
Figura 2. Principais contribuintes para a formação de Radicais Livres.....	14
Figura 3. Ativação da NAD(P)H-oxidase.....	15
Figura 4. Reação em cadeia dos Radicais Livres.....	15
Figura 5. Proteção antioxidante dentro da célula.....	18
Figura 6. Interação dos micronutrientes na defesa antioxidante.....	21
Figura 7. Principais citocinas, suas funções e implicações terapêuticas.....	24
Figura 8. Efeitos intracelulares do AMPc.....	26
Figura 9. Ativação da Proteína quinase A (PKA) via AMPc.....	27
Figura 10. Liberação intracelular de diacilglicerol (DAG)	28
Figura 11. Relação da hiperglicemia com aumento de ROS, ativação de vias de sinalização e complicações do diabetes.....	30
Figura 12. Separação de células mononucleares e plasma.....	38
Figura 13. Reação de redução pelo ensaio de MTT.....	39
Figura 14. Ensaio de quimioluminescência.....	45
Figura 15. Ensaio de MTT com células mononucleares.....	47
Figura 16. Ensaio de MTT com plasma.....	48
Figura 17. Expressão de mRNA ^{Zn} -SOD influenciada por um complexo vitamínico em células mononucleares de doadores não diabéticos e diabéticos tipo 1.....	50
Figura 18. Expressão de mRNA ^{Mn} -SOD influenciada por um complexo vitamínico em células mononucleares de doadores não diabéticos e diabéticos tipo 1.....	51
Figura 19. Expressão de mRNA ^{Catalase} influenciada por um complexo vitamínico em células mononucleares de doadores não diabéticos e diabéticos tipo 1.....	52
Figura 20. Expressão de mRNA ^{p91^{phox}} influenciada por um complexo vitamínico em células mononucleares de doadores não diabéticos e diabéticos tipo 1.....	53
Figura 21. Expressão de mRNA ^{p47^{phox}} influenciada por um complexo vitamínico em células mononucleares de doadores não diabéticos e diabéticos tipo 1.....	54
Figura 22. Expressão de mRNA ^{p22^{phox}} influenciada por um complexo vitamínico em células mononucleares de doadores não diabéticos e diabéticos tipo 1.....	55
Figura 23. Ensaio de quimioluminescência com inibidores.....	57
Figura 24. Oxidação do Ascorbato em Radical Ascorbil.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais agentes de defesa antioxidante.....	17
Tabela 2. Critérios estabelecidos pela American Diabetes Association (ADA) para o diagnóstico da diabetes.....	36
Tabela 3. Características dos doadores.....	37
Tabela 4. Distribuição da placa para o ensaio de MTT em células mononucleares.....	39
Tabela 5. Distribuição dos tubos para o ensaio de MTT em plasma.....	40
Tabela 6. Distribuição da placa para o ensaio de quimioluminescência em células mononucleares.....	41
Tabela 7. Montagem de placa para Quimioluminescência em ensaio dos inibidores...43	
Tabela 8. Efeito pró e antioxidante do complexo vitamínico (ácido ascórbico, alfa-tocoferol e beta-caroteno) em células mononucleares de doadores não diabéticos e diabéticos tipo 1.....	46
Tabela 9. Efeito do complexo vitamínico (ácido ascórbico, alfa-tocoferol e beta-caroteno) em células mononucleares de doadores não diabéticos e diabéticos tipo 1.....	47
Tabela 10. Efeito do complexo vitamínico (ácido ascórbico, alfa-tocoferol e beta-caroteno) em plasma de doadores não diabéticos e diabéticos tipo 1.....	48
Tabela 11. Efeito do complexo vitamínico na produção de citocinas por células mononucleares de doadores não diabéticos e diabéticos tipo 1.....	57
Tabela 12. Estudo das vias de sinalização celular na liberação de ROS em células mononucleares de não diabéticos e diabéticos tipo 1 na presença ou ausência do complexo vitamínico.....	58
Tabela 13. Resumo das influências metabólicas do complexo vitamínico em células mononucleares de não diabéticos e diabéticos tipo 1.....	60