

1. SUMARIO

1. SUMÁRIO	100
2. INTRODUÇÃO	12
2.1. Diabetes	12
2.2. Radicais livres	14
2.3. Estresse Oxidativo.....	16
2.4. A Defesa Antioxidante	16
2.5. Sistema Imunológico.....	22
3. JUSTIFICATIVA.....	30
4. OBJETIVOS	31
4.1. Objetivos específicos	31
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
5.1. Aparelhos e equipamentos	32
5.2. Reagentes.....	33
5.3. Soluções	34
5.4. Seleção de Doadores	35
5.5. Coleta de sangue	37
5.6. Separação de Sangue e Obtenção de Células Mononucleares e Plasma.....	37
5.7. Ensaio de MTT	38
5.8. Ensaio de quimioluminescência	40
5.9. PCR quantitativo em tempo real (RT- PCR).....	41
5.10. Sinalização celular.....	42
5.11. Avaliação de citocinas	43
5.12. Análise estatística	44
6. RESULTADOS.....	45
6.1. O complexo vitamínico tem efeito antioxidante em células de doadores diabéticos tipo 1 (DM1) e não diabéticos(ND)?.....	45

	doadores DM1 e ND também se altera na presença de vitaminas antioxidantes?.....	46
6.3.	O poder redutor plasmático, influenciado pelo complexo vitamínico, fornece perfil diferenciado do encontrado nas células?.....	48
6.4.	As vitaminas, antioxidantes não enzimáticos, influenciam a expressão de enzimas antioxidantes em células de doadores diabéticos tipo 1 e não diabéticos?	49
6.5.	As subunidades da NADPH oxidase têm papel na redução e/ou aumento da produção de ROS por células com o complexo vitamínico?.....	52
6.6.	A ativação da NADPH oxidase e a consequente produção de ROS podem ter sido influenciadas pela produção diferenciada de citocinas?.....	56
6.7.	O padrão de sinalização é o mesmo na presença ou ausência do complexo vitamínico?	57
7.	DISCUSSÃO.....	61
7.1.	O complexo vitamínico tem efeito antioxidante em células de doadores diabéticos tipo 1 (DM1) e não diabéticos(ND)?.....	Erro! Indicador não definido.
7.2.	O poder redutor celular de doadores DM1 e ND também se altera na presença de vitaminas antioxidantes?.....	Erro! Indicador não definido.
7.3.	O poder redutor plasmático, influenciado pelo complexo vitamínico, fornece perfil diferenciado do encontrado nas células?.....	Erro! Indicador não definido.
7.4.	As vitaminas, antioxidantes não enzimáticos, influenciam a expressão de enzimas antioxidantes em células de doadores diabéticos tipo 1 e não diabéticos? ..	Erro! Indicador não definido.
7.5.	As subunidades da NADPH oxidase têm papel na redução e/ou aumento da produção de ROS por células com o complexo vitamínico?	Erro! Indicador não definido.
7.6.	A ativação da NADPH oxidase e a consequente produção de ROS podem ter sido influenciadas pela produção diferenciada de citocinas?.....	Erro! Indicador não definido.
7.7.	O padrão de sinalização é o mesmo na presença ou ausência do complexo vitamínico?	Erro! Indicador não definido.
8.	CONCLUSÃO.....	70
9.	BIBLIOGRAFIA.....	71
10.	ANEXO I.....	77
11.	ANEXO II	78

2. INTRODUÇÃO

2.1.Diabetes

O diabetes está se tornando a epidemia do século e já afeta cerca de 346 milhões de pessoas em todo o mundo. A previsão é de que esse número dobre até 2030. Estima-se que boa parte das pessoas que têm diabetes, doença que pode atingir crianças de qualquer idade, desconhece a sua própria condição.[1]

No Brasil, de acordo com o Vigitel 2013 (Sistema de Monitoramento de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas Não Transmissíveis), a ocorrência média de diabetes na população adulta (acima de 18 anos) é de 7,4%, enquanto entre jovens de 18 a 24 anos é de 0,9%. [1]

Apesar de sua etiologia não ser bem definida, infecção viral, doença auto-imune e fatores ambientais são considerados.As duas formas principais de diabetes são Tipo 1 e Tipo 2, sendo o tipo 1 caracterizados pela perda de função de células beta. Isto é tipicamente causado via auto-imune, induzindo a morte celular progressiva. No diabetes tipo 2 é mais variável, comprometendo diferentes graus de falha celular relativos a variações na resistência à insulina. [2][9]

Considerada como uma doença crônica comum entre crianças e adultos jovens, o Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1)pode se desenvolver em qualquer faixa etária.[3]

Apesar do DM1 acometer apenas de 5 a 10% de todos os pacientes com Diabetes, permanece como uma desordem crônica,séria, com consequências a curto e longo prazo. [4]

A evolução da doença não é aguda e sim um processo de auto agressão de evolução lenta que provavelmente se desenvolve durante anos numa fase pré clínica. No período de manifestação da doença, com apresença de hiperglicemia e cetose, as células secretoras de insulina já estão em número muito diminuído ou praticamente ausentes.[6]

Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

pancreatopatia; betapancreáticas, denominado insulite, ocorre pela agressão imunológica mediada por células linfocitárias, macrófagos e células “natural killer”, sendo, portanto, um processo dependente da imunidade celular. [6]

A doença caracteriza-se por hiperglicemia crônica com distúrbios do metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas, que, em longo prazo, associa-se a danos, disfunção e falência de múltiplos órgãos, especialmente rins, coração, vasos sanguíneos, nervos e olhos. [7]

Tem sido demonstrada uma relação direta entre hiperglicemia cronicamente mantida e as complicações micro e macrovasculares. Entretanto, hiperglicemia crônica ou intermitente tem sido identificada na patogênese da lesão endotelial no diabetes e, em particular, no diabetes tipo 1 (DM1), disfunção endotelial tem sido demonstrada mesmo quando a normoglicemia é alcançada. [7]

Há quatro hipóteses sobre as causas de complicações do diabetes geradas pela hiperglicemia (Figura 1): aumento da atividade na via dos polióis, formação de produtos avançados de glicosilação não-enzimática (AGEs), ativação de isoformas da proteína quinase C (PKC) e aumento do fluxo da via hexosaminas. [8]

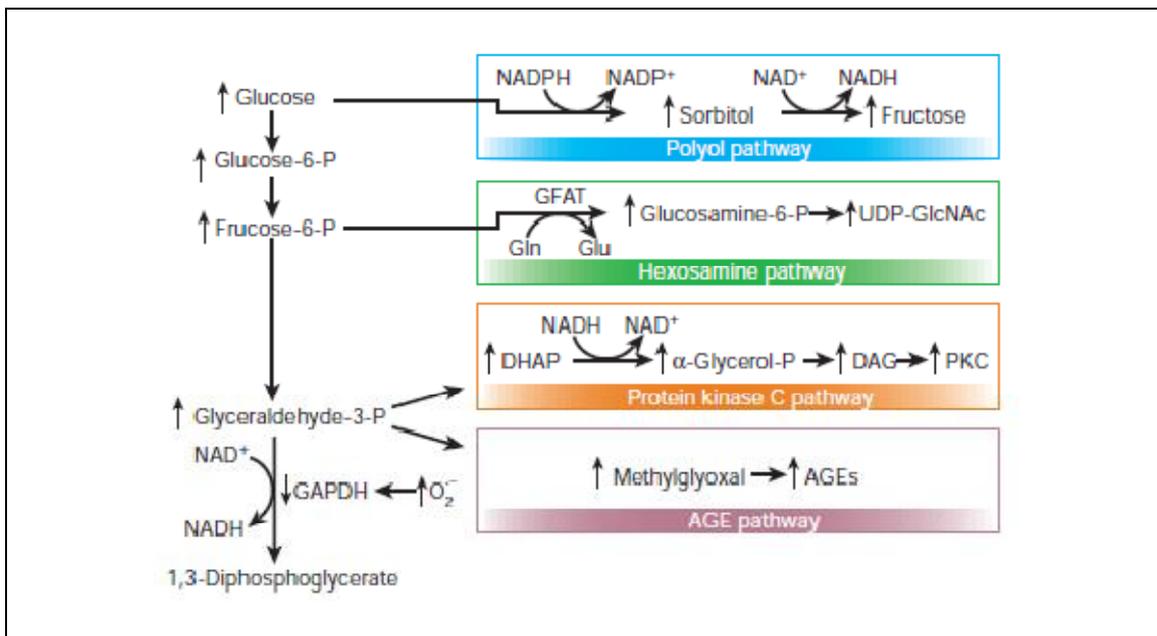


Figura 1. Mecanismo unificado de dano celular induzido pela hiperglicemia. [8] Excesso de superóxido parcialmente inibe a enzima glicolítica (GAPDH), divergindo metabólitos da glicólise em vias de super-utilização da glicose.

Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

em todas as células lesadas, como consequência da hiperglicemia, é a produção aumentada de ROS (espécies reativas de oxigênio), sendo esta hipótese capaz de unificar todas as vias. [8]A oxidação da glicose é vista como a fonte principal de geração de radicais livres, principalmente superóxido e radicais hidroxila altamente reativos.[9]

2.2.Radicais livres

Os radicais livres podem ser definidos como moléculas ou fragmentos moleculares contendo um ou mais elétrons desemparelhados nos orbitais atômicos ou moleculares. Estes elétrons desemparelhados fornecem considerável grau de reatividade aos radicais livres. Esta ampla definição inclui o átomo de hidrogênio (um elétron desemparelhado), maioria dos metais de transição e a própria molécula de oxigênio. [10]

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.

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. [11]

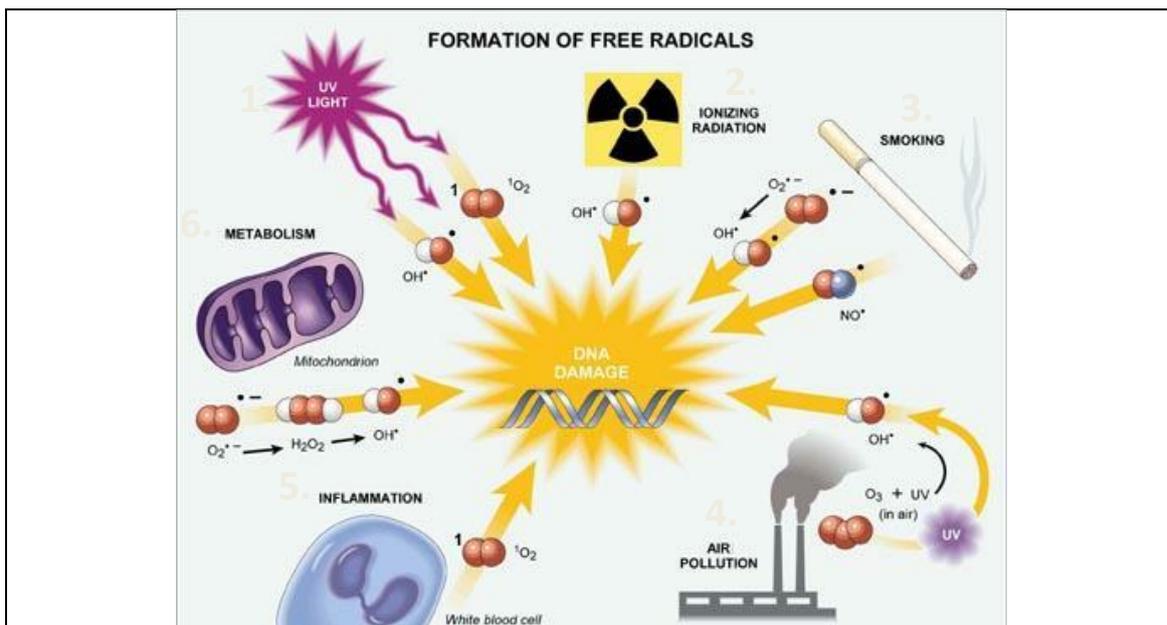


Figura 2. Principais contribuintes para a formação de Radicais Livres
Fontes geradoras de Radicais livres: 1. Luz UV, 2. Radiação ionizante, 3. Fumo, 4. Poluição do ar, 5. Inflamação, 6.

Estudos recentes indicam que a NAD(P)H-oxidase é a maior fonte de produção de ROS em muitas células fagocíticas e não fagocíticas. A NAD(P)H-oxidase é formada por sub-unidades de membrana, tais como gp91phox e p22phox e sub-unidades citosólicas, tais como p40phox, p47phox e p67phox. Quando ativadas, algumas sub-unidades são fosforiladas por várias cinases, incluindo a PKC e são translocadas para a membrana, formando a oxidase ativa cataliticamente (Figura 3). [12] [13]

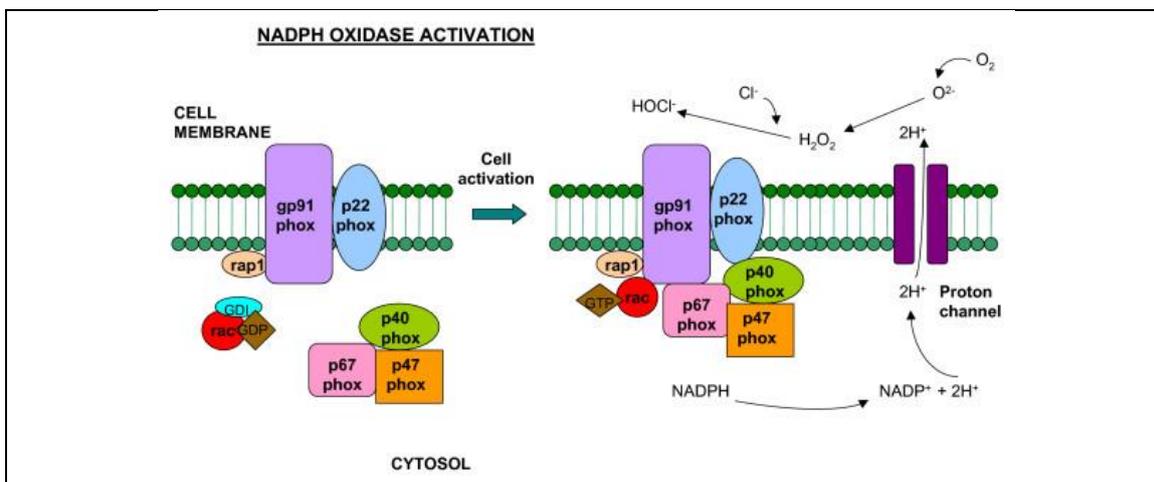


Figura 3. Ativação da NAD(P)H-oxidase.

Em células em repouso, os componentes da NADPH oxidase estão distribuídos no citosol e na membrana. Resumidamente, quando a célula é ativada, os componentes citosólicos p47phox, p67phox e p40phox são fosforilados e migram para a membrana, onde associam com os componentes da membrana gp91phox e p22phox. A NADPH oxidase ativada reduz o oxigênio e forma ânions superóxido. [14]

Em condições fisiológicas, a maior fonte de ROS no organismo vem do vazamento de elétrons da mitocôndria e cadeia transportadora de elétrons. Todas as células aeróbias transformam o oxigênio molecular a superóxido (O_2^-) o qual é reduzido a H_2O . Em 1 a 3% das vezes, este superóxido não é reduzido ficando livre como radical e gerando uma cascata de outros radicais (Figura 4). [15] [16]

Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

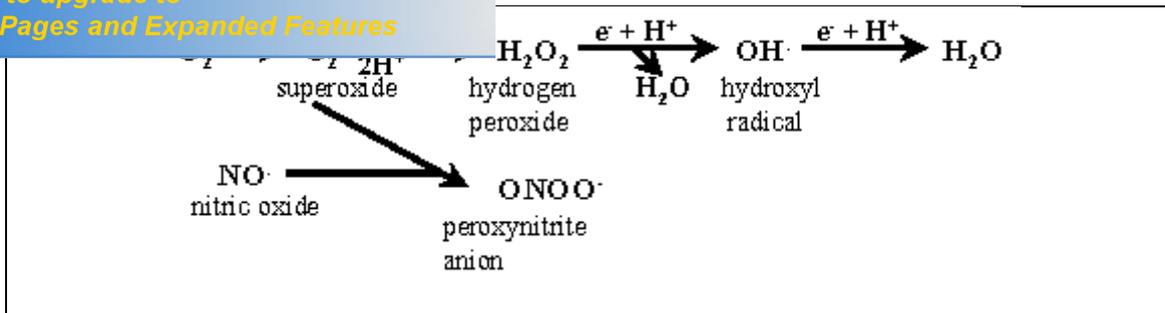


Figura 4. Reação em cadeia dos Radicais Livres.[17]

Os radicais livres e seus derivados tem funções fisiológicas importantes incluindo: regulação do tônus vascular, sensibilidade à tensão de oxigênio e regulação de funções controladas pela concentração de oxigênio, enfatizar transdução de sinais de vários receptores de membrana incluindo receptores antigênicos de linfócitos a respostas de estresse oxidativo que garantem a homeostase oxidante/redutora. [18]

2.3. Estresse Oxidativo

A falta de equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando a danos, é chamada de estresse oxidativo. Tal dano pode afetar todos os tipos de moléculas biológicas incluindo DNA, lipídeos, proteínas e carboidratos. No entanto, o estresse oxidativo pode estar envolvido em processos como mutagênese, carcinogênese, dano às membranas, peroxidação lipídica e oxidação e fragmentação protéica. [19]

Há fortes evidências de que o estresse oxidativo tem grande importância nos processos de envelhecimento, transformação e morte celular, com consequências diretas em muitos processos patológicos, entre eles, a indução do câncer e a propagação de AIDS em pacientes soropositivos (HIV+), bem como na fisiopatologia de muitas doenças crônicas, entre elas, doenças auto-imunes, cardiopatias, câncer, doenças do pulmão, intoxicação por xenobióticos e muitas outras.[20]

A princípio, proteção contra efeitos deletérios pode ser feita através de prevenção, interceptação e reparo. Todas essas formas de proteção são realizadas fisiologicamente e se denominam defesa antioxidante.[19]

2.4.A Defesa Antioxidante

Halliwell e Gutteridge, 1989[9] descreveram antioxidante como “qualquer substância que em baixa concentração comparada ao substrato oxidável significativamente atrasa ou inibe a

antes atuam em diferentes níveis na proteção dos organismos: Em defesa contra os radicais livres ao impedir a sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre. Interceptando os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular. Outro mecanismo de proteção é o reparo das lesões causadas pelos radicais. Esse processo está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas. A importância concernente ao desempenho dos antioxidantes *in vivo* depende dos fatores: tipos de radicais livres formados, onde e como são gerados esses radicais e doses ideais para obter proteção. [9]

Assim, é perfeitamente possível que um antioxidante atue como protetor em determinado sistema, mas que falhe na proteção, ou mesmo que aumente as lesões induzidas em outros sistemas ou tecidos. [21]

Os antioxidantes podem ser classificados em enzimáticos e não enzimáticos (Tabela 1).

Não-enzimático	L-cisteína
α -tocoferol (vitamina E)	curcumina
β -caroteno	Enzimático
Ácido ascórbico (vitamina C)	superóxido dismutase
Flavonóides	catalase
Proteínas do plasma	NADPH-quinona oxidoreductase
Selênio	glutathiona peroxidase
Glutathiona	enzimas de reparo
Clorofilina	

Tabela 1. Principais agentes de defesa antioxidante. [22]

Os organismos eucariotos possuem enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, a catalase e a glutathiona peroxidase que reagem com os compostos oxidantes e protegem as células e os tecidos do estresse oxidativo. Em adição aos efeitos protetores dos antioxidantes endógenos, a inclusão de antioxidantes na dieta é de grande importância e está relacionado com a diminuição do risco do desenvolvimento de doenças associadas ao acúmulo de radicais livres. [22]

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

Estes antioxidantes não atuam isoladamente. Há grande interação entre os compostos produzidos endogenamente e os antioxidantes provenientes da dieta. Dentre estes, são citados as vitaminas e os minerais como mais importantes. [23]

Vitaminas Antioxidantes

As vitaminas C, E e o beta-caroteno são consideradas excelentes antioxidantes, capazes de sequestrar os radicais livres com grande eficiência (Figura 5). O uso de medicamentos, o tabagismo, as condições nutricionais, o consumo de álcool, a poluição do ar e outros fatores podem diminuir os níveis de antioxidantes celulares. [24]

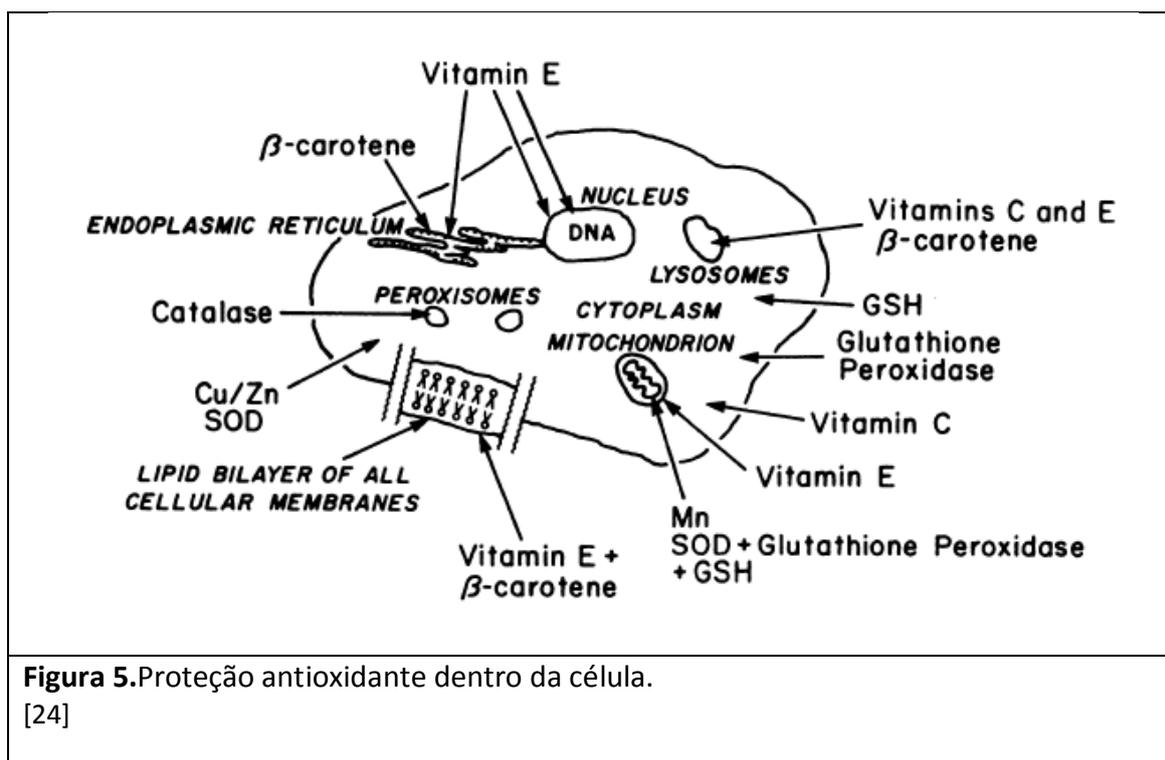


Figura 5.Proteção antioxidante dentro da célula.
[24]

Vitamina E

O termo vitamina E engloba diferentes compostos, principalmente os tocoferóis e tocotrienóis, sendo o α -tocoferol o mais abundante e importante em humanos. A reatividade da vitamina E com radicais peroxil definem sua principal função bioquímica, a atividade antioxidante. A

oxidante *in vivo* protegendo lipídeos de tecidos e membranas do ataque dos radicais livres. [23]

Em adição, a vitamina E é o principal antioxidante lipossolúvel no plasma e nas células vermelhas do sangue protegendo contra danos de peroxidação lipídica. Esta é um removedor quando seu grupo fenólico hidroxila reage com o radical peroxil orgânico formando o hidroxiperóxido e o radical tocoferoxil.[23]

A vitamina E tem a capacidade de impedir a propagação das reações em cadeia induzidas pelos radicais livres nas membranas biológicas. Os danos oxidativos podem ser inibidos pela ação antioxidante dessa vitamina, juntamente com a glutathione, a vitamina C e os carotenóides, constituindo um dos principais mecanismos da defesa endógena do organismo.[25]

A recomendação de vitamina E pelo *DietaryReferenceIntake* (DRI) e *Recommended Daily Amount* (RDA) é de 15mg/dia. A DRI é baseada no alfa-tocoferol por ser a forma mais ativa. E, devido à sua ação anticoagulante e riscos associados a sangramentos, o nível máximo de tolerância é de 1.000mg por dia.[26]

O alfa-tocoferol também tem funções moleculares ao inibir a atividade da proteína cinase C (PKC), envolvida em proliferação e diferenciação celular. O mecanismo de inibição da proteína cinase C pelo α -tocoferol pode ser, em parte, atribuído à sua atenuação na geração de diacilglicerol advindo da membrana, um lipídeo que ativa a translocação e atividade da PKC.[26]

Vitamina C

A vitamina C atua na fase aquosa como um excelente antioxidante sobre os radicais livres, mas não é capaz de agir nos compartimentos lipofílicos para inibir a peroxidação dos lipídeos. Por outro lado, estudos *in vitro* mostraram que essa vitamina na presença de metais de transição, tais como o ferro, pode atuar como uma molécula pró-oxidante e gerar os radicais H_2O_2 e $OH\cdot$. Geralmente, esses metais estão disponíveis em quantidades muito limitadas e as propriedades antioxidantes dessa vitamina predominam *in vivo*. [27]

o, a vitamina C é considerada o antioxidante mais importante em fluidos extracelulares com diferentes atividades antioxidantes. O ácido ascórbico é capaz de eliminarradicais como superóxido, peróxido de hidrogênio, hipoclorito, radical hidroxila, radicais peroxil e oxigênio singlet. [23]

O ácido ascórbico também atua na proteção de membranas contra a peroxidação potencializando a atividade do alfa-tocoferol. Esse reduz o radical tocoferoxil renovando a atividade de remoção do tocoferol. [23]

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 (RecommendedDietaryAllowance), 60 mg, é capaz de manter a 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. 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. [28]

Beta-caroteno

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 neutralizantes do oxigênio singlet, extinguem diretamente os radicais livres e inibem a peroxidação lipídica. [29]

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. O beta-caroteno tem dois anéis beta, e, como os outros carotenos tem ação de remoção dos os radicais peroxilas. Este é o caroteno mais estudado e mostrou maior ação protetora contra a peroxidação do LDL quando comparado à sua classe. [29]

Por não se considerarem suficientes os dados consignados na literatura, não se emitiram DRI (*DietaryReferenceIntake*), ou doses dietéticas recomendadas, nem AI (*AdequateIntake*), ingestão adequada para beta-caroteno, mesmo na sua atividade pró-vitamínica. A divergência

a convenção de uma UL (*TolerableUpperIntakeLevel*), nível de ingestão máxima tolerável, para os carotenóides. [30]

De acordo com o estudo “The Supplémentation em Vitamines etMinérauxAntioxydants (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. [31]

As três vitaminas atuam não somente isoladas, mas mais eficientemente em conjunto (Figura 6). 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 (o radical livre do alfa-tocoferol), impedindo sua disseminação. 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 removedor 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): alfa-tocoferol na superfície e beta-caroteno no interior e concomitante coma remoção do alfa-tocoferol aos radicais peroxil produzidos pelo beta-caroteno.[32]

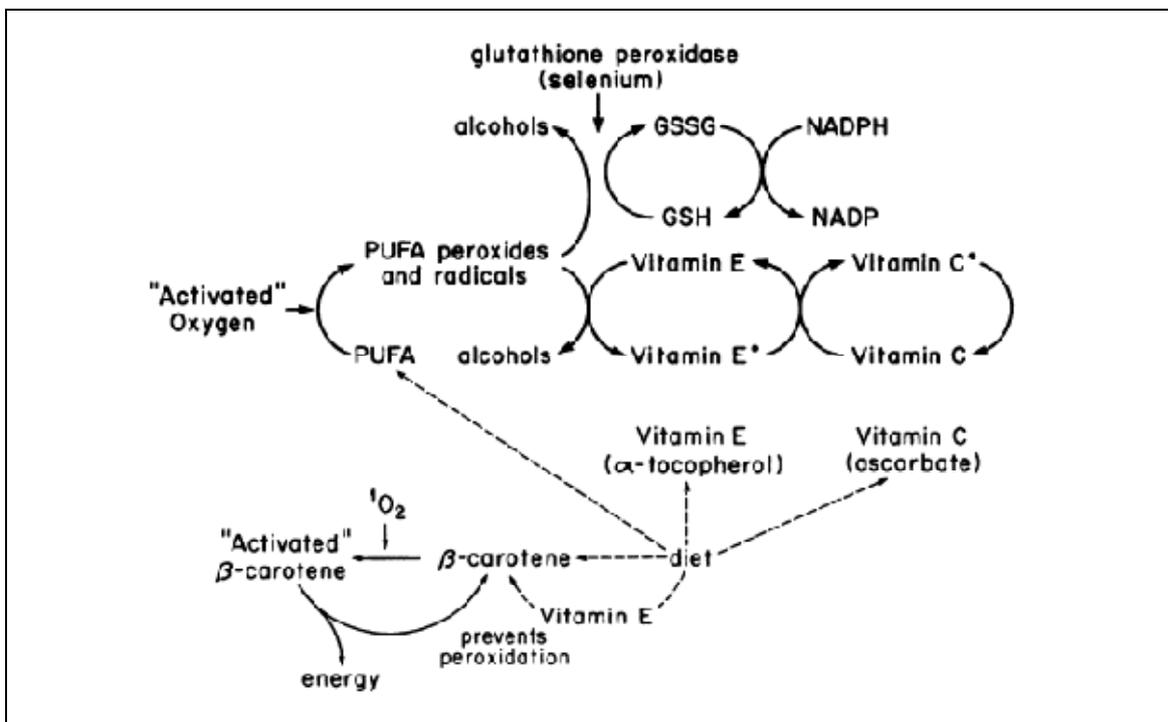


Figura 6. Interação dos micronutrientes na defesa antioxidante. [24]

osa 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.[32]

2.5.Sistema Imune

Células do sistema imunológico se acumulam, geralmente, maiores concentrações de nutrientes antioxidantes que outras células e severa deficiência de antioxidantes como vitamina C e alfa-tocoferol afetam a resposta imune. [33]

Estas células são sensíveis a mudanças no balanço oxidante/antioxidante devido à sua alta porcentagem de ácidos graxos poli-insaturados em suas membranas plasmáticas. Elas são frequentemente expostas a mudanças nesse balanço pela presença de intermediários reativos de oxigênio produzidos normalmente em seu funcionamento. [33]

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). [34]

Os linfócitos T e B são responsáveis pelo reconhecimento específico dos antígenos. Cada célula B está geneticamente programada para codificar receptores de superfície para determinados antígenos, os linfócitos T constituem várias subpopulações diferentes com uma variedade de funções.[35]

Células mononucleares, por exemplo, linfócitos e monócitos, tem papel central na regulação de respostas imunes/inflamatórias. Células mononucleares são fonte fundamental de ROS em condições patofisiológicas e resistem a danos oxidativos por gerenciarem grandes quantidades de ROS em inflamações.[35]

As células citotóxicas reconhecem e destroem outras células que se tornaram infectadas. As células auxiliares que controlam a inflamação são: basófilos, mastócitos e plaquetas. Os

osidades no seu citoplasma e uma série de mediadores que provocam inflamação nos tecidos circundantes.[35]

A inflamação é causada por infecções e injúria tecidual o qual induzem uma cascata complexa de eventos fisiológicos que promove proteção aos tecidos, restringindo os danos no local da infecção ou injúria, mas podendo ter efeitos deletérios quando de forma exacerbada como a liberação de radicais livres.[35]

Em geral, uma resposta inflamatória aguda é de curta duração e, além de uma reação local, ocorre também uma reação sistêmica, chamada de resposta de fase aguda. Em estágios iniciais da inflamação o tipo celular predominante é o neutrófilo, em fases mais tardias monócitos e linfócitos também migram para o local, amplificando o processo inflamatório.[35]

Vários mediadores participam ativamente da resposta inflamatória: quimiocinas realizam quimiotaxia de leucócitos; enzimas plasmáticas aumentam a permeabilidade vascular; plasminina degrada coágulo sem produtos quimiotáticos e ativa proteínas do sistema complemento e seus derivados, como anafilatoxinas que induzem degranulação de mastócitos e consequente liberação de histamina, e opsoninas que induzem a opsonização de microrganismos, facilitando a fagocitose; mediadores lipídicos como tromboxanos, prostaglandinas e leucotrienos participam do processo de vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular; citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- α) induzem efeitos locais, tais como indução da expressão de moléculas de adesão e de quimiocinas, facilitando a migração de leucócitos, e efeitos sistêmicos como a indução de proteínas de fase aguda, levando a febre.[35]

A produção de citocinas é desencadeada quando as células são ativadas por diferentes estímulos, como agentes infecciosos, tumores ou estresse. As citocinas atuam na comunicação entre as células, promovendo a indução ou regulação da resposta imune. As principais características das citocinas são (Figura 7): Uma mesma citocina pode ser produzida por mais de um tipo celular; pode ter diferentes efeitos, dependendo das condições do microambiente – pleiotropismo; diferentes citocinas podem exercer a mesma função – redundância; elas podem potencializar ou inibir o efeito de outras citocinas – sinergismo ou antagonismo, respectivamente; a maioria das citocinas exerce efeitos parácrinos (ação sobre células presentes nas proximidades das células produtoras da citocina) ou efeitos autócrinos (ação

em disso, algumas citocinas exercem efeitos endócrinos, agindo sobre células presentes em outros locais que não os da célula produtora daquela citocina. [27]

Citocina	Células produtoras	Alvos e efeitos	Implicação terapêutica
1. Citocinas relacionadas à resposta imune inata			
TNF- α	Macrófagos, células dendríticas, células endoteliais	Vasculatura (inflamação); fígado (indução de proteínas de fase aguda); caquexia; morte celular; ativação de neutrófilos	Anti-TNF- α (Infliximab) e sTNFR:Fc (Etanercept), doenças auto-imunes (em uso)
IL-1	Monócitos, macrófagos, células endoteliais e epiteliais	Vasculatura (inflamação); hipotálamo (febre); fígado (indução de proteínas de fase aguda)	IL1Ra, choque séptico (modelos experimentais); artrite reumatóide (ensaio clínico)
IL-12	Macrófagos, células dendríticas	Ativa células NK, promove a diferenciação de células Th1	IL-12, linfomas; anti-IL-12, doença de Crohn (ensaios clínicos)
IL-6*	Macrófagos, células endoteliais, fibroblastos	Fígado (induz proteínas de fase aguda), promove proliferação de células B e secreção de anticorpos, inibe diferenciação de células Treg	IL-6, câncer (ensaio clínico)
IFN- α	Macrófagos	Induz resposta antiviral, aumenta a expressão de MHC classe I e ativa células NK	IFNrec, hepatite e câncer (em uso)
IL-23	Macrófagos	Promove a diferenciação de células Th17	Anti-IL-23, encefalomielite auto-imune (modelo experimental)
2. Citocinas relacionadas à resposta imune adaptativa			
IL-2	Células T	Induz proliferação de células T e B, ativação de células NK e pode promover morte induzida por ativação	Anti-IL2R (anti-TAC), rejeição de transplantes (modelos experimentais)
IFN- γ	Células Th1, células T CD8+, células NK	Ativa macrófagos, induz a expressão de MHC classe I e classe II, aumenta apresentação de antígenos	Actimmune, doença granulomatosa crônica, osteopetrose (em uso)
IL-5*	Células Th2	Promove diferenciação e ativação de eosinófilos	Anti-IL-5, síndrome hipereosinofílica (ensaio clínico)
IL-4	Células Th2, mastócitos	Promove a diferenciação de células Th2 e mudança de classe de anticorpos para IgE	IL-4, leucemia (ensaio clínico)
IL-17	Células Th17, neutrófilos	Promove inflamação induzindo a produção de citocinas inflamatórias como IL-6, IL-1 e TNF- α em células endoteliais	Anti-IL-17, doenças auto-imunes (modelos experimentais)
IL-10	Macrófagos, células dendríticas, linfócitos Treg	Inibe proliferação de células Th1	IL-10, psoríase e hepatite C (ensaio clínico)
TGF- β	Células T, macrófagos, fibroblastos	Inibe proliferação de células T e B, inibe ativação de macrófagos, promove mudança de classe de anticorpos para IgE e diferenciação de células Treg	TGF- β , câncer (ensaio clínico); anti-TGF- β , leishmaniose (modelo experimental)
3. Citocinas relacionadas à hematopoiese (hematopoietinas)			
Eritropoetina	Hepatócitos	Produção de eritrócitos	Epogen, estimula produção de eritrócitos (em uso)
IL-11	Macrófagos, células endoteliais, fibroblastos	Produção de plaquetas	Neumega, estimula produção de plaquetas (em uso)
GM-CSF	Células Th1 e Th2, macrófagos e mastócitos	Produção de granulócitos e macrófagos, maturação e ativação de células dendríticas	Leukine, estimula a produção de células mielóides após transplante de medula óssea (em uso)
G-CSF	Macrófagos, células endoteliais, fibroblastos	Produção de neutrófilos	Neupogen, reduz o risco de infecção em pacientes com câncer submetidos à quimioterapia (em uso)

Figura 7. Principais citocinas, suas funções e implicações terapêuticas.

IL, interleukin; IFN, interferon; TNF, tumor necrosis factor; TGF, transforming growth factor; G-CSF, granulocyte colony stimulating factor; GM-CSF, granulocyte and macrophage colony stimulating factor; IL2R, receptor de IL-2; sTNFR:Fc, receptor solúvel de TNF conjugado a porção Fc de IgG; Th1, células T helper tipo 1; Th2, células T helper tipo 2, Th17, células T helper produtoras de IL-17, Treg, células T reguladoras; IFNrec, interferon recombinante; IL1Ra, antagonista do receptor de IL-1. *IL-6 e IL-5 também são consideradas citocinas hematopoietinas. Fonte: [27]

O efeito das citocinas se dá após a ligação ao seu receptor específico expresso na superfície da célula-alvo, desencadeando a transdução de sinais no interior da célula. [27]

Todos os organismos multicelulares dependem de redes altamente complexas de sinais intra e extracelulares para orquestrar comunicação entre as células em diversos processos fisiológicos como manutenção da homeostase tecidual, respostas reparativas a danos teciduais e organogênese. Tipicamente, sinais extracelulares são compostos de fatores de crescimento, citocinas, hormônios e neurotransmissores que ligam a receptores específicos na superfície celular. Essa interação receptor-ligante gera, então, vários tipos de sinais intracelulares que podem envolver mudanças. A continuação da sinalização segue através de segundos mensageiros e depois cascatas de fosforilação protéica. Posteriormente, essas vias de sinalização intracelular levam à ativação de fatores de transcrição que regulam a expressão de genes específicos essenciais para diversas funções celulares. [36]

As proteínas quinases são a maior família de proteínas em eucariotos e são a chave central da comunicação no controle intracelular, regulação e transdução de sinais. O mecanismo regulador inclui vários fenômenos que vão desde alterações químicas e estruturais da proteína até o controle transcricional. Por isto, um detalhado entendimento do mecanismo de controle das proteínas quinases é foco de interesse de muitas pesquisas.[37]

A primeira estrutura completamente determinada de uma proteína quinase ativa foi a da proteína quinase A (PKA), também chamada de proteína quinase dependente do AMP cíclico (PKAc), cuja estrutura catalítica é muito conservada. Atualmente, cerca de 50 estruturas cristalinas do sítio catalítico dessas proteínas foram publicadas no PDB (*Protein Data Bank*).[37]

PKA

A fosforilação reversível de proteína é um mecanismo regulatório chave em células eucarióticas. A fosforilação protéica foi inicialmente demonstrada como reguladora da atividade da glicogênio fosforilase em resposta ao glucagon. Um fator que mediava o efeito do glucagon no estado de fosforilação da glicogênio fosforilase foi então identificado como 3', 5'-adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e o conceito do AMPc como segundo mensageiro intracelular para um grande número de hormônios, neurotransmissores e outras substâncias sinalizadoras. O alvo para o AMPc foi purificado e identificado como uma proteína quinase regulatória de AMPc, nomeada PKA, ou proteína quinase dependente de AMPc (Figura 8).[38]

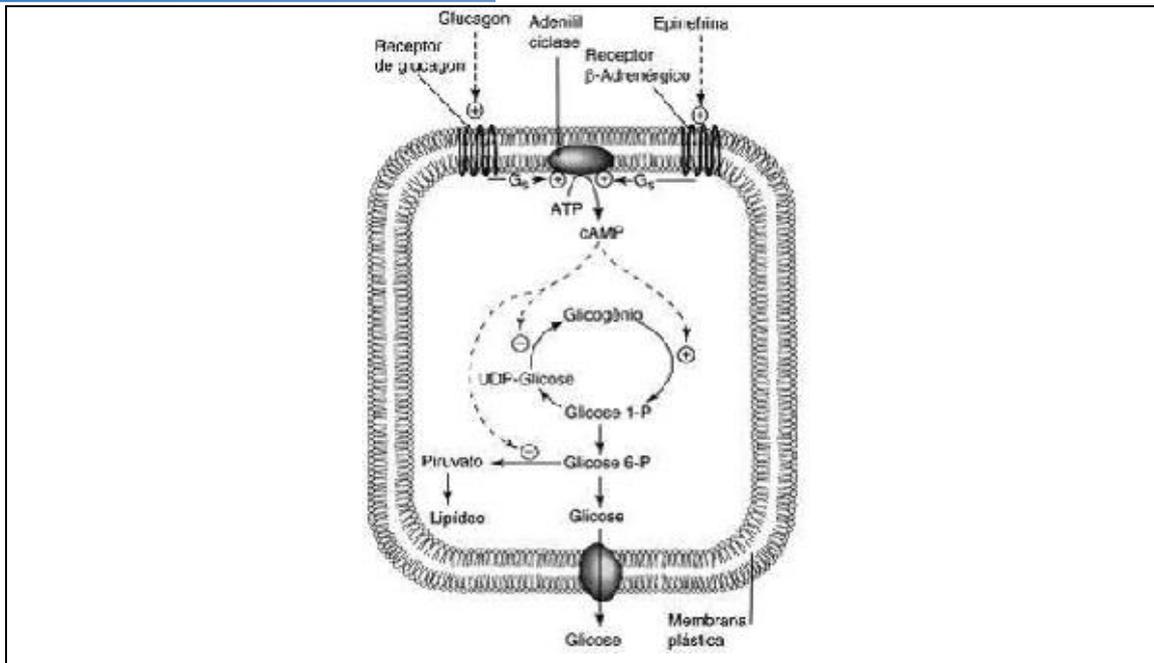
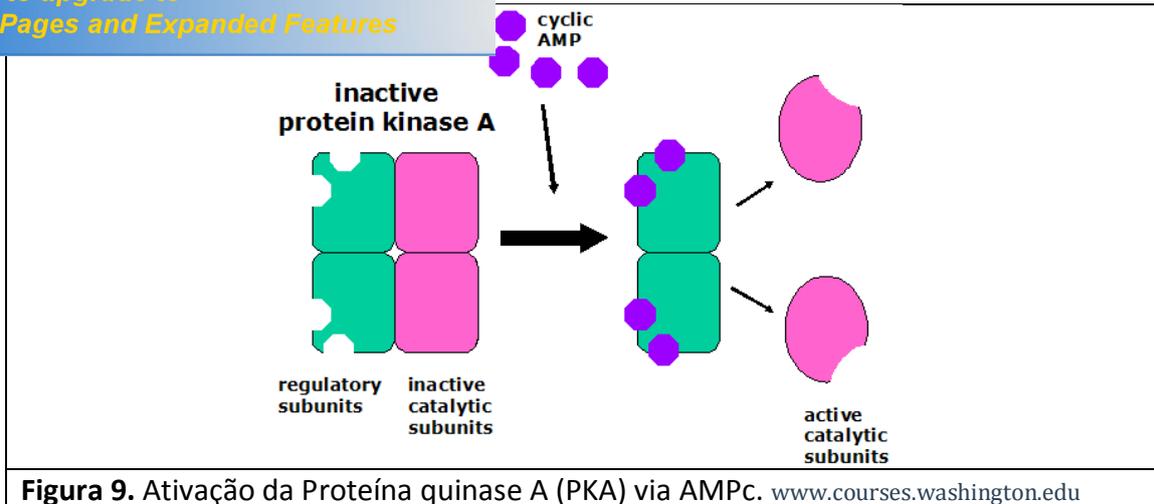


Figura 8. Efeitos intracelulares do AMPc.

Fonte: <http://grupo4b-ampc.blogspot.com/>

A proteína quinase dependente de AMPc, a PKA, é encontrada sob a forma de um heterotetrâmero composto por duas subunidades catalíticas e duas subunidades regulatórias. Cada subunidade regulatória possui dois sítios de ligação para o monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). A ligação deste substrato ao sítio regulatório leva a uma dissociação das subunidades regulatórias e catalíticas, permitindo que estas últimas catalisem a fosforilação de proteínas em resíduos regulatórios (Figura 9). Sabe-se que a PKA possui especificidade pelos aminoácidos serina e treonina presentes em motivos específicos, fosforilados em resposta a diferentes sinais intra e extracelulares. A sinalização por esta quinase é crítica em todos os níveis de organização celular.[38]



AMPc estimula a produção de ROS em granulócitos de pacientes com diabetes tipo 1 e 2 ao contrário do que é visto em doadores não diabéticos, sugerindo que a geração de ROS em pacientes diabéticos pode ser modulada por níveis intracelulares de AMPc.[39]

PKC

A PKC é uma das 3 principais quinasas serina-treonina. Ela está envolvida em eventos de transdução de sinais, respondendo a estímulos específicos hormonais, neuronais e de fatores de crescimento. Sua ação é catalisando a transferência de um grupo fosfato do ATP (adenosina tri-fosfato) a várias proteínas substrato. Da mesma forma, a PKC também sofre fosforilações antes de ser ativada, o que ocorre durante sua translocação do citosol para a membrana da célula. Sua ativação e translocação do citosol à membrana plasmática ocorre em resposta a aumento transitório de Diacilglicerol (DAG) ou exposição a agentes exógenos, conhecidos como forbol-ésteres. [40]

A família PKC inclui 12 isoformas. Estas isoformas são distribuídas em vários tecidos, demonstrando diferenças de acordo com sua localização. Por exemplo, a PKC- β está presente nas ilhotas pancreáticas, monócitos, cérebro e tecidos vasculares. [40]

O DAG celular é o principal ativador fisiológico da PKC; deriva de múltiplas fontes, incluindo a hidrólise de fosfatidil-inositídeos, metabolismo da fosfatidil-colina por fosfolipases ou síntese de novo. Também é possível que a ativação da via DAG-PKC induzida pela hiperglicemia seja resultado de glico-oxidação, já que existem evidências de que alguns oxidantes, como o H_2O_2 ,

mento do DAG e decorrente ativação da PKC têm sido descritos em tecidos de animais e humanos diabéticos, tais como retina, aorta, coração e glomérulo, mesmo quando o estímulo de hiperglicemia é agudo, assim como em células vasculares expostas a altas concentrações de glicose no meio de cultura. [40]

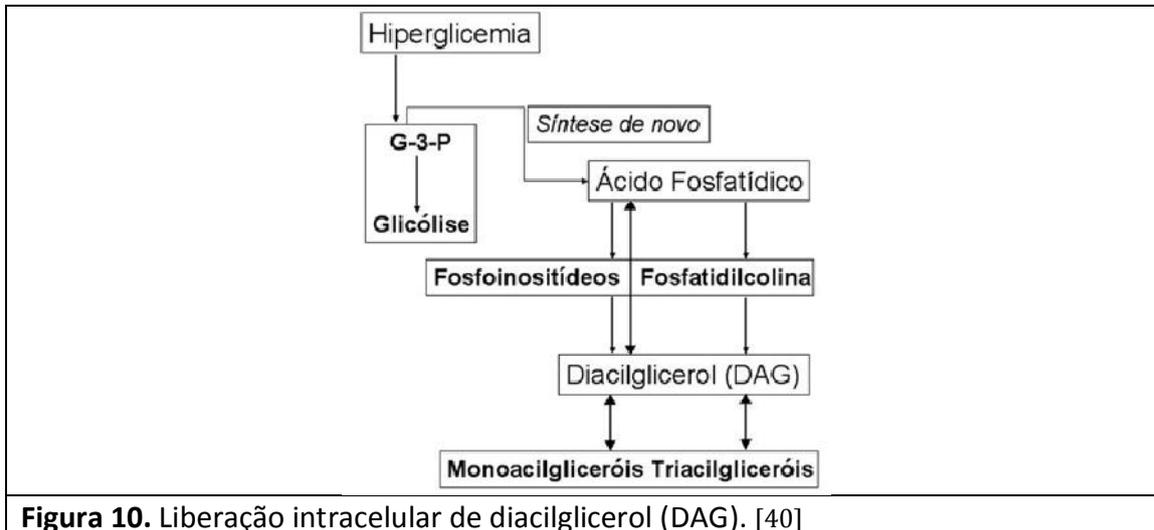


Figura 10. Liberação intracelular de diacilglicerol (DAG). [40]

Tem sido demonstrado que o alfa-tocoferol inibe proliferação de células musculares lisas e agregação plaquetária via inibição de PKC. [41] Outra discussão é a propriedade da vitamina E em inibir a ativação de DAG-PKC em tecidos vasculares e células vasculares em cultura expostas a altos níveis de glicose. Foi demonstrado que a vitamina E pode inibir a ativação da PKC provavelmente diminuindo níveis de DAG, uma vez que a adição direta de vitamina E a isoformas de PKC in vitro, não resultou em efeitos inibitórios.[42] Bioquimicamente, injeções intraperitoneais de vitamina E previnem o aumento nos níveis de DAG e PKC ativa na retina, aorta, coração e glomérulo renal de ratos diabéticos.[42]

Akt

As phosphatidylinositol-3 kinases, PI3Ks, pertencem à família das quinases lipídicas. Esta classe é dividida nas subclasses IA, que é ativada pelos receptores com atividade tirosina quinase (Receptor ProteinTyrosineKinase, RPTK), e na subclasse IB, que é ativada por receptores ligados a proteína G. [43]

PKB/Akt foi caracterizada após o isolamento de dois genes denominados akt1 e akt2, homólogos do oncogene viral v-akt, que é responsável por um tipo de leucemia no

Estudos revelaram que v-akt e seus homólogos humanos codificam uma proteína quinase com semelhança a proteína quinase C (PKC) e proteína quinase A (PKA), e então foi chamada PKB. Três membros da família PKB foram identificados, chamados PKB α (Akt1), PKB β (Akt2), e PKB γ (Akt3).[43]

A proteína Akt modula a função de vários substratos envolvidos na regulação da sobrevivência, progressão e crescimento celular. A Akt também é necessária para a translocação do GLUT4 (transportador de glicose 4) induzida pela insulina para a membrana plasmática. [43]

Akt/PKB é regulada pela liberação endógena e exógena de ROS sofrendo também estimulação de sua fosforilação pela insulina. [44] Aparentemente, a produção de ROS é dependente de Akt/PKB em células de diabéticos tipo 1 e 2. [39]

MAPK

As MAPK abrangem grande número de proteínas, tais como ERK1-ERK3 (quinase regulada por sinal extracelular), JNK1-JNK3 (quinase c-Jun N-terminal), p38 α , p38 β , p38 γ , p38a, ERK5, ERK7. MAPK requerem fosforilação de resíduo de tirosina e treonina, ambas catalisadas por MEK (quinase ativadora da MAP quinase), para se tornarem ativas. Como consequência, essas quinases são inativadas pelos três maiores grupos de fosfatases: todas as que removem fosfato de serina/treonina ou de tirosina e as fosfatases dual-específicas, que removem fosfato de serina, treonina e tirosina. [37]

As quinases JNK e p38 são mais responsivas a estímulos estressantes desde choque osmótico a radiação ionizante e estimulação por citocinas. Em células de mamíferos as isoformas de p38 são fortemente ativadas por estresse ambiental e citocinas inflamatórias. [37]

Várias evidências indicam que a atividade de p38 é crítica para respostas imunes e inflamatórias normais. P38 é ativada em macrófagos, neutrófilos e células T por inúmeros mediadores extracelulares de inflamação. P38 participa de respostas funcionais em macrófagos e neutrófilos como atividade respiratória, quimiotaxia, excitose, aderência e outros. Em células T, media diferenciação e apoptose regulando produção de interferon gama.[45]

Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

A hiperglicemia, mediada pelo aumento de espécies reativas de oxigênio, é um ativador de vias de sinalização, dentre elas a p38 MAPK (Figura 11). [46]Ao contrário, a vitamina C inibe a via NF- B, como também níveis intracelulares de ROS, as vias PKC e p38MAPK. Já a vitamina E exerce efeitos duais dependentes de diferentes doses intracelulares. [47,48]

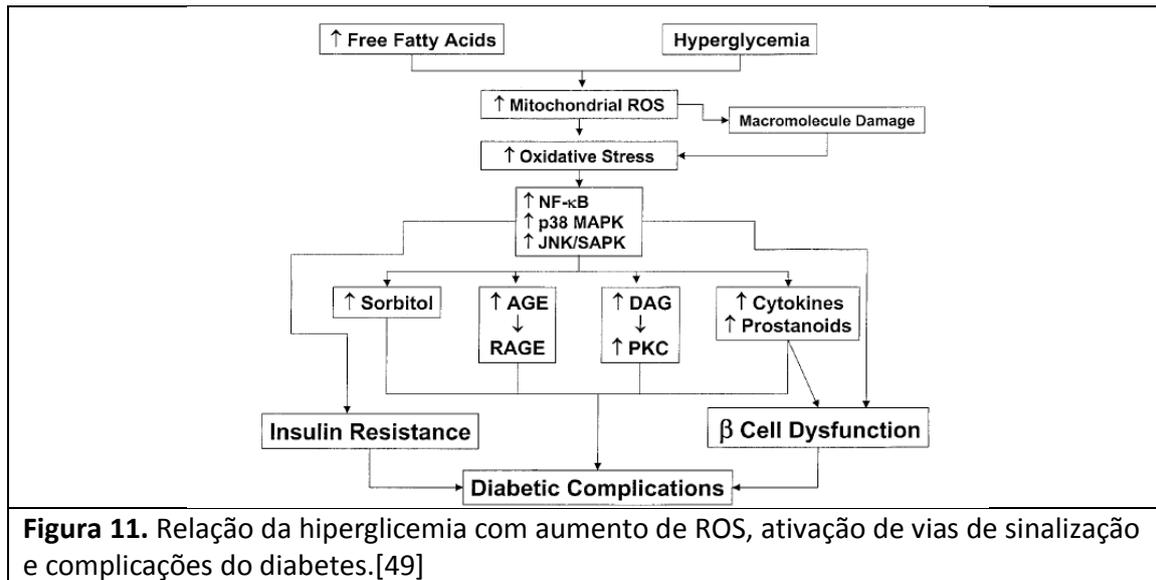


Figura 11. Relação da hiperglicemia com aumento de ROS, ativação de vias de sinalização e complicações do diabetes.[49]

3. JUSTIFICATIVA

Devido à grande utilização de antioxidantes sem orientação profissional, fortificação de alimentos industrializados e hábitos alimentares menos saudáveis, buscamos avaliar quais seriam os danos/benefícios de vitaminas antioxidantes a nível celular, inovando nesta análise (uma vez que a maioria dos estudos com vitaminas apresenta metodologias *in vivo*), observando os efeitos celulares, na presença ou ausência de uma doença crônica, o diabetes tipo 1.

Identificar possíveis alterações metabólicas exercidas por um complexo vitamínico (alfa-tocoferol, ácido ascórbico e beta-caroteno) em células mononucleares e plasma de doadores não diabéticos (ND) e diabéticos tipo 1 (DM1), abordandoos seguintes pontos:

4.1.Objetivos específicos

4.1.1. Avaliação dos compartimentos oxidativos e redutores em células mononucleares e plasma.

- Produção de ROS por ensaio de quimioluminescência dependente de luminol em células mononucleares;
- Poder redutor através de ensaio com MTT em células mononucleares e plasma.

4.1.2. Avaliação da expressão gênica de enzimas antioxidantes em células mononucleares.

- Expressão gênica de mRNA Zn-SOD, mRNA Mn-SOD e mRNA catalase por PCR em tempo real.

4.1.3. Avaliação da expressão gênica de subunidades do complexo NADPH oxidase em células mononucleares.

- Expressão gênica de mRNA p91phox, mRNA p47phox e mRNA p22phox em células mononucleares por PCR em tempo real.

4.1.4. Verificação da liberação de citocinas por células mononucleares.

- Dosagem de IL-6, TNF- α , IL-8, IL-10 e IL-4 em células mononucleares através de kits comerciais.

Realização na liberação de ROS por células

mononucleares.

- Produção de ROS por ensaio de quimioluminescência dependente de luminol em células mononucleares na ausência e presença de inibidores de vias de sinalização celular. Inibidores e vias estudados:
 - H89: inibidor de PKA
 - iPKB: inibidor da via de Akt/PKB
 - PD169316: Inibidor de p38 MAPK
 - Calphostin C: inibidor de PKC

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Aparelhos e equipamentos

- Agulhas descartáveis
- Banho termostático a 37° C
- Câmara de Neubauer
- Centrífuga
- Eppendorffs
- Estufa a 37°C e 5% de CO₂
- Grades para apoio de tubos
- Leitor ELISA
- Luminômetro de placas
- Microscópio
- Pipetas de 10-1000µL
- Pipetas graduadas de 5mL
- Pipetas pasteur
- Pipetas plásticas
- Ponteiras

- Placas de 96 poços branca
- Shaker
- Tubos de hemólise de vidro
- Tubos de vidro
- Tubos heparinizados à vácuo

5.2.Reagentes

- Bicarbonato de Sódio – ECIBRA
- Calphostin C - *Cladosporiumcladosporioides*- Calbiochem
- Vitaminas – α -tocoferol, beta-caroteno e ácido ascórbico - Sigma
- Dimetil-sulfóxido – Sigma
- H89 Dihydrochloride - Calbiochem
- iPKB– Calbiochem
- PD169316–Calbiochem
- Isopropanol – Vetec
- High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit - Applied Biosystems
- Kit de IL-6 – Science Pro
- Kit de IL-8 - Science Pro
- Kit de TNF- α – Science Pro
- Kit de IL-10 - Science Pro
- Kit de IL-4 - Science Pro
- KH_2PO_4
- Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4phthalozinedione) – Sigma
- Monopaque – BionLtda
- MTT – 3-(4,5 dimethylazol-2yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromide - Sigma
- Na_2HPO_4

- Power SYBR[®] Green PCR Master Mix – Applied Biosystems
- National Center for Biotechnology Information GenBank, número AF298656
- RPMI – 1640 – Sigma
- Trizol- Invitrogen Life Technologies

5.3.Soluções

5.3.1. Solução salina de PBS

Para o preparo de PBS, foram misturados os seguintes sais: Na₂HPO₄ (8,12g), KH₂PO₄ (1,35g), NaCl (8g), sendo o volume final completado para 1 L. O pH da solução era de 7,3.

5.3.2. 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 – 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.

5.3.3. Gradiente de separação de células

Para separação das mononucleares foi utilizado: Monopaque: (d = 1,08) (BionLtda)

5.3.4. Solução de luminol

Luminol: 1,77mg e Dimetil-sulfóxido: 1,00mL Esta solução (10-2M) foi estocada sem contato com a luz. Para uso, diluía-se 100 vezes (1:100) a solução estoque em solução salina de PBS.

5.3.5. MTT

A solução de MTT foi preparada com 5mg de MTT para 1mL de PBS a pH 7,3 (como citado no item 5.3.1.) e estocada em recipiente fechado, vedado de luz e ar sob refrigeração até 8° C.

Para obter os valores de concentrações do complexo vitamínico, uma pesquisa em literatura foi feita. De acordo com Bergman et al. [49], 0,011 – 1,100 μM de vitamina C e 0,002 – 0,2 μM de vitamina E foram utilizados em 2×10^6 de PBMNC (células mononucleares) para avaliar a produção de IL-10. Prabhala et al. [50] utilizaram 0,001 - 10 μM de beta-caroteno em $1,6 \times 10^6$ PBMNC.

Para obter valores semelhantes, duas concentrações foram testadas:

[A] = ácido ascórbico = 0,08 μM ; α -tocoferol = 0,04 μM ; β -caroteno = 0,0008 μM

[20A] = ácido ascórbico = 1,6 μM ; α -tocoferol = 0,82 μM ; β -caroteno = 0,016 μM .

A concentração [20A] foi 20 vezes mais concentrada que a concentração [A] e as proporções entre as vitaminas foram calculadas de acordo com Zhang e Omaye [52] (ácido ascórbico = x, α -tocoferol = x/2 e β -caroteno = x/100).

A proposta do complexo vitamínico nessas concentrações é de mimetizar quantidades orais que chegam às células e compartimentos plasmáticos, sendo a concentração [A] próxima de doses fisiológicas e a concentração [20A] de doses suplementadas. Outras referências também serviram de suporte. [53-55]

As vitaminas, após suspensas de acordo com instruções do fornecedor, foram misturadas em DMSO e diluídas em PBS, obtendo as soluções de uso. A utilização final respeitou normas da ISO 10993-5 com relação a uma concentração máxima de 0,05 de DMSO. [56]

5.4. Seleção de Doadores

Foram selecionados indivíduos dos sexos masculino e feminino, de 20-39 anos, como sujeitos de pesquisa. Os critérios de inclusão e exclusão deste projeto foram definidos pela equipe médica responsável pela seleção dos sujeitos de pesquisa:

Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo, aqueles pacientes com diagnóstico de diabetes mellitus tipo 1, conforme os critérios estabelecidos pela American Diabetes Association (ADA) (Tabela 2) e que também se propuseram a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Tabela 2. Critérios estabelecidos pela American Diabetes Association (ADA) para o diagnóstico da diabetes. [57]

1. Sintomas de diabetes mais concentração casual de glicose plasmática ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L) Casual é definido como qualquer hora do dia sem menção à hora desde a última refeição. Os sintomas clássicos de diabetes incluem poliúria, polidipsia e perda de peso sem explicação.
OU
2. Glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL (7,0 mmol/L) Jejum definido como nenhuma caloria ingerida durante um período mínimo de 8 horas.
OU
3. Glicose plasmática – 2 horas ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L) durante um teste de tolerância à glicose. Este teste deve ser realizado como descrito pela OMS, utilizando uma concentração de 75g de glicose dissolvida em água.

Critérios de exclusão

Os pacientes com alcoolismo, histórico de cetoacidose anterior, patologia crônica como câncer e insuficiência renal, grávidas e os que se recusaram a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foram excluídos do estudo.

Doadores não diabéticos

Foram considerados aqueles indivíduos saudáveis, avaliados por meio de históricos clínicos e exames físicos, que não apresentavam diabetes, doenças crônicas ou de caráter inflamatório e, também, não faziam uso contínuo de medicamentos.

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; e escolhidos aleatoriamente pela pesquisadora responsável (Tabela 3). A realização deste projeto mereceu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da SCMBH e da UFMG (COEP) - Parecer nº ETIC 343/08.

Doadores		Não Diabéticos (n=33; 15M/18F)		Doadores Diabéticos tipo 1 (n=28; 15M/13F)
Parameters		Valores (média ± desviopadrão)		Valores (média ± desviopadrão)
Idade (anos)	20-39	32,3 ± 6	ns	29,8 ± 5
Duração da doença (anos)		-	-	9,0 ± 1,3
Índice de massa corporal(kg/m ²)		25,2 ± 3	ns	23,8 ± 2
Glicosesanguínea (mg/dL)		82,9 ± 3	*	184,6 ± 2
Colesterol total (mg/dL)		179,6 ± 8	ns	185,0 ± 5
Triglicérides (mg/dL)		125,0 ± 14	ns	127,9 ± 13
Glicohemoglobina (GHb%)		4,9 ± 0,3	*	9,3 ± 0,7
Creatinina sérica(mg/dL)		0,965 ± 0,163	ns	1,27 ± 0,05
				Retinopatia (%)
				Moderada 40 Leve 50 Ausente10
				Neuropatias (%)
				Aguda10Crônica 80 Ausente 10
				Nefropatias (%)
				Moderada 85 Leve 10 Ausente5

ns= não-significante/ *=significante pelo teste T de Student. Índice de massa corporal: Faixa adequada= 18,5 – 24,99kg/m²[58];Glicohemoglobina: Valor normal ≤ 5,7% [57]; Triglicérides: Faixa normal < 150mg/dL[59]; Creatinina sérica: Faixa normal: 0,5-1,5 mg/dLpara homens e 0,6 – 1,2 mg/dLpara mulheres[60].

5.5.Coleta de sangue

Foram coletadas amostras de sangue venoso periférico dos pacientes através da punção venosa, em tubos vacutainer, contendo heparina como anticoagulante. A coleta obedeceu as normas estipuladas pela Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Médica Laboratorial.[61]

5.6.Separação de Sangue e 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. [62]

izado foram adicionados sobre 3 mL de gradiente Monopaque (densidade = 1,12) em tubos de vidro. Após centrifugação a 1500 rpm por 30 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 (Figura 12).

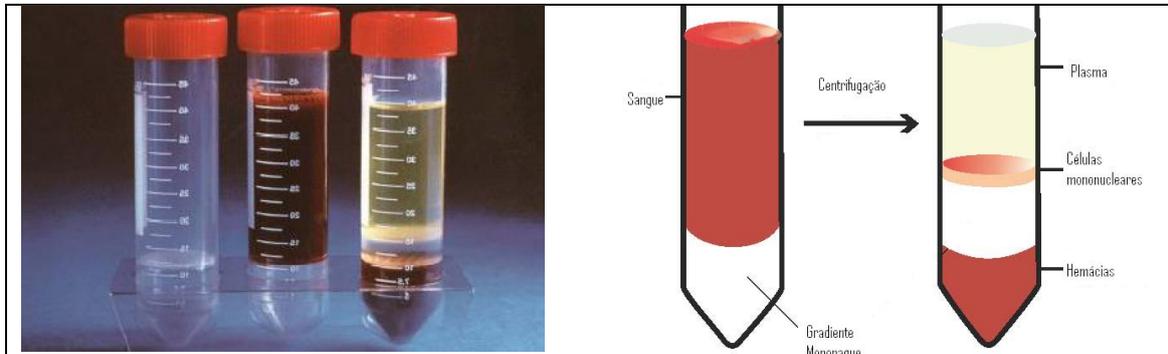


Figura 12. Separação de células mononucleares e plasma.

Fonte: www.abcysonline.com

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 câmara de Neubauer. Ajustou-se o volume final para 1×10^6 células em 100µL.

5.7. Ensaio de MTT

O ensaio quantitativo de MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide] é um método colorimétrico estabelecido para mensuração da atividade de enzimas mitocondriais através do monitoramento da absorbância do formazan roxo (570nm) formado como produto da redução enzimática do MTT. [63]

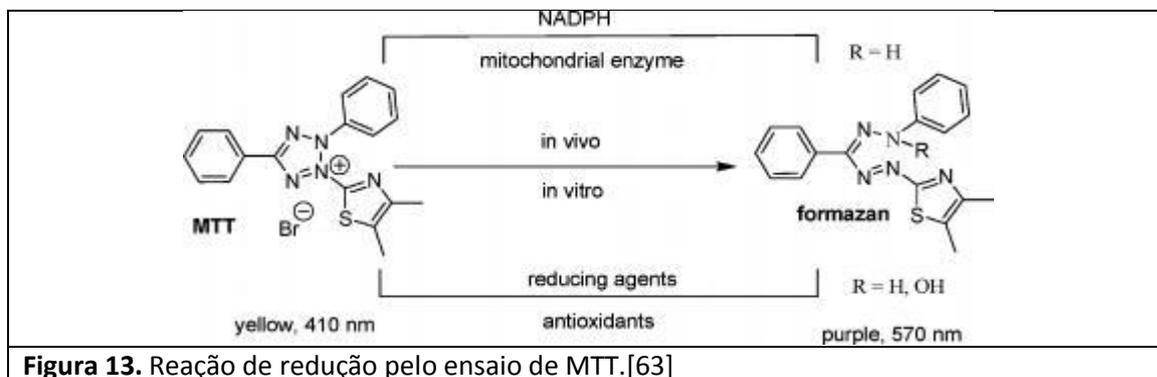


Figura 13. Reação de redução pelo ensaio de MTT.[63]

, de baixo custo, sensível e acurado para medir a capacidade antioxidante sendo amplamente utilizado em estudos *in vitro*. [64]

O ensaio foi realizado como descrito por Chaves et al. [65] Em síntese, o plasma (100µl) ou as células mononucleares (50µL=5 x 10⁵) foram incubadas na presença ou ausência do complexo vitamínico (concentrações [A] e [20A]) e 20µl de MTT (5.0 mg/ml em PBS) durante 60 minutos a 37° C.

Para as células mononucleares:

Tabela 4. Distribuição da placa para o ensaio de MTT em células mononucleares.

Poço	Quantidade de Complexo Vitamínico (µL)	Quantidade de PBS (µL)	Quantidade de célula (µL)	MTT (µL) após 30 minutos de incubação	Volume final(µL)
Basal	0	50	50	10	110
[A]	50	0	50	10	110
[20A]	50	0	50	10	110
Branco	0	100	0	10	110

O conteúdo de 100µL de DMSO foi acrescentado em cada poço e a placa foi levada ao leitor de ELISA em agitação “slow” por 15 segundos a 570nm. Cada poço, de cada concentração do complexo vitamínico, foi lido contra um único branco. Os valores foram anotados.

Para o plasma:

Tabela 5. Distribuição dos tubos para o ensaio de MTT em plasma.

Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

	Complexo Vitamínico (µL)	Quantidade de meio RPMI (µL)	Quantidade de plasma (µL)	MTT (µL) após 30 minutos de incubação	Volume final(µL)
Basal	0	380	100	20	500
[A]	20	360	100	20	500
[20A]	100	280	100	20	500
Basal (branco)	0	480	0	20	500
[A] (branco)	20	460	0	20	500
[20A] (branco)	100	380	0	20	500

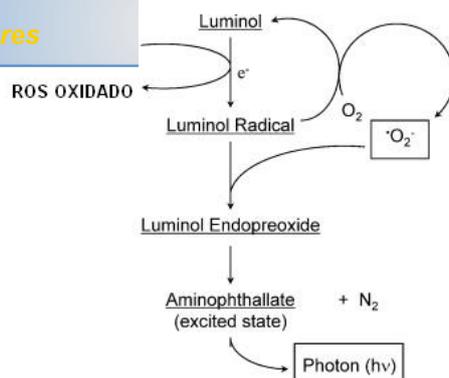
O conteúdo de 1mL de IsopropanolHCl foi acrescentado em cada tubo e misturado no vortex para homogeneizar os cristais. Os tubos foram centrifugados no ponto 3 (1500rpm) por 10 minutos.

Foram retirados 200µL de sobrenadante de cada tubo e transferido para poços individuais em uma placa de 96 poços. A placa foi lida em ELISA (570nm). Cada poço de cada concentração do complexo vitamínico foi lido contra seu respectivo branco. Os valores foram anotados.

5.8. Ensaio de quimioluminescência

Vários métodos são utilizados para a mensuração indireta de ROS. O método de quimioluminescência dependente de luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazindion) é um deles. Este é usado por muitos pesquisadores devido à sua detecção de vários metabólitos de oxigênio secretados pela respiração celular.

O ensaio de quimioluminescência permite avaliar, indiretamente, a atividade da NAD(P)H-oxidase, a enzima responsável pela geração de ROS em células.[66][67] As células produzem uma luminosidade natural definida como quimioluminescência. Contudo, esta luminosidade pode ser amplificada, usando-se reagentes químicos que, ao reagirem com o ROS produzido, passam a emitir a luminescência, conforme a reação abaixo:



A reação ocorre no interior de um sistema cátodo-ânodo, o que permite a captação e registro dos fótons emitidos pelo aminofthalato.

Foram utilizados para o ensaio: 200 μL de Luminol (10^{-2}) (da solução descrita no item 5.3.4.); células mononucleares 5×10^5 a cada 50 μL ; o complexo Vitamínico [A] e [20A] em 50 μL , ou apenas PBS para o poço basal.

Na placa de 96 poços branca, específica para Luminômetro foram distribuídos os conteúdos abaixo:

Tabela 6. Distribuição da placa para o ensaio de quimioluminescência em células mononucleares.

Poços	Quantidade de Complexo Vitamínico (μL)	Quantidade de PBS (μL)	Quantidade Luminol (μL)	Quantidade de célula (μL)	Volume final (μL)
Basal	0	50	200	50	300
[A]	50	0	200	50	300
[20A]	50	0	200	50	300

A leitura foi feita em corridas de 30 minutos totais com leituras a cada minuto para cada poço (gerando, portanto, 30 valores por poço ao final do tempo). Os dados foram enviados para uma planilha de Excel via conexão do luminômetro com um computador, para análise posterior.

5.9.PCR quantitativo em tempo real (RT- PCR)

RNA total foi extraído de 1×10^6 das células mononucleares utilizando reagente Trizol de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante e resuspenso em 30 μL de água livre de RNase. A concentração e pureza do RNA foi estimada pela razão A260/A280 em

RNA foi convertido a cDNA utilizando um oligo (dT) e um kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription seguindo recomendações do fabricante. PCR em tempo real foi realizado utilizando um reagente *Power SYBR[®] Green PCR Master Mix* em uma reação com volume final de 12 µL. A reação incluiu 0,1 µg de cDNA e 0,5 µL de cada primer (reverso e forward, 10 µM). A sequência dos primers para β_2 microglobulina e para as subunidades p22^{phox} e p47^{phox} da NADPH oxidase foram obtidos por sequências de nucleotídeos antes publicadas. [69] As sequências de primer para a subunidade gp91^{phox} da NADPH oxidase (forward primer 5`-ttgctggaaaccctgctatga-3` e reverse primer 5`- aaaaccgcaccaacctctca-3`, GenBank NM 00397) foram derivados de um gene e construídos pelo programa Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). As sequências dos primers para Zn-SOD, Mn-SOD e CAT foram obtidos de acordo com sequências de nucleotídeos já publicadas. [69] As reações foram realizadas utilizando Detector de Sequência ABI Prism 7000 sob as seguintes condições: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e depois 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. A especificidade dos produtos obtidos foi confirmada por análise das curvas de dissociação do produto amplificado. Como controle interno, a expressão do gene housekeeping da β_2 microglobulina foi utilizado. Os dados obtidos foram analisados pelo método comparativo C_T . Todas as análises foram feitas em triplicata.

5.10. Sinalização celular

Os inibidores:

1. Calphostin C - *Cladosporium cladosporioides* (10 µM) - inibidor da via de PKC.
2. H89 Dihydrochloride (1 µM) - Inibidor da via de PKA.
3. iPKB (1 µM) – Inibidor da via de Akt/PKB.
4. PD169316 (10 µM) – Inibidor de p38 MAPK.

Os inibidores foram utilizados em concentrações previamente estabelecidas em nosso laboratório através de curva dose-resposta. [39, 70, 71]

O ensaio utilizado foi a quimioluminescência dependente de luminol (item 5.8). Em triplicata, cada poço de uma placa de 96 poços branca, foi incubado com 50 µL de células mononucleares

do (nas concentrações citadas acima) em banho a 37°C

por 30 minutos.

Decorrido este tempo, foi adicionado a cada poço, 50µL de PBS, 50µL do complexo vitamínico [A] ou [20A] respectivamente, e 200µL de luminol (10^{-2}). Ou seja:

Tabela 7. Montagem de placa para Quimioluminescência em ensaio dos inibidores.

Poços	Quantidade de célula (µL)	Quantidade do inibidor (µL)	Após incubação de 30 minutos	Quantidade de Complexo Vitamínico (µL)	Quantidade de PBS (µL)	Quantidade Luminol (µL)	Volume final (µL)
Basal	50	10		0	50	200	310
[A]	50	10		50	0	200	310
[20A]	50	10		50	0	200	310

A leitura foi feita em corridas de 30 minutos totais com leituras a cada minuto para cada poço (gerando, portanto, 30 valores por poçinho ao final do tempo). Os dados foram enviados para uma planilha de Excel via conexão do luminômetro com um computador, para análise posterior.

5.11. Avaliação de citocinas

Instruções realizadas conforme manual dos kits: IL-6, TNF-α, IL-8, IL-10, e IL-4.

Tubos foram montados com 100µL de células mononucleares (1×10^6), 100µL do complexo vitamínico em ambas as concentrações ([A] e [20A]) ou PBS para o tubo basal e 500µL de RPMI por 4 horas em banho a 37°C. Decorrido esse tempo, os tubos foram centrifugados a 1500rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e congelado até o uso.

Todos os reagentes foram colocados em temperatura ambiente por 30 minutos antes da utilização. Todos os padrões, controles e amostras foram feitos em duplicata.

Em placa fornecida, foram pipetados 100 µL de diluente do padrão no poço SO, 100µL dos padrões de 1 a 7 em seus poços correspondentes e 100µL da amostra (sobrenadante) no poço apropriado.

eratura ambiente em um shaker por 1 hora a 500 rpm.

Os conteúdos foram, então, lavados com 400 μ L de solução por 4 vezes e deixadas vazias. Foram pipetados 100 μ L de anticorpo amarelo em cada poço, exceto no branco. Novamente a placa foi incubada a temperatura ambiente por 1 hora a 500 rpm e lavada 4 vezes deixando os poços vazios. Foi adicionado, então, 100 μ L de conjugado azul em cada poço, exceto o branco. A incubação foi repetida em 30 minutos a 500 rpm.

A lavagem foi repetida e 100 μ L de uma solução substrato foram acrescentados a cada poço. A placa foi novamente incubada a temperatura ambiente por 15 minutos a 500rpm.

Depois, 100 μ L de “solução stop” foram acrescentados e a placa lida imediatamente em ELISA a 450nm contra o branco. Os cálculos foram feitos por correlação com a curva padrão obtida.

5.12. Análise estatística

Os testes estatísticos utilizados foram o TESTE t de Student e o Mann-Whitney.

O TESTE t de Student e o Mann-Whitney foram utilizados para avaliar diferença significativa de duas amostras independentes.

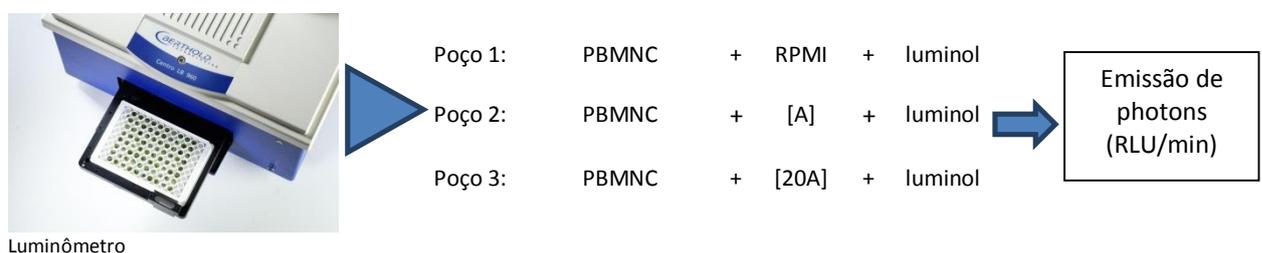
O $p < 0,05$ foi considerado como diferença significativa (*) e $p < 0,001$, diferença muito significativa (**).

6.1.0 complexo vitamínico tem efeito antioxidante em células de doadores diabéticos tipo 1 (DM1) e não diabéticos(ND)?

Células do sangue, como as mononucleares, têm gerado grande interesse para o propósito de 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. [71] Assim, a utilização destas células para o estudo de relatos de alterações oxidativas tem sido de grande valia.

A Tabela 9 avalia o efeito pró e antioxidante do complexo vitamínico (ácido ascórbico, alfa-tocoferol e beta-caroteno) em células mononucleares de doadores não diabéticos (ND) e diabéticos tipo 1 (DM1) através da produção de espécies reativas de oxigênio avaliada pela quimioluminescência, como mostra a Figura 14.

Figura 14. Ensaio de quimioluminescência



PBMNC= células mononucleares; RPMI= meio de cultura; [A] = ácido ascórbico = 0,08 μ M; α -tocoferol = 0,04 μ M; β -caroteno = 0,0008 μ M [20A] = ácido ascórbico = 1,6 μ M; α -tocoferol = 0,82 μ M; β -caroteno = 0,016 μ M.

Através da Tabela 8, nossos resultados mostraram que os valores basais (PBMNC+RPMI) não foram diferentes entre os grupos (ND=1670 média de RLU/minuto e DM1=1729 média de RLU/minuto).

concentração [A], houve um efeito dual. Ou seja, no grupo ND o complexo vitamínico, nesta concentração, aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio em 20% com relação ao basal. No grupo DM1 o resultado foi contrário havendo uma redução de 24% (Tabela 8).

A concentração [20A] do complexo vitamínico demonstrou efeito pró-oxidante apenas no grupo ND, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio em 22% com relação ao basal (Tabela 8). Já no grupo DM1, esta produção não se mostrou alterada na concentração [20A] (Tabela 8).

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.

Grupos	Quimioluminescência (RLU/30 minutos)				
	Média ± SD				
	PBMNC + RPMI	PBMNC + [A]	%	PBMNC + [20A]	%
ND	1670 ± 419	1998 ± 696*	20↑	1894 ± 531*	22↑
DM1	1729 ± 230	1315 ± 222*	24↓	1655 ± 321	-

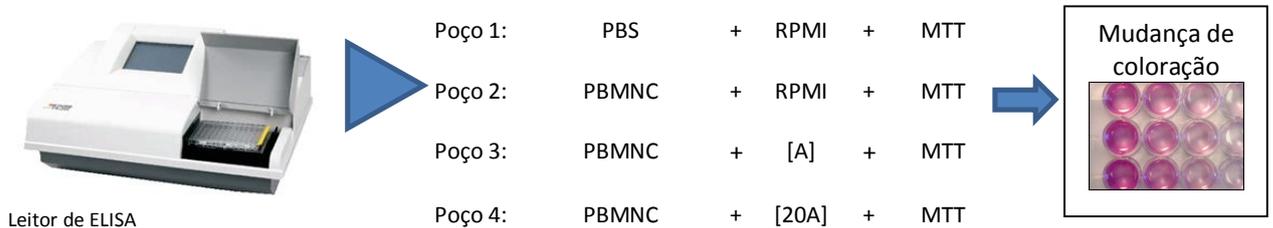
Células mononucleares de doadores não diabéticos (n=33) e diabéticos tipo 1 (n=28) foram isoladas e incubadas com duas concentrações de um complexo vitamínico contendo ácido ascórbico, alfa-tocoferol e beta-caroteno por 30 minutos gerando uma leitura a cada minuto através de processo de quimioluminescência dependente de luminol. Os resultados foram expressos como a média aritmética ± desvio padrão dos valores de RLU (Relative Light Units) e a porcentagem (%) de ativação ou inibição através da fórmula [(experimento/basal -1)x 100]. SD= desvio padrão; PBMNC= células mononucleares; RPMI= meio de cultura; [A] = ácido ascórbico = 0,08µM; α-tocoferol = 0,04µM; β-caroteno = 0,0008 µM [20A] = ácido ascórbico = 1,6µM; α-tocoferol = 0,82µM; β-caroteno = 0,016µM. ↑=ativação da produção de radicais livres; ↓=inibição da produção de radicais livres. O (*) representa a diferença (p<0,05) entre os valores dos experimentos e o basal pelo teste T de Student.

Uma vez analisado o compartimento oxidativo, a próxima pergunta seria a influência do complexo vitamínico no compartimento redutor.

6.2.0 poder redutor celular de doadores DM1 e ND também se altera na presença de vitaminas antioxidantes?

Estudos realizados por Chaveset al. [64], demonstraram a importância do balanço oxidante/redutor para a manutenção do equilíbrio metabólico. Esse balanço pode ser visto ao analisarmos o poder redutor seguido da avaliação do poder oxidante.

Figura 15. Ensaio de MTT com células mononucleares



Leitor de ELISA

PBMNC= células mononucleares; RPMI= meio de cultura; [A] = ácido ascórbico = 0,08 μ M; α -tocoferol = 0,04 μ M; β -caroteno = 0,0008 μ M [20A] = ácido ascórbico = 1,6 μ M; α -tocoferol = 0,82 μ M; β -caroteno = 0,016 μ M.

Como demonstrado na Tabela 9, o complexo vitamínico não alterou o poder redutor dos grupos (ND e DM1) em nenhuma das concentrações ([A] e [20A]). Os grupos ND e DM1 também não demonstraram diferença significativa ($p > 0,05$) nos valores de poder redutor celular basal (PBMNC+RPMI).

Tabela 9. Efeito do complexo vitamínico (ácido ascórbico, alfa-tocoferol e beta-caroteno) em células mononucleares de doadores não diabéticos e diabéticos tipo 1.

Grupos	D.O. 570nm x 10 ³				
	Média \pm SD				
	PBMNC + RPMI	PBMNC + [A]	%	PBMNC + [20A]	%
ND	445 \pm 56	468 \pm 68	-	445 \pm 71	-
DM1	426 \pm 79	403 \pm 85	-	399 \pm 79	-

Células mononucleares de doadores não diabéticos (n=33) e diabéticos tipo 1 (n=28) foram isoladas e incubadas com duas concentrações de um complexo vitamínico contendo ácido ascórbico, alfa-tocoferol e beta-caroteno por 30 minutos e logo em seguida foi colocado o MTT para uma nova incubação de 60 minutos. A reação foi interrompida por DMSO e a placa medida em ELISA a 570nm gerando valores de densidade óptica. Os resultados foram expressos como a média aritmética \pm desvio padrão dos valores de D.O. (Densidade Óptica) e a porcentagem (%) de ativação ou inibição através da fórmula [(experimento/basal -1)x 100]. SD= desvio padrão; PBMNC= células mononucleares; RPMI= meio de cultura; [A] = ácido ascórbico = 0,08 μ M; α -tocoferol = 0,04 μ M; β -caroteno = 0,0008 μ M [20A] = ácido ascórbico = 1,6 μ M; α -tocoferol = 0,82 μ M; β -caroteno = 0,016 μ M. O (-) representa sem diferença ($p > 0,05$) entre os valores dos experimentos e o basal pelo teste T de Student

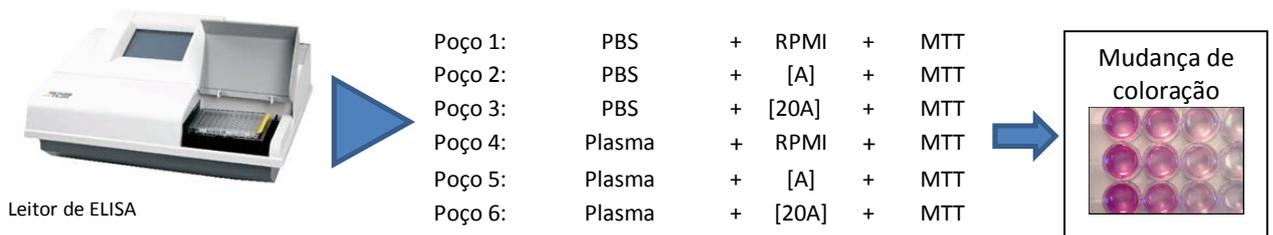
Mas, além das células, o plasma também é um indicador da defesa antioxidante ao ataque das espécies reativas. Portanto perguntamos:

ico, influenciado pelo complexo

vitamínico, fornece perfil diferenciado do encontrado nas células?

O compartimento plasmático também é de suma importância para complementar os acontecimentos celulares. Portanto, tem sido utilizado corriqueiramente para estudo das vitaminas, relacionando suas ingestões orais e o reflexo da metabolização, como também as doses no plasma.[24]

Figura 16. Ensaio de MTT com plasma



PBS=Phosphate-buffered saline; RPMI= meio de cultura; [A] = ácido ascórbico = 0,08µM; α-tocoferol = 0,04µM; β-caroteno = 0,0008 µM [20A] = ácido ascórbico = 1,6µM; α-tocoferol = 0,82µM; β-caroteno = 0,016µM.

De acordo com os nossos resultados (Tabela 10), o complexo vitamínico aumentou o poder redutor plasmático apenas na concentração [20A], em 35% para o grupo ND e 61% para DM1, com relação ao basal. Novamente, os resultados basais entre os grupos ND e DM1 não foram significativos como também não foram significativos os resultados com a concentração [A] do complexo vitamínico.

Tabela 10. Efeito do complexo vitamínico (ácido ascórbico, alfa-tocoferol e beta-caroteno) em plasma de doadores não diabéticos e diabéticos tipo 1.

Grupos	D.O. 570nm x 10 ³				
	Média ± SD				
	P + RPMI	P + [A]	%	P + [20A]	%
ND	225 ± 72	249 ± 67	-	304 ± 84*	35↑
DM1	192 ± 51	212 ± 58*	-	308 ± 61*	61↑

Células mononucleares de doadores não diabéticos (n=33) e diabéticos tipo 1 (n=28) foram isoladas e incubadas com duas concentrações de um complexo vitamínico contendo ácido ascórbico, alfa-tocoferol e beta-caroteno por 30 minutos e logo em seguida foi colocado o MTT para uma nova incubação de 60 minutos. A reação foi interrompida por DMSO e a placa medida em ELISA a 570nm gerando valores de densidade óptica. Os resultados foram expressos como a média aritmética ± desvio padrão dos valores de D.O. (Densidade Óptica) e a porcentagem (%) de ativação através da fórmula [(experimento/basal -1)x 100]. SD= desvio padrão; P= plasma; RPMI= meio de cultura. [A] = ácido ascórbico = 0,08µM; α-tocoferol = 0,04µM; β-caroteno = 0,0008 µM [20A] = ácido ascórbico = 1,6µM; α-tocoferol = 0,82µM; β-caroteno = 0,016µM. ↑=ativação do poder redutor. O (*) representa a diferença (p<0,05) e (-) sem diferença (p>0,05) entre os valores dos experimentos e o basal pelo teste T de Student.

os componentes do compartimento redutor, as enzimas antioxidantes. Existem evidências da contribuição de vitaminas (C e E) na atuação de enzimas antioxidantes como Mn-Superóxido dismutase, Glutationaperoxidase, catalase (CAT) e Xantina oxidase[73], como também efeitos depressores na ação da Superóxido Dismutase (SOD) e Glutationaperoxidase após suplementação de vitaminas C e E. [74]

Resultados contrários, como os citados acima, tornam ainda mais necessários os conhecimentos da atuação de diferentes concentrações do complexo vitamínico na defesa antioxidante enzimática.

6.4.As vitaminas, antioxidantes não enzimáticos, influenciam a expressão de enzimas antioxidantes em células de doadores diabéticos tipo 1 e não diabéticos?

As três maiores classes de enzimas antioxidantes são as superóxido dismutases, catalases e glutacionaperoxidases. [71]

Com relação à expressão de mRNA_{Zn-SOD} foi comprovada que o grupo DM1 teve resultados inferiores ao grupo ND quando comparamos os valores controles (ND=1,00 DM1=0,51) (Figura 17).

Já o grupo ND demonstrou maior expressão de mRNA_{Zn-SOD} na concentração [A] do complexo vitamínico e menor expressão na concentração [20A] quando comparados com o controle deste grupo (controle=1,00; [A]=1,41; [20A]=0,58). (Figura 17)

Com relação ao grupo DM1, a expressão de mRNA_{Zn-SOD} aumentou na presença de ambas as concentrações do complexo vitamínico, [A]=1,30 e [20A]=1,42 quando comparadas ao controle=0,5. As vitaminas antioxidantes parecem potencializar a expressão de mRNA_{Zn-SOD} em células de diabéticos tipo 1.

Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features

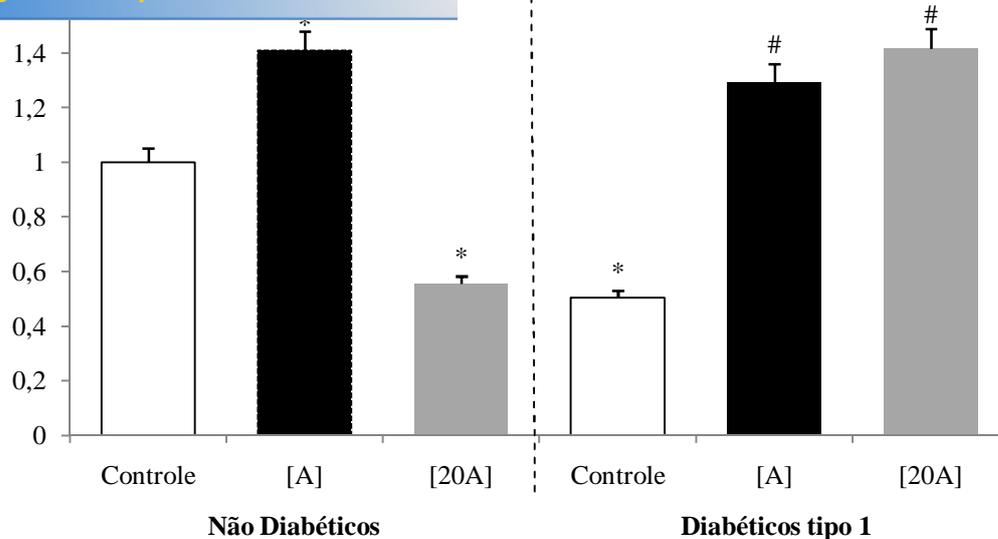


Figura 17. Expressão de mRNA Zn-SOD influenciada por um complexo vitamínico em células mononucleares de doadores não diabéticos e diabéticos tipo 1.

Técnica de PCR quantitativo em tempo real com células mononucleares de doadores não diabéticos (n=6) e diabéticos tipo 1 (n=6). Os resultados foram expressos como a média aritmética \pm desvio padrão. PBMNC= células mononucleares; [A] = ácido ascórbico = 0,08 μ M; α -tocoferol = 0,04 μ M; β -caroteno = 0,0008 μ M [20A] = ácido ascórbico = 1,6 μ M; α -tocoferol = 0,82 μ M; β -caroteno = 0,016 μ M. O (*) representa a diferença (p<0,05) entre os valores dos experimentos e o controle Não Diabético. O (#) representa a diferença (p<0,05) entre os valores dos experimentos e o controle Diabético tipo 1.

A Mn-SOD, outro tipo de superóxido dismutase, está localizada na mitocôndria de células aeróbias, local de grande produção de espécies reativas de oxigênio.[76] Portanto, sua análise também foi realizada. Semelhante ao ocorrido com a expressão de mRNA Zn-SOD, a expressão de mRNA Mn-SOD mostrou os seguintes resultados (Figura 18):

A expressão de mRNA Mn-SOD é diminuída no controle de DM1 (0,65) quando comparado ao ND (1), resultado esperado na presença de diabetes.

As vitaminas aumentaram a expressão de mRNA Mn-SOD na concentração [A]=1,20 e na concentração [20A]=1,15 do grupo ND quando comparadas ao controle=1,00; do mesmo grupo. Este resultado obtido da concentração [20A] foi diferente do obtido com a expressão de mRNA Zn-SOD, e contrário ao esperado.

Já no grupo de diabetes tipo 1, as vitaminas aumentaram a expressão de mRNA Mn-SOD, em ambas as concentrações ([A]=1,22 e [20A]=1,49) quando comparadas ao controle(0,65), do mesmo grupo.

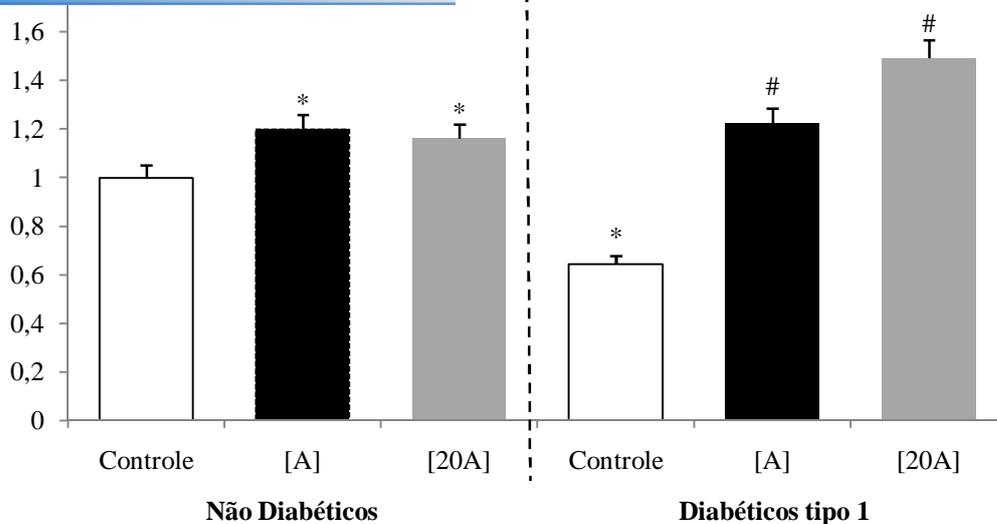


Figura 18. Expressão de mRNAMn-SOD influenciada por um complexo vitamínico em células mononucleares de doadores não diabéticos e diabéticos tipo 1.

Técnica de PCR quantitativo em tempo real com células mononucleares de doadores não diabéticos (n=6) e diabéticos tipo 1 (n=6). Os resultados foram expressos como a média aritmética \pm desvio padrão. PBMNC= células mononucleares; [A] = ácido ascórbico = 0,08 μ M; α -tocoferol = 0,04 μ M; β -caroteno = 0,0008 μ M [20A] = ácido ascórbico = 1,6 μ M; α -tocoferol = 0,82 μ M; β -caroteno = 0,016 μ M. O (*) representa a diferença (p<0,05)entre os valores dos experimentos e o controle Não Diabético. O (#) representa a diferença (p<0,05) entre os valores dos experimentos e o controle Diabético tipo 1.

Outra enzima importante a ser analisada é a catalase, a qual decompõe o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio. [20]

O valor de expressão da catalase foi novamente menor no controle de DM1 (0,43) quando comparado ao controle de ND (1,00).

Diferente dos resultados obtidos com a expressão de mRNAzn-SOD e mRNAMn-SOD, a expressão de mRNACatalase no grupo ND diminuiu na presença de ambas as concentrações do complexo vitamínico ([A]=0,52 e [20A]=0,33) quando comparadas ao controle (1,00) (Figura 19).

O perfil encontrado para DM1 permaneceu o mesmo daquele encontrado na expressão de mRNAzn-SOD e mRNAMn-SOD. Ou seja, as concentrações [A]=0,90 e [20A]=0,93 do complexo vitamínico aumentaram a expressão de mRNACatalase quando comparadas com o controle(0,43) do mesmo grupo, mostrado na Figura 19.

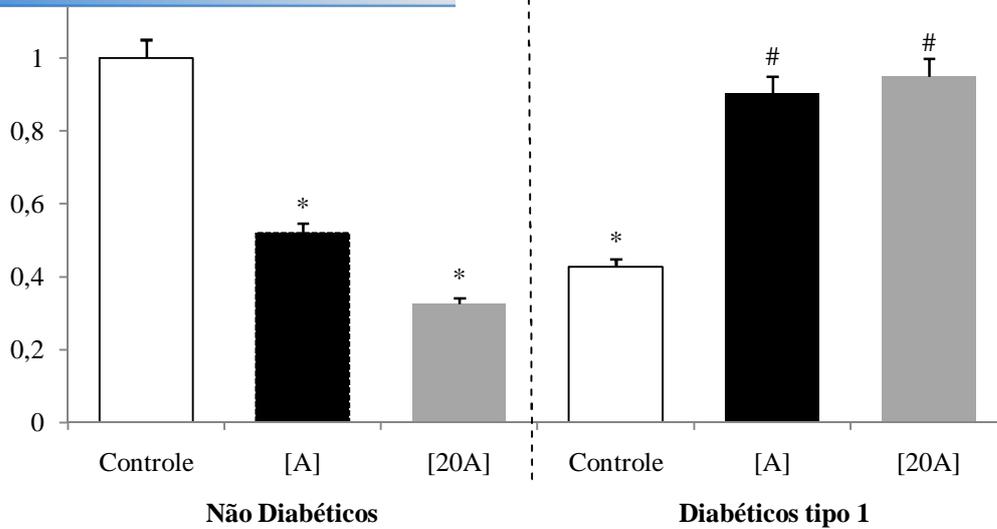


Figura 19. Expressão de mRNACatalase influenciada por um complexo vitamínico em células mononucleares de doadores não diabéticos e diabéticos tipo 1.

Técnica de PCR quantitativo em tempo real com células mononucleares de doadores não diabéticos (n=6) e diabéticos tipo 1 (n=6). Os resultados foram expressos como a média aritmética ± desvio padrão. PBMNC= células mononucleares; [A] = ácido ascórbico = 0,08µM; α-tocoferol = 0,04µM; β-caroteno = 0,0008 µM [20A] = ácido ascórbico = 1,6µM; α-tocoferol = 0,82µM; β-caroteno = 0,016µM. O (*) representa a diferença (p<0,05) entre os valores dos experimentos e o controle Não Diabético. O (#) representa a diferença (p<0,05) entre os valores dos experimentos e o controle Diabético tipo 1.

Enzimas antioxidantes como a SOD têm participação nas reações de tamponamento de radicais gerados pela NADPH oxidase. Uma vez estabelecida a participação das enzimas antioxidantes sob influência do complexo vitamínico em células de doadores diabéticos tipo 1 ou não diabéticos, visamos explorar a expressão da NADPH oxidase, principal enzima geradora de ROS, através do mesmo modelo de expressão genética.

6.5. As subunidades da NADPH oxidase têm papel na redução e/ou aumento da produção de ROS por células com o complexo vitamínico?

A NADPH oxidase é geradora de espécies reativas de oxigênio em células fagocíticas e não fagocíticas e pode ter influência regulatória de antioxidantes como as vitaminas. A ação desta enzima é potencializada em estados de doença, como o diabetes aumentando a produção de ROS. [11] Portanto, avaliar a expressão de subunidades da NADPH oxidase é de grande valia.

a expressão de mRNA $Agp91^{phox}$ é maior em células de diabéticos tipo 1 (1,45), quando comparado com o controle de ND (1,00), como o esperado (Figura 20).

Mas, o complexo vitamínico não exerceu influência significativa sobre a expressão de mRNA $Agp91^{phox}$ nas células de Diabéticos Tipo 1 (DM1).

Ao contrário, no grupo ND, a expressão de mRNA $Agp91^{phox}$ diminuiu com o complexo vitamínico na concentração [A](0,65) e aumentou na concentração [20A](1,73), quando comparadas ao controle (1,00). (Figura 20)

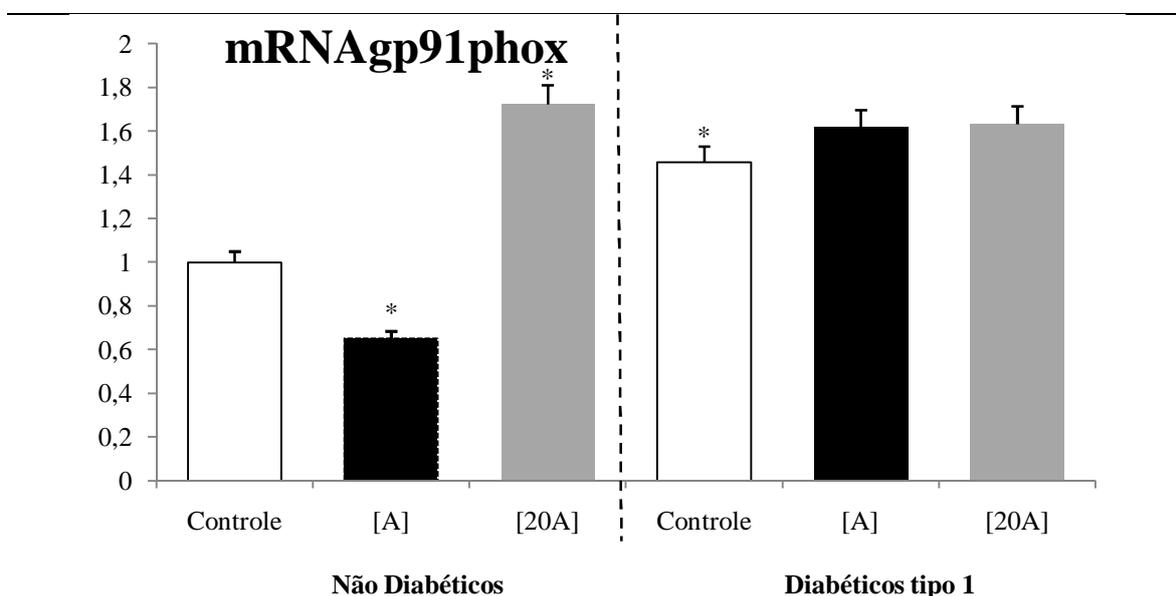


Figura 20. Expressão de mRNA $Agp91^{phox}$ influenciada por um complexo vitamínico em células mononucleares de doadores não diabéticos e diabéticos tipo 1.

Técnica de PCR quantitativo em tempo real com células mononucleares de doadores não diabéticos (n=6) e diabéticos tipo 1 (n=6). Os resultados foram expressos como a média aritmética \pm desvio padrão. PBMNC= células mononucleares; [A] = ácido ascórbico = 0,08 μ M; α -tocoferol = 0,04 μ M; β -caroteno = 0,0008 μ M [20A] = ácido ascórbico = 1,6 μ M; α -tocoferol = 0,82 μ M; β -caroteno = 0,016 μ M. O (*) representa a diferença (p<0,05) entre os valores dos experimentos e o controle Não Diabético. O (#) representa a diferença (p<0,05) entre os valores dos experimentos e o controle Diabético tipo 1.

Mas, analisar uma subunidade da NADPH oxidase pode não ser suficiente, portanto partimos para investigações com a expressão de mRNA $p47^{phox}$.

ou maior expressão de uma subunidade da NADPH oxidase, a mRNAp47^{phox} quando comparamos seu controle(1,73) com o controle de ND (1,00) como mostrado pela Figura 21.

No grupo ND, também em concordância com os resultados da expressão de mRNAp91^{phox}, a expressão de mRNAp47^{phox} diminuiu com a concentração [A](0,81) do complexo vitamínico e aumentou com a concentração [20A](1,54), quando comparadas ao controle, demonstrado na Figura 21.

O grupo DM1 demonstrou diminuição na expressão de mRNAp47^{phox} na concentração [A](0,54) do complexo vitamínico, mas sem alteração na presença da concentração [20A](1,70), quando comparadas ao controle (1,73).

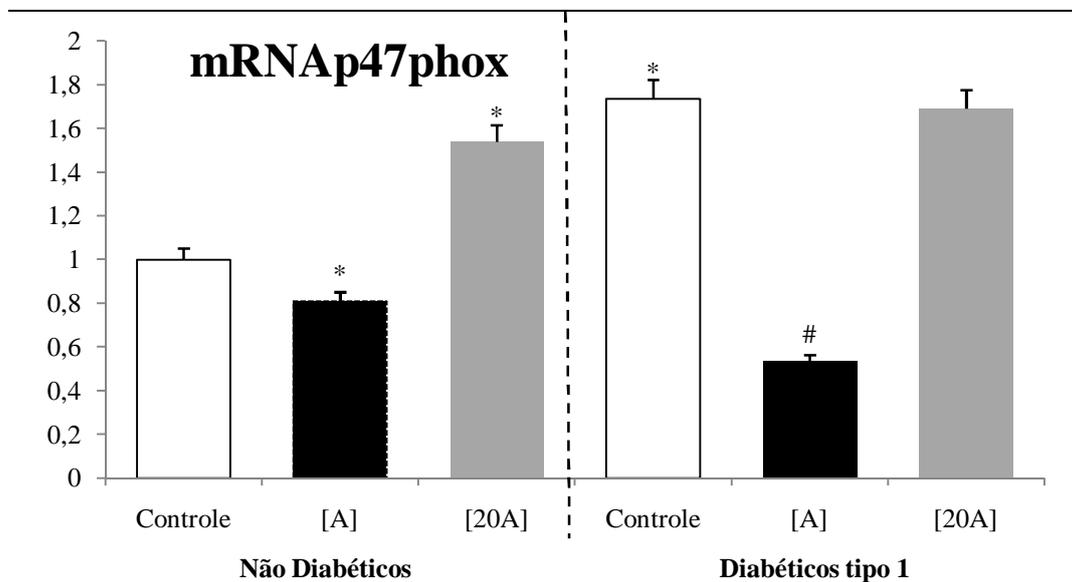


Figura 21. Expressão de mRNAp47^{phox} influenciada por um complexo vitamínico em células mononucleares de doadores não diabéticos e diabéticos tipo 1.

Técnica de PCR quantitativo em tempo real com células mononucleares de doadores não diabéticos (n=6) e diabéticos tipo 1 (n=6). Os resultados foram expressos como a média aritmética ± desvio padrão. PBMNC= células mononucleares; [A] = ácido ascórbico = 0,08µM; α-tocoferol = 0,04µM; β-caroteno = 0,0008 µM [20A] = ácido ascórbico = 1,6µM; α-tocoferol = 0,82µM; β-caroteno = 0,016µM. O (*) representa a diferença (p<0,05) entre os valores dos experimentos e o controle Não Diabético. O (#) representa a diferença (p<0,05) entre os valores dos experimentos e o controle Diabético tipo 1.

A fim de verificarmos a importância das subunidades neste processo, outra subunidade da NADPH oxidase foi avaliada.

que demonstram, que a expressão de mRNA_{p22^{phox}} do grupo DM1 (1,69) foi maior quando comparado ao controle do grupo ND (1,00), como achado na expressão das outras subunidades.

Mas, perfis diferentes foram encontrados na presença do complexo vitamínico. O grupo ND não obteve diferenças significativa na expressão de mRNA_{p22^{phox}} ao comparar controle (1,00) com concentrações [A](0,94) e [20A](0,95).

Já no grupo DM1, apenas a concentração [A](0,84) foi efetiva e causou redução na expressão de mRNA_{p22^{phox}} quando comparada com o controle(1,69) do mesmo grupo. Esses resultados estão em concordância com os resultados anteriores (Tabela 8 e Figura 21) os quais mostram efetividade antioxidante da concentração [A], reduzindo a expressão da subunidade mRNA_{p47^{phox}}, como também a produção de ROS por quimioluminescência, eventos de caráter oxidativo.

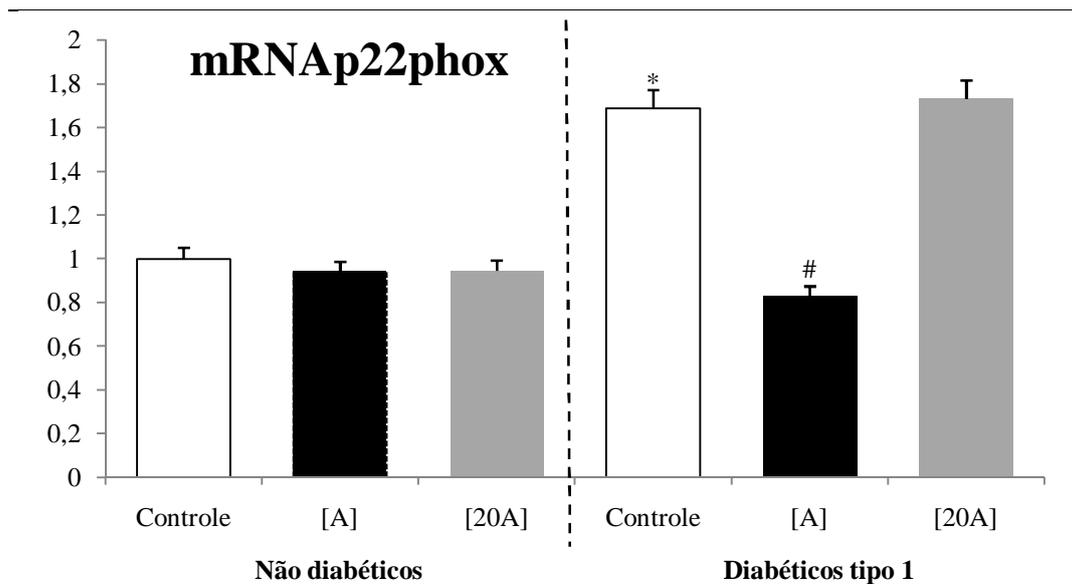


Figura 22. Expressão de mRNA_{p22^{phox}} influenciada por um complexo vitamínico em células mononucleares de doadores não diabéticos e diabéticos tipo 1.

Técnica de PCR quantitativo em tempo real com células mononucleares de doadores não diabéticos (n=6) e diabéticos tipo 1 (n=6). Os resultados foram expressos como a média aritmética ± desvio padrão. PBMNC= células mononucleares; [A] = ácido ascórbico = 0,08µM; α-tocoferol = 0,04µM; β-caroteno = 0,0008 µM [20A] = ácido ascórbico = 1,6µM; α-tocoferol = 0,82µM; β-caroteno = 0,016µM. O (*) representa a diferença (p<0,05)entre os valores dos experimentos e o controle Não Diabético. O (#) representa a diferença (p<0,05) entre os valores dos experimentos e o controle Diabético tipo 1.

Portanto, comprovamos a participação da NADPH oxidase na influência do complexo vitamínico em células de ambos os grupos estudados. No grupo ND as subunidades mais

^{10x}, enquanto que no grupo DM1, as subunidades foram p47^{phox} e p22^{phox}.

Outro importante aspecto de algumas vitaminas em linfócitos é sua influência na produção de citocinas.[80]Estas também tiveram sua liberação por linfócitos e macrófagos relacionada a células beta pancreáticas e a patogênese do diabetes tipo 1. [81]

6.6.A ativação da NADPH oxidase e a consequente produção de ROS podem ter sido influenciadas pela produção diferenciada decitocinas?

Como mostrado na tabela 11, em células de não diabéticos, a concentração [A] aumentou a liberação apenas da citocina IL-4 (340,6) em relação ao valor basal (223,8).

Já a concentração [20A] do complexo vitamínico aumentou a produção de IL-6 (1464) e diminuiu TNF- α (119,7) em relação aos níveis basais de células não diabéticas (936 e 317,5), respectivamente. Em contra partida ocorreu um diminuição de IL-10 (162) e IL-4 (192,8) em relação aos níveis basais de células não diabéticas, (IL-10=226 e IL-4=223,8), indicando um perfil pró-inflamatório.

Já para as células de diabéticos tipo 1, a concentração [A] não demonstrou resultados significativos. A concentração [20A] foi efetivamente antioxidante ao reduzir os níveis de TNF- α de 503,4 (basal) para 247,4 e aumentar a liberação de IL-4 de 8,4 para 16,8.

O complexo vitamínico não alterou a liberação de IL-8 em nenhum dos grupos (ND e DM1).

rodução de citocinas por células mononucleares de doadores não diabéticos e diabéticos tipo 1.

Nível de citocinas (pg/mL)

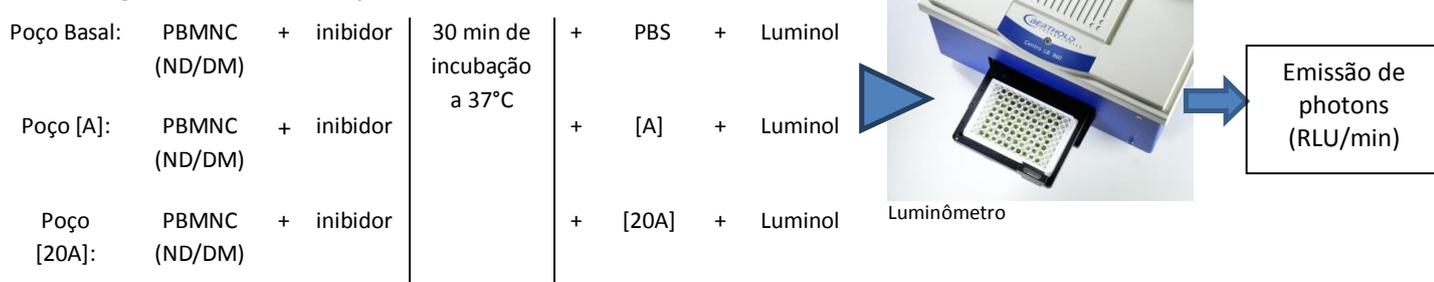
Citocinas	NãoDiabéticos			Diabéticostipo 1		
	PBMNC+RPMI	PBMNC+[A]	PBMNC+[20A]	PBMNC+RPMI	PBMNC+[A]	PBMNC+[20A]
IL-6	936 ± 86	941 ± 114	1464 ± 152*↑	429 ± 30	489 ± 29	408 ± 82
TNF-α	317,5 ± 181,9	291,9 ± 133	119,7 ± 29,7*↓	503,4 ± 145,7	433,8 ± 222,1	247,4 ± 128,3*↓
IL-8	2010,8 ± 133,5	2017,9 ± 130,8	1997,3 ± 135,3	2025,9 ± 84,2	1968,3 ± 85,1	1868,3 ± 52,9
IL-10	226 ± 112	243 ± 116	162 ± 25*↓	279 ± 96	255 ± 40	249 ± 47
IL-4	223,8 ± 1,4	340,6 ± 1,9*↑	192,8 ± 2,2*↓	8,4 ± 2,7	8,8 ± 1,7	16,8 ± 2,2*↑

pg/mL: picogramas/mililitro, IL-1β: interleucina 1-beta, IL-10: interleucina 10, IL-6: interleucina 6, IL-4: interleucina 4, TNF-α: fator de necrose tumoral alfa, IL-8: interleucina 8. Células mononucleares de doadores não diabéticos (n=15) e diabéticos tipo 1 (n=15) foram isoladas e incubadas com duas concentrações de um complexo vitamínico contendo ácido ascórbico, alfa-tocoferol e beta-caroteno por 4 horas. A dosagem das interleucinas foi feita seguindo instruções de kit em ELISA. SD= desvio padrão; PBMNC= células mononucleares; RPMI= meio de cultura; [A] = ácido ascórbico = 0,08μM; α-tocoferol = 0,04μM; β-caroteno = 0,0008 μM [20A] = ácido ascórbico = 1,6μM; α-tocoferol = 0,82μM; β-caroteno = 0,016μM. O (*) representa diferença (p<0,05) e (**) diferença (p<0,001) entre os valores dos experimentos e o basal pelo teste T de Student.

6.7.0 padrão de sinalização é o mesmo na presença ou ausência do complexo vitamínico?

Há uma conexão entre espécies reativas de oxigênio, liberação de citocinas, hiperglicemia e vias de sinalização celular. Portanto, torna-se importante avaliar algumas vias de sinalização é a fim de delinear a ação detalhada das vitaminas antioxidantes em células de doadores não diabéticos e diabéticos tipo 1 e a liberação de ROS.

Figura 23. Ensaio de quimioluminescência com inibidores



ação das vias de sinalização na liberação de ROS.

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.

Não Diabéticos						
	PBMNC+RPMI+i	PBMNC+RPMI (1670) X PBMNC+RPMI+i	PBMNC+[A]+i	PBMNC+RPMI+i X PBMNC+[A]+i	PBMNC+[20A]+i	PBMNC+RPMI+i X PBMNC+[20A]+i
iPKB	3338	↑99%	4007	↑20%	3199	-
Calphostin C	446	↓73%	1219	↑173%	1379	↑209%
PD169316	371	↓78%	444	↑20%	636	↑71%
H89	2959	↑77%	3942	↑33%	3431	-

Diabéticos tipo 1						
	PBMNC+RPMI+i	PBMNC+RPMI (1729) X PBMNC+RPMI+i	PBMNC+[A]+i	PBMNC+RPMI+i X PBMNC+[A]+i	PBMNC+[20A]+i	PBMNC+RPMI+i X PBMNC+[20A]+i
iPKB	1222	↓29%	1464	-	678	↓45%
Calphostin C	1316	↓24%	1820	↑38%	1928	↑47%
PD169316	1190	↓31%	1759	↑48%	1525	↑28%
H89	1198	↓31%	1466	↑22%	1190	-

Células mononucleares de doadores não diabéticos (n=33) e diabéticos tipo 1 (n=28) foram isoladas e incubadas com os inibidores de cada via por 30 minutos e logo em seguida foi colocado duas concentrações de um complexo vitamínico contendo ácido ascórbico, alfa-tocoferol e beta-caroteno. Foi gerada uma leitura a cada minuto através de processo de quimioluminescência dependente de luminol. Os resultados foram expressos como a média aritmética dos valores de RLU (Relative Light Units) e a porcentagem (%) de ativação ou inibição através da fórmula $\{[\text{experimento}/(\text{PBMNC}+\text{RPMI}) - 1] \times 100\}$; i=inibidor; PBMNC= células mononucleares; RPMI= meio de cultura; iPKB=inibidor da via AKT/PKB; Calphostin C=inibidor da via PKC; PD169316=inibidor da via p38MAPK; H89=inibidor da via PKA. ↑=ativação da produção de radicais livres; ↓=inibição da produção de radicais livres.

A primeira análise feita foi a comparação entre produção de ROS pelas células de não diabéticos e diabéticos tipo 1 com estas mesmas células acrescidas dos respectivos inibidores (iPKB, Calphostin C, PD169316 e H89).

Em células de não diabéticos, os inibidores iPKB e H89 aumentaram a produção de ROS em 99 e 77%, respectivamente. Já os inibidores Calphostin C e PD169316 reduziram a produção de ROS em 73 e 78%, respectivamente. Ou seja, inibir a via AKT/PKB e PKA em células de não diabéticos gera aumento da liberação de espécies reativas de oxigênio. Em contrapartida, inibir as vias PKC e p38MAPK causa redução na liberação de ROS.

Em células de diabéticos tipo 1, todos os inibidores reduziram a produção de espécies reativas de oxigênio. O iPKB em 29%, Calphostin C em 24%, PD169316 em 31% e o H89 em 31%.

38MAPK e PKA em células de diabéticos tipo 1 reduz a liberação de ROS pelo método de quimioluminescência.

A segunda análise foi a influência do complexo vitamínico na presença dos inibidores.

Em células de não diabéticos, a concentração [A] do complexo vitamínico aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio na presença de todos os inibidores. Para iPKB o aumento foi de 20%, Calphostin C em 173%, PD169316 de 20% e H89 de 33%. Ou seja, o complexo vitamínico na concentração [A], manteve e incrementou o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio quando inibidas as vias AKT/PKB e PKA. Em contrapartida, reverteu o perfil das vias PKC e p38MAPK inibidas, que antes reduziram a produção de ROS mas que em presença das vitaminas aumentou a produção das espécies reativas.

Já a concentração [20A] obteve resultados significativos apenas com os inibidores Calphostin C e PD169316 em células de não diabéticos. Esta concentração aumentou a produção de espécies reativas em 209 e 71% na presença de Calphostin C e PD169316, respectivamente. Novamente, como visto com a concentração [A], a concentração [20A] reverteu o perfil de redução de ROS com as vias inibidas gerando aumento de ROS.

Em células de diabéticos tipo 1 a concentração [A] obteve resultados significativos na presença de todos os inibidores, exceto iPKB. Esta concentração aumentou a produção de ROS em 38, 48 e 22% na presença de Calphostin C, PD169316 e H89, respectivamente. O complexo vitamínico na concentração [A] reverteu de redução para aumento da produção de espécies reativas de oxigênio quando as vias estudadas foram inibidas.

Já a concentração [20A], demonstrou padrão diferenciado. A inibição da via AKT/PKB por iPKB reduziu a produção de ROS. A redução foi mantida na presença de [20A] em valor maior, 45%. Em contrapartida, as vias PKC e p38MAPK, quando inibidas, reduziram a produção de ROS, mas na presença de [20A] aumentou-se a liberação das espécies em 47 e 28%, respectivamente. As células com inibidor H89 e [20A] não obtiveram resultados significativos.

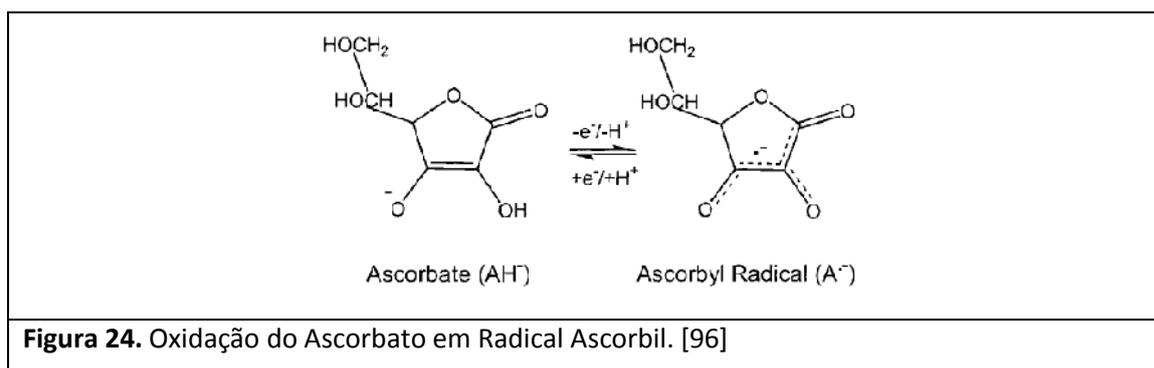
dem ter ação antioxidante como também pró-oxidante em varios compartimentos celulares. A tabela 13, abaixo resume todos os resultados obtidos.

Tabela 13. Resumo das influências metabólicas do complexo vitamínico em células mononucleares de não diabéticos e diabéticos tipo 1.

	[A]	[20A]
Não diabéticos	↑ ROS	↑ ROS
	Poder redutor celular	Poder redutor celular
	Poder redutor plasmático	↑ Poder redutor plasmático
	↑ Zn-SOD ↑ Mn-SOD ↓ catalase	↓ Zn-SOD ↑ Mn-SOD ↓ catalase
	↓ gp91phox ↓ p47phox p22phox	↑ gp91phox ↑ p47phox p22phox
	IL-6 TNF-α IL-10 ↑ IL-4	↑ IL-6 ↓ TNF-α ↓ IL-10 ↓ IL-4
	↑ ROS + iPKB ↑ ROS + Calphostin C ↑ ROS + PD169316 ↑ ROS + H89	ROS + iPKB ↑ ROS + Calphostin C ↑ ROS + PD169316 ROS + H89
Diabéticos tipo 1	↓ ROS	ROS
	Poder redutor celular	Poder redutor celular
	Poder redutor plasmático	↑ Poder redutor plasmático
	↑ Zn-SOD ↑ Mn-SOD ↑ catalase	↑ Zn-SOD ↑ Mn-SOD ↑ catalase
	gp91phox ↓ p47phox ↓ p22phox	gp91phox p47phox p22phox
	IL-6 TNF-α IL-10 IL-4	IL-6 ↓ TNF-α IL-10 ↑ IL-4
	ROS + iPKB ↑ ROS + Calphostin C ↑ ROS + PD169316 ↑ ROS + H89	↓ ROS + iPKB ↑ ROS + Calphostin C ↑ ROS + PD169316 ROS + H89

[A] = ácido ascórbico = 0,08μM; α-tocoferol = 0,04μM; β-caroteno = 0,0008 μM [20A] = ácido ascórbico = 1,6μM; α-tocoferol = 0,82μM; β-caroteno = 0,016μM. iPKB=inibidor da via AKT/PKB; Calphostin C=inibidor da via PKC; PD169316=inibidor da via p38MAPK; H89=inibidor da via PKA ↑=ativação; ↓=inibição. Resultados representados em verde tem efeito antioxidante; em vermelho, pró-oxidante. Resultados representados em cinza não são significativos pelos testes de Mann-Whitney ou teste T de Student.

O nosso estudo demonstrou que o complexo vitamínico pode ter efeito dual, tanto antioxidante quanto pró-oxidante. A diferença ocorreu entre os dois grupos estudados. Para não diabéticos, o complexo de vitaminas foi pró-oxidante, ou seja, aumentou a produção de radicais livres em ambas as concentrações ([A]=↑20%, [20A]=↑22%). Estudos já relataram que o ascorbato, dependendo do ambiente e condições de atividade da molécula pode atuar como pró-oxidante de duas maneiras: transformando-se em radical ascorbil e/ou não exercendo seu papel protetor à vitamina E, a qual, em excesso gera peroxidação lipídica. [72][76][96] A vitamina C na presença de ferro também é geradora de ânions superóxido e radicais hidroxila. Existe, inclusive um teste padrão para indução de estresse oxidativo e avaliação dos efeitos de antioxidantes pela reação do sistema Fe-ascorbato que gera peroxidação lipídica. [73]



Para diabéticos tipo 1, o complexo vitamínico foi antioxidante na concentração [A] (=↓24%). Este resultado pode ser devido à maior necessidade de vitaminas antioxidantes para este grupo. Isto ocorre em condições patológicas, onde há produção excessiva de ROS que ultrapassa a defesa antioxidante, gerando um estado de estresse oxidativo. [7] [97] Estudos demonstram que a vitamina E tem efeitos antioxidantes, dose-dependente em diabéticos ao reduzir radicais superóxido, prevenir peroxidação lipídica e, em menor extensão, reduzir oxidação protéica. [104]

O poder redutor celular não foi alterado na presença do complexo vitamínico, sendo, portanto, o compartimento oxidante o responsável pelas mudanças no balanço oxidante/redutor celular. [98]

O complexo vitamínico teve atuação no plasma dos dois grupos, diabéticos e não diabéticos apenas na concentração [20A]. Para ambos, aumentou o poder redutor plasmático em 35% para ND e 61% para DM1.

O plasma parece não saturar com altas concentrações de vitaminas, talvez por ser inerte. Ele está diretamente relacionado com a ingestão oral, mas, acredita-se que não seria o melhor indicador da natureza antioxidante destas vitaminas. Sabe-se que o plasma tem inúmeros componentes antioxidantes, mas que sua contribuição na produção de espécies reativas é pequena em relação à produção vinda das células. [53][54]

Reis, 2006 [103], também não observou diferença significativa na capacidade de redução direta do MTT pelo plasma entre DM1 e não-diabéticos.

A SOD foi escolhida para este estudo devido à relação do superóxido com vitaminas antioxidantes como ascorbato e alfa-tocoferol. [77]

Como esperado e de acordo com outro estudo, a expressão de mRNA Zn-SOD e mRNA Mn-SOD de diabéticos tipo 1 foi menor que não diabéticos (ND=1,00; Zn:DM1=0,5/ Mn:DM1=0,65). A própria presença de espécies reativas de oxigênio em diabéticos, como relatado anteriormente, pode ser causadora da redução de expressão da SOD nos mesmos. Esses efeitos podem ser acarretados pelo tempo ou gravidade da doença. [78]

Com a presença de antioxidantes, os resultados de mRNA Zn-SOD para o grupo ND tiveram diferentes perfis nas duas concentrações. (ND: controle=1,00; [A]=1,41; [20A]=0,58). Resultados de Sindhuet al., 2004 não encontraram efeito de antioxidantes sob Zn-SOD em ratos não diabéticos. A Zn-SOD está localizada nos compartimentos citoplasmáticos intracelulares, local de presença principalmente da vitamina C. [78] Portanto, a redução da expressão de mRNA Zn-SOD na presença da concentração [20A] pode ter ocorrido devido ao excesso de vitaminas antioxidantes, como ocorreu com os resultados de quimioluminescência. (item 6.1.). Já no grupo DM1, ambas as concentrações do complexo vitamínico aumentaram a expressão da Zn-SOD com relação ao controle (DM1: controle=0,5; [A]=1,30; [20A]=1,42). Outros estudos demonstraram que a terapia antioxidante em diabéticos normalizava os níveis dessa enzima [78], e foi relatado que o alfa-tocoferol pode reduzir a liberação de ânions superóxido em estados de hiperglicemia. [41]

em que não houve atuação das vitaminas pelo método de MTT, a expressão de mRNA Mn-SOD foi elevada na presença das duas concentrações para ambos os grupos ND e DM1 (ND:controle=1,00; [A]=1,20; [20A]=1,15/ DM1: controle=0,65; [A]=1,22; [20A]=1,49). Uma explicação seria a influência da vitamina C, por exemplo, em um grande precursor da enzima que é feito no citosol e posteriormente transportado para a mitocôndria.[82] Outra explicação poderia ser a estimulação das citocinas IL-4 e IL-6, pelo complexo vitamínico (resultados mais à frente), as quais estimulam expressão da Mn-SOD. [79][83]

Novamente, a expressão controle de mRNA Catalase para DM1 foi reduzida com relação à ND (ND=1,00; DM1=0,43). Existem evidências da redução de níveis de catalase em células de pacientes diabéticos comparadas ao grupo controle, resultado também encontrado em nosso estudo como mostrado na Figura 19. A Catalase protege as células de H_2O_2 e tem papel importante na inativação de ROS e na adaptação ao estresse oxidativo. O mecanismo de baixa da Catalase em diabéticos é desconhecido. No entanto, pode ser uma consequência da redução de SOD e diminuição da produção de H_2O_2 , o qual regula a expressão de Catalase.[78]

No grupo ND, ambas as concentrações do complexo vitamínico reduziram a expressão de mRNA Catalase em relação ao controle ([A]=0,52; [20A]=0,33). A redução na expressão de mRNA Catalase na presença da concentração [20A] de células ND é justificável devido ao aumento na produção de ROS (Tabela 8) nesta concentração. Mas, o fato de a concentração [A] reduzir a expressão de mRNA Catalase é curioso. Especula-se que células de doadores sem a doença possam ser saturadas pelos efeitos antioxidantes das vitaminas tornando-se pró-oxidantes em alguns compartimentos, neste caso, na expressão de mRNA Catalase. [79] No grupo DM1, em concordância com os resultados anteriores, houve aumento da expressão de mRNA Catalase na presença de ambas as concentrações do complexo vitamínico ([A]=0,90; [20A]=0,93). Outros estudos não demonstraram aumento na expressão de Catalase sob influência de antioxidantes como vitamina C, vitamina E e beta-caroteno. [78] [99]

A expressão mais fidedigna para o grupo ND, de acordo com os nossos resultados, é a de mRNA Zn-SOD. Já para o grupo DM1, todos os achados, em geral, foram pertinentes com o esperado e a maior parte da literatura. Ou seja, as vitaminas reduzem a produção de ROS (Tabela 8) e aumentam a expressão de enzimas antioxidantes (Figuras 17, 18 e 19) em células de diabéticos tipo 1.

$p47^{phox}$, o grupo DM1 teve valor de controle maior que o grupo ND (ND=1,00; DM1=1,45). Para o grupo ND, a concentração [A] foi menor que o controle. E para DM1, os resultados não foram significativos.

Para mRNA $p47^{phox}$ novamente o controle de DM1(1,73) foi maior que o controle de ND (1,00). Na presença da concentração [A] do complexo vitamínico, a expressão de mRNA $p47^{phox}$ foi reduzida para ambos os grupos, diabéticos e não diabéticos (ND=0,81; DM1=0,54). A concentração [20A] foi significativa apenas para o grupo ND com aumento em relação ao controle (ND=1,73).

Já mRNA $p22^{phox}$ teve expressão significativa ao comparar os controles de ND e DM1 (ND=1,00;DM1=1,69) e redução na presença da concentração [20A] apenas no grupo DM1 (0,84).

Os resultados obtidos, mostraram que a expressão de mRNA $p91^{phox}$ e mRNA $p47^{phox}$ são semelhantes em células ND com redução na concentração [A] e aumento na concentração [20A]. Diferente deste grupo, células de DM1 não tiveram influência do complexo vitamínico na expressão de mRNA $p91^{phox}$ mas tiveram influência da concentração [A] do complexo ao reduzir a expressão de mRNA $p47^{phox}$ e mRNA $p22^{phox}$.

Os resultados para expressão de mRNA $p91^{phox}$ e mRNA $p47^{phox}$, mas não mRNA $p22^{phox}$ em células do grupo ND, são consistentes com os achados de Jackson et al.[85] em que células T derivadas de camundongos deficientes em p47 ou p91, apresentam defeito na produção de ROS, indicando envolvimento funcional destas proteínas. Em adição, há comprovações da geração defeituosa de ROS em células T de camundongos deficientes em p47 phox ou gp91 phox , subunidades importantes para o grupo ND. [85]

Em células do grupo DM1, p47 phox e p22 phox mas não p91 phox , apenas com a concentração [A], tiveram resultados significativos. Esses achados podem ser relacionados aos achados de Omoriet al. [84] que relataram o aumento na geração de superóxido na diabetes induzido por p47 phox , um componente chave da NADPH oxidase. Esses resultados comprovam que a p47 phox prematuramente se transloca à membrana e associa-se com o p22 phox em células de sujeitos diabéticos, sendo mais ativas neste grupo. [85]

A NADPH oxidase, e principalmente a subunidade p47 phox , pode ter sido ativada por inúmeros estímulos, dentre eles, as citocinas pró-inflamatórias. [86] O desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes pode estar relacionado com a geração de processos inflamatórios que

e anti-inflamatórias. Isso pode ocorrer principalmente em estados comuns da diabetes, o de hiperglicemia.[100] Portanto, questionamos a seguir:

Os oxidantes aumentam a produção de interleucinas (IL-8 e IL-6) e TNF em resposta a estímulos inflamatórios, e as citocinas aumentam a produção dos mesmos oxidantes gerando um ciclo de reações. A IL-1 β , IFN- γ e TNF- α , por exemplo, induzem a produção de superóxido via NADPH oxidase, o qual, em contrapartida aumenta a expressão dessas mesmas citocinas.[87]Em adição, a defesa antioxidante atua direta ou indiretamente protegendo o organismo dos ataques das citocinas e espécies oxidantes. Vem sendo demonstrado que as vitaminas antioxidantes podem inibir a produção de citocinas inflamatórias.[88][89] Acredita-se que os antioxidantes protegem indiretamente através da redução da ativação de vias de sinalização, prevenindo, portanto, a estimulação de citocinas por oxidantes.[90] Mas, deve haver uma resposta dose-dependente, uma vez que altas concentrações de vitaminas podem estimular ao invés de reduzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias.[91]

Os resultados significativos para o grupo Não Diabéticos foram: para [A], apenas aumento de IL-4, para [20A], aumento de IL-6 e redução de TNF- α , IL-10 e IL-4.O comportamento antioxidante do complexo vitamínico na concentração [A] e pró-oxidante na concentração [20A] em células ND foi verificado com a produção das citocinas, exceto pelo resultado curioso de redução de TNF- α com a concentração [20A]. Mas, já foi demonstrado que a vitamina C, por exemplo, tem efeito seletivo em citocinas pró-inflamatórias por mecanismos ainda não esclarecidos. Já foi relatado que esta inibiu TNF- α e IL-6, mas não IL-1 e IL-8 em monócitos e reduziu IL-1, mas sem a influência de TNF- α em linfócitos. [91].Esse resultado está de acordo com outros estudos que não constataram influência de vitaminas antioxidantes na liberação de IL-8, apenas IL-6.[92][93].

Para o grupo Diabéticos tipo 1, apenas a concentração [20A] teve resultados significativos com redução de TNF- α e aumento de IL-4. Citocinas pró-inflamatórias do tipo 1, como IFN- γ , IL-1 β , IL-12 e TNF- α , liberadas por macrófagos e células T na vizinhança de células beta pancreáticas tem sido repetidamente relacionadas à patogênese do diabetes tipo 1. [81] Abordagens acerca da prevenção da destruição de células beta e Diabetes tipo 1 devem ser direcionadas para a estimulação da produção e/ou ação de citocinas tipo 2 (IL-4 e IL-10), inibição da produção e/ou ação das citocinas tipo 1 (TNF- α) e inibição de radicais livres. [101]

ão ao seu receptor específico expresso na superfície da célula-alvo, desencadeando a transdução de sinais no interior da célula.[37] Portanto, uma vez avaliada a participação das citocinas no perfil oxidativo de células mononucleares, partimos para uma análise mais profunda através da sinalização celular.

Os resultados mostraram que para Não Diabéticos, os inibidores iPKB e H89 aumentaram a produção de ROS enquanto o Calphostin C e o PD169316 reduziram a produção de ROS. Isso está de acordo com os achados de Thannickal e Fanburg, 2000 [36] em que as vias p38MAPK e PKC são as duas vias mais envolvidas com estresse oxidativo, das quatro vias estudadas. Para Diabéticos tipo 1, todos os inibidores reduziram a produção de ROS.

Quando as células ND foram incubadas com o complexo vitamínico e os inibidores, ambas as concentrações, aumentaram a produção de ROS. Mas, resultados de iPKB e H89 não foram significativos com a concentração [20A]. Ou seja, o complexo vitamínico continuou contribuindo com o aumento de ROS antes verificado na inibição das vias AKT/PKB e PKA. Mas reverteu o resultado de inibição de PKC e p38MAPK, agora aumentando a produção de ROS, em ambas as concentrações [A] e [20A]. Existem evidências que o alfa-tocoferol inibe a via PKC a qual é grande estimuladora da NADPH oxidase com geração de ROS. [41] Mas, como o alfa-tocoferol deve estar em estado de radical, devido ao aumento de ROS comprovado na Tabela 8, a inibição da via PKC pode ter sido prejudicada, gerando mais espécies reativas de oxigênio. A vitamina C ativa a via p38MAPK, por maneiras a serem descobertas [47], o que pode explicar a reversão da inibição dessa via na presença do complexo vitamínico.

Em células DM1, a concentração [A], reverteu o efeito de redução na produção de ROS obtido pelos inibidores Calphostin C, PD169316 e H89. A concentração [20A] reverteu os efeitos de Calphostin C e H89, mas contribuiu com a inibição de AKT/PKB ao continuar reduzindo a produção de ROS. A inibição de ROS pelo bloqueio da via PKC utilizando o Calphostin C ou bloqueio da p38MAPK por DPI, já foi relatada em células mesangiais em estado de hiperglicemia.[93] A geração espontânea de ROS em granulócitos de pacientes diabéticos foi demonstrada como independente da via PKA, mas dependente da via AMPc/PKA.[39] A via PKA também está envolvida com outras vias como a p38MAPK (através da depleção de AMPc) durante complicações do diabetes.[94] A alteração da via Akt/PKB em diabéticos já foi comprovada por outros estudos. [71] Uma célula sob influência da hiperglicemia tenta

via de sobrevivência que é a PKB. Nas células de não diabéticos, esta ameaça não existe e esta via não necessita ser ativada como nos diabéticos.

Ao relacionar cada via e seus inibidores com a produção de ROS e a influência das vitaminas antioxidantes podemos discutir o seguinte:

Com relação à via AKT/PKB, sua inibição por iPKB mais o complexo vitamínico, mostrou aumento na produção de ROS em células ND e redução na produção de ROS em células DM1. Ou seja, para o grupo ND, as vitaminas aumentam a produção de espécies reativas, resultado encontrado anteriormente. As vitaminas parecem não influenciar a via AKT/PKB. E realmente não há literatura relatando o envolvimento de vitaminas antioxidantes com essa via.

As vitaminas C e alfa-tocoferol são inibidores da via PKC. [89][102] Mas, vimos que as vitaminas revertem a inibição da via, que tinha causado redução na produção de ROS para um aumento na liberação destes, nos dois grupos.

Sabe-se que a Vitamina C e E podem atuar como inibidoras da via p38MAPK, mas em nossos resultados, o complexo vitamínico reverteu a inibição desta via nos dois grupos ND e DM1, novamente aumentando a produção de ROS. [47] [89]

Já para PKA, as vitaminas tiveram menor efeito na inibição do H89 em células ND, mas reverteu o efeito deste em células DM1. As vitaminas podem estar interferindo na regulação do inibidor, mas, por mecanismos desconhecidos. [39]

Mais pesquisas são necessárias para descobrir os verdadeiros efeitos das vitaminas antioxidantes em relação à sinalização celular envolvendo espécies reativas de oxigênio.

8. CONCLUSÃO

Assim diante do que foi exposto anteriormente, podemos concluir que para uma população de 20-39anos, não diabética, a exposição celular a vitaminas antioxidantes pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio, mas atuar positivamente em compartimentos antioxidantes. Conclui-se que para o grupo ND o complexo vitamínico estudado pode ter efeito

es menores de vitaminas tiveram maior eficiência e são provavelmente mais seguras.

Quanto a Diabéticos tipo 1, as vitaminas, em ambas as concentrações, obteve resultados predominantemente antioxidantes. Portanto, para diabéticos tipo 1, as vitaminas podem ser de grande valia no controle do estresse oxidativo causado pela doença e pelo descontrole da glicemia.

Podemos concluir que a busca por estilo de vida adequado não é embasado no sintético, no excesso ou nooneroso. A escolha de uma alimentação saudável é o primeiro recurso na ingestão de nutrientes importantes como as vitaminas antioxidantes. Seguir o equilíbrio, em todos os aspectos continua sendo a receita ideal para uma vida saudável, mesmo em pessoas já enfermas.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Saúde, M.d., *VIGITEL Brasil 2012: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico*. Ministério da Saúde, 2013.
2. Ramakrishna, V. and R. Jaikhani, *Evaluation of oxidative stress in Insulin Dependent Diabetes Mellitus (IDDM) patients*. *Diagn Pathol*, 2007. **2**: p. 22.
3. Liu, E. and G.S. Eisenbarth, *Type 1A diabetes mellitus-associated autoimmunity*. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2002. **31**(2): p. 391-410, vii-viii.
4. Daneman, D., *Type 1 diabetes*. *Lancet*, 2006. **367**(9513): p. 847-58.

- es, R., *Prevalência dos fatores de risco para Diabetes mellitus tipo 1 no grupo de endocrinologia pediátrica do Hospital Universitário-UFSC*. Arquivos Catarinenses de Medicina, 2004. **33**(4): p. 23-30.
6. Balda, C.A., Pacheco-Silva, A., *Aspectos imunológicos do diabetes melito tipo 1*. Rev Ass Med Brasil, 1999. **45**(2): p. 175-180.
 7. Nogueira-Machado, J., *Estresse Oxidativo: Revisão da Sinalização Metabólica no*. Arq Bras Endocrinol Metab, 2008.
 8. Brownlee, M., *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 813-20.
 9. Maritim, A.C., R.A. Sanders, and J.B. Watkins, 3rd, *Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review*. J Biochem Mol Toxicol, 2003. **17**(1): p. 24-38.
 10. Halliwell, B., *Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis*. Br J Exp Pathol, 1989. **70**(6): p. 737-57.
 11. Kirkham, P. and I. Rahman, *Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy*. Pharmacol Ther, 2006. **111**(2): p. 476-94.
 12. Li, J.M. and A.M. Shah, *ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: potential relevance in diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(8 Suppl 3): p. S221-6.
 13. El-Benna, J., et al., *Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2005. **53**(3): p. 199-206.
 14. Assari, T., *Chronic Granulomatous Disease; fundamental stages in our understanding of CGD*. Med Immunol, 2006. **5**: p. 4.
 15. Nakanishi, S., et al., *Increasing of oxidative stress from mitochondria in type 2 diabetic patients*. Diabetes Metab Res Rev, 2004. **20**(5): p. 399-404.
 16. Oldham, K.M. and P.E. Bowen, *Oxidative stress in critical care: is antioxidant supplementation beneficial?* J Am Diet Assoc, 1998. **98**(9): p. 1001-8.
 17. Fridovich, I., *The biology of oxygen radicals*. Science, 1978. **201**(4359): p. 875-80.
 18. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 47-95.
 19. Sies, H., *Strategies of antioxidant defense*. Eur J Biochem, 1993. **215**(2): p. 213-9.
 20. Gutteridge, J.M. and G.J. Quinlan, *Antioxidant protection against organic and inorganic oxygen radicals by normal human plasma: the important primary role for iron-binding and iron-oxidising proteins*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1156**(2): p. 144-50.
 21. Halliwell, B., et al., *Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work*. Crit Rev Food Sci Nutr, 1995. **35**(1-2): p. 7-20.
 22. Bianchi, M., Antunes, LMG, *Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta*. Revista de Nutrição, 1999. **12**(2): p. 123-130.
 23. Sies, H. and W. Stahl, *Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants*. Am J Clin Nutr, 1995. **62**(6 Suppl): p. 1315S-1321S.
 24. Machlin, L.J., *Beyond deficiency. New views on the function and health effects of vitamins. Introduction*. Ann N Y Acad Sci, 1992. **669**: p. 1-6.
 25. Traber, M.G. and J. Atkinson, *Vitamin E, antioxidant and nothing more*. Free Radic Biol Med, 2007. **43**(1): p. 4-15.
 26. Brigelius-Flohe, R. and M.G. Traber, *Vitamin E: function and metabolism*. FASEB J, 1999. **13**(10): p. 1145-55.
 27. Odin, A.P., *Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action*. Mutat Res, 1997. **386**(1): p. 39-67.
 28. Pereira, J., *Nutrição e Alimentação - Vitaminas Hidro e Lipossolúveis*. Boletim do Criadouro Campo das Caviúnas, 2005. **17**.

- oids and human health. *Pharmacol Res*, 2007. **55**(3): p. 207-10.
30. Monsen, E.R., *Dietary reference intakes for the antioxidant nutrients: vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids*. *J Am Diet Assoc*, 2000. **100**(6): p. 637-40.
 31. Vazquez Martinez, C., et al., [*The SUVIMAX (France) study: the role of antioxidants in the prevention of cancer and cardiovascular disorders*]. *Rev Esp Salud Publica*, 1998. **72**(3): p. 173-83.
 32. Niki, E., et al., *Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene*. *Am J Clin Nutr*, 1995. **62**(6 Suppl): p. 1322S-1326S.
 33. Meydani, S.N., et al., *Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence*. *Am J Clin Nutr*, 1995. **62**(6 Suppl): p. 1462S-1476S.
 34. Abbas, A., Lichtman, AH, Pillai, S, *Imunologia Celular e Molecular*. 6 ed. 2005: Elsevier.
 35. Bilate, A., *Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas*. *Temas de Reumatologia Clínica*, 2007. **8**(2).
 36. Thannickal, V.J. and B.L. Fanburg, *Reactive oxygen species in cell signaling*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000. **279**(6): p. L1005-28.
 37. Silva, B., Horta, BAC, Alencastro, RB, Pinto, AC, *Kinase protein: structural features and chemical inhibitors*. *Química Nova*, 2009. **32**.
 38. Skalhegg, B.S. and K. Tasken, *Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA*. *Front Biosci*, 1997. **2**: p. d331-42.
 39. Nogueira-Machado, J.A., et al., *Modulation of the production of reactive oxygen species (ROS) by cAMP-elevating agents in granulocytes from diabetic patients: an Akt/PKB-dependent phenomenon*. *Diabetes Metab*, 2006. **32**(4): p. 331-5.
 40. Schaan, B., *O papel da proteína quinase C no desenvolvimento das complicações vasculares do diabetes mellitus*. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo*, 2006. **47**.
 41. Venugopal, S.K., et al., *Alpha-tocopherol decreases superoxide anion release in human monocytes under hyperglycemic conditions via inhibition of protein kinase C-alpha*. *Diabetes*, 2002. **51**(10): p. 3049-54.
 42. Koya, D. and G.L. King, *Protein kinase C activation and the development of diabetic complications*. *Diabetes*, 1998. **47**(6): p. 859-66.
 43. Fresno Vara, J.A., et al., *PI3K/Akt signalling pathway and cancer*. *Cancer Treat Rev*, 2004. **30**(2): p. 193-204.
 44. Liu, S.L., et al., *Reactive oxygen species stimulated human hepatoma cell proliferation via cross-talk between PI3-K/PKB and JNK signaling pathways*. *Arch Biochem Biophys*, 2002. **406**(2): p. 173-82.
 45. Roux, P.P. and J. Blenis, *ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004. **68**(2): p. 320-44.
 46. Evans, J.L., et al., *Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction?* *Diabetes*, 2003. **52**(1): p. 1-8.
 47. Bowie, A.G. and L.A. O'Neill, *Vitamin C inhibits NF-kappa B activation by TNF via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase*. *J Immunol*, 2000. **165**(12): p. 7180-8.
 48. Tan, P.H., et al., *Inhibition of NF-kappa B and oxidative pathways in human dendritic cells by antioxidative vitamins generates regulatory T cells*. *J Immunol*, 2005. **174**(12): p. 7633-44.
 49. Evans, J.L., et al., *Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes*. *Endocr Rev*, 2002. **23**(5): p. 599-622.

- immune response of human peripheral blood cells to
vitamins C and E. *J Nutr Biochem*, 2004. **15**(1): p. 45-50.
51. Prabhala, R.H., et al., *Enhancement of the expression of activation markers on human peripheral blood mononuclear cells by in vitro culture with retinoids and carotenoids*. *J Leukoc Biol*, 1989. **45**(3): p. 249-54.
 52. Zhang, P. and S.T. Omaye, *Beta-carotene and protein oxidation: effects of ascorbic acid and alpha-tocopherol*. *Toxicology*, 2000. **146**(1): p. 37-47.
 53. Fotouhi, N., et al., *Carotenoid and tocopherol concentrations in plasma, peripheral blood mononuclear cells, and red blood cells after long-term beta-carotene supplementation in men*. *Am J Clin Nutr*, 1996. **63**(4): p. 553-8.
 54. Evans, R.M., L. Currie, and A. Campbell, *The distribution of ascorbic acid between various cellular components of blood, in normal individuals, and its relation to the plasma concentration*. *Br J Nutr*, 1982. **47**(3): p. 473-82.
 55. Preziosi, P., et al., *Effects of supplementation with a combination of antioxidant vitamins and trace elements, at nutritional doses, on biochemical indicators and markers of the antioxidant system in adult subjects*. *J Am Coll Nutr*, 1998. **17**(3): p. 244-9.
 56. ISO, I.S.O.-. *iological evaluation of medical devices. Part 5. Test for cytotoxicity: in vitro methods*. 2009.
 57. Association, A.D., *Standards of medical care in diabetes*. *Diabetes Care*, 2011. **34**: p. S11-S61.
 58. Series, W.-T.R., *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation*. Geneva. World Health Organization, 2000.
 59. Miller, M., et al., *Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association*. *Circulation*, 2011. **123**(20): p. 2292-333.
 60. Standards, N.C.f.C.L., *How to define, determine and utilize reference intervals in the clinical laboratory: Proposed guidelines*. .NCCLS document 2000: p. C28-A2.
 61. Laboratorial, S.B.d.P.C.M., *Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial para Coleta de Sangue Venoso* 2009, Manole.
 62. Bicalho, H.M., C.M. Gontijo, and J.A. Nogueira-Machado, *A simple technique for simultaneous human leukocytes separation*. *J Immunol Methods*, 1981. **40**(1): p. 115-6.
 63. Liu, Y. and M.G. Nair, *An efficient and economical MTT assay for determining the antioxidant activity of plant natural product extracts and pure compounds*. *J Nat Prod*, 2010. **73**(7): p. 1193-5.
 64. Muraina, I.A., M.M. Suleiman, and J.N. Eloff, *Can MTT be used to quantify the antioxidant activity of plant extracts?* *Phytomedicine*, 2009. **16**(6-7): p. 665-8.
 65. Chaves, M.M., et al., *Host defenses in the aged: evaluation of the balance between oxidizing species generation and reducing power in phagocytosing human granulocytes*. *Mech Ageing Dev*, 1998. **104**(1): p. 103-9.
 66. Allen, R.C., R.L. Stjernholm, and R.H. Steele, *Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1972. **47**(4): p. 679-84.
 67. Murphy, M.E. and H. Sies, *Visible-range low-level chemiluminescence in biological systems*. *Methods Enzymol*, 1990. **186**: p. 595-610.
 68. Vinolo, M.A., et al., *Effects of short chain fatty acids on effector mechanisms of neutrophils*. *Cell Biochem Funct*, 2009. **27**(1): p. 48-55.
 69. Xiong, Q., et al., *Acute effects of microcystins exposure on the transcription of antioxidant enzyme genes in three organs (liver, kidney, and testis) of male Wistar rats*. *J Biochem Mol Toxicol*, 2010. **24**(6): p. 361-7.

- and p38 MAPK on ROS production in neutrophil age-related. Lack of IL-10 effect in older subjects. *Mech Ageing Dev*, 2009. **130**(9): p. 588-91.
71. Nogueira-Machado, J.A., et al., *Modulation of the reactive oxygen species (ROS) generation mediated by cyclic AMP-elevating agents or Interleukin 10 in granulocytes from type 2 diabetic patients (NIDDM): a PKA-independent phenomenon*. *Diabetes Metab*, 2003. **29**(5): p. 533-7.
 72. Bouwens, M., L.A. Afman, and M. Muller, *Fasting induces changes in peripheral blood mononuclear cell gene expression profiles related to increases in fatty acid beta-oxidation: functional role of peroxisome proliferator activated receptor alpha in human peripheral blood mononuclear cells*. *Am J Clin Nutr*, 2007. **86**(5): p. 1515-23.
 73. Rietjens, I.M., et al., *The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids*. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2002. **11**(3-4): p. 321-33.
 74. Kavutcu, M., et al., *Reduced enzymatic antioxidant defense mechanism in kidney tissues from gentamicin-treated guinea pigs: effects of vitamins E and C*. *Nephron*, 1996. **72**(2): p. 269-74.
 75. Brennan, L.A., et al., *The effect of vitamin C or vitamin E supplementation on basal and H2O2-induced DNA damage in human lymphocytes*. *Br J Nutr*, 2000. **84**(2): p. 195-202.
 76. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease*. *Biochem J*, 1984. **219**(1): p. 1-14.
 77. Zelko, I.N., T.J. Mariani, and R.J. Folz, *Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression*. *Free Radic Biol Med*, 2002. **33**(3): p. 337-49.
 78. Sindhu, R.K., et al., *Dysregulation of hepatic superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in diabetes: response to insulin and antioxidant therapies*. *Clin Exp Hypertens*, 2004. **26**(1): p. 43-53.
 79. Sadi, G., O. Yilmaz, and T. Guray, *Effect of vitamin C and lipoic acid on streptozotocin-induced diabetes gene expression: mRNA and protein expressions of Cu-Zn SOD and catalase*. *Mol Cell Biochem*, 2008. **309**(1-2): p. 109-16.
 80. Frakenburg, S., Wang, X., Wilner, Y., *Vitamin A inhibits cytokine production by type 1 lymphocytes in vitro*. *Cell Immun*, 1998. **185** (1): p.75-81.
 81. Nicoletti, F., et al., *Serum levels of the interferon- γ -inducing cytokine interleukin-18 are increased in individuals at high risk of developing Type I diabetes*. *Diabetologia*, 2001. **44**(3): p.309-311.
 82. Brouwer, M., et al., *The paradigm that all oxygen-respiring eukaryotes have cytosolic CuZn-superoxide dismutase and that Mn-superoxide dismutase is localized to the mitochondria does not apply to a large group of marine arthropods*. *Biochemistry*, 1997. **36**(43): p. 13381-8.
 83. Tsan, M.F., et al., *IL-6 enhances TNF-alpha- and IL-1-induced increase of Mn superoxide dismutase mRNA and O2 tolerance*. *Am J Physiol*, 1992. **263**(1 Pt 1): p. L22-6.
 84. Omori, K., et al., *Priming of neutrophil oxidative burst in diabetes requires preassembly of the NADPH oxidase*. *J Leukoc Biol*, 2008. **84**(1): p. 292-301.
 85. Jackson, S.H., et al., *T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(8): p. 818-27.
 86. Ray, R. and A.M. Shah, *NADPH oxidase and endothelial cell function*. *Clin Sci (Lond)*, 2005. **109**(3): p. 217-26.
 87. Bianca, V.D., et al., *beta-amyloid activates the O-2 forming NADPH oxidase in microglia, monocytes, and neutrophils. A possible inflammatory mechanism of neuronal damage in Alzheimer's disease*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(22): p. 15493-9.

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

- of lipid and cholesterol oxidation products and cytokines in diabetes mellitus and cigarette smoking: effects of vitamin E treatment. *Atherosclerosis*, 1997. **129**(2): p. 169-76.
89. Cindrova-Davies, T., et al., *Nuclear factor-kappa B, p38, and stress-activated protein kinase mitogen-activated protein kinase signaling pathways regulate proinflammatory cytokines and apoptosis in human placental explants in response to oxidative stress: effects of antioxidant vitamins*. *Am J Pathol*, 2007. **170**(5): p. 1511-20.
90. Grimble, R.F., *Nutritional antioxidants and the modulation of inflammation: theory and practice*. New Horiz, 1994. **2**(2): p. 175-85.
91. Hartel, C., et al., *Effects of vitamin C on intracytoplasmic cytokine production in human whole blood monocytes and lymphocytes*. *Cytokine*, 2004. **27**(4-5): p. 101-6.
92. Kugelmas, M., et al., *Cytokines and NASH: a pilot study of the effects of lifestyle modification and vitamin E*. *Hepatology*, 2003. **38**(2): p. 413-9.
93. Lee, H.B., et al., *Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy*. *J Am Soc Nephrol*, 2003. **14**(8 Suppl 3): p. S241-5.
94. Jain, S.K., et al., *Hyperketonemia increases tumor necrosis factor-alpha secretion in cultured U937 monocytes and Type 1 diabetic patients and is apparently mediated by oxidative stress and cAMP deficiency*. *Diabetes*, 2002. **51**(7): p. 2287-93.
95. Mahoney, C.W. and A. Azzi, *Vitamin E inhibits protein kinase C activity*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988. **154**(2): p. 694-7.
96. Carr, A., Frei, B., *Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions?*, *FASEB J*, 1999. **13**: p.1007-1024.
97. Dominguez, C., Ruiz, E., Gussinye, M., Carrascosa, A., *Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents*. *Diabetes Care*, 1998. **21**: p.1736-1742.
98. Claudiere, J., Ferrari-Iliou, R., *Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms*. *Food Chem Toxicol*, 1999. **37**: p.949-962
99. Mekinova D. et al., *Effect of intake of exogenous vitamins C, E and beta-carotene on the antioxidative status in kidneys of rats with streptozotocin induced diabetes*. *Nahrung*, 1995. **39**: p.257-261.
100. Esposito, K., *Inflammatory Cytokine Concentrations Are Acutely Increased by Hyperglycemia in Humans: Role of Oxidative Stress*. *Circulation*, 2002. **106**: p.2067-2072.
101. Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W.L., *Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin dependent diabetes mellitus*. *BiochemPharmacol*, 1998. **55**: p.1139-1149.
102. Deveraj, S., Li, D., Jialal, I. *The Effects of Alpha Tocopherol Supplementation on Monocyte Function Decreased Lipid Oxidation, Interleukin 1b Secretion, and Monocyte Adhesion to Endothelium*. *J ClinInvest*, 1996. **98**(3): p.756-763.
103. Reis, JS. *Diabetes tipo 1: Estudo da associaçao entre o balanço oxidante/antioxidante com parâmetros clínicos e bioquímicos [dissertação]*. Belo Horizonte, Programa de Pós-graduação e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte, 2006.
104. Pazdro, R., Burgess, J.R. *The role of vitamin E and oxidative stress in diabetes complications*. *MechAgeingDevelop*, 2010. **131**: 276-286.

10.1. Artigos publicados – (dados da Tese)

Current Aging Science, 2012, 5, 000-000

1

High Doses of *In vitro* Beta-carotene, Alpha-Tocopherol and Ascorbic Acid Induce Oxidative Stress and Secretion of IL-6 in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Healthy Donors

Oliveira B.F.¹, Veloso C.A.¹, Nogueira-Machado J.A.² and Chaves M.M.^{1*}

DIABETES/METABOLISM RESEARCH AND REVIEWS

Diabetes Metab Res Rev 2013; 29: 636–645.

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/dmrr.2439

RESEARCH ARTICLE

β -Carotene, α -tocopherol and ascorbic acid: differential profile of antioxidant, inflammatory status and regulation of gene expression in human mononuclear cells of diabetic donors

The Role of Oxidative Stress in the Aging Process

Barbara F. Oliveira¹, José Augusto Nogueira-Machado²,
and Míriam M. Chaves^{1,7}

¹Biochemistry of Aging and Correlated Diseases, Biochemistry and Immunology
Department, Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais,
BH/MG, Brazil; ²Santa Casa Hospital of Belo Horizonte, MG, Brazil

E-mail: banutri@yahoo.com.br; aunog.bh@terra.com.br; chavesmm@icb.ufmg.br

Received March 25, 2010; Accepted April 27, 2010; Published June 15, 2010

Original research paper

Ascorbic acid, alpha-tocopherol, and beta-carotene reduce oxidative stress and proinflammatory cytokines in mononuclear cells of Alzheimer's disease patients

Barbara Fonseca de Oliveira¹, Clara Araujo Veloso¹, José Augusto Nogueira-Machado², Edgar Nunes de Moraes³, Rodrigo Ribeiro dos Santos³, Marco Túlio Gualberto Cintra³, Míriam Martins Chaves¹

¹Laboratório de Bioquímica do Envelhecimento e Doenças Correlacionadas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil, ²Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte, MG, Brazil, ³Instituto Jenny de Andrade Faria de Atenção à Saúde do Idoso e da Mulher do HC-UFMG – Alameda Álvaro Celso, Belo Horizonte, MG, Brazil

Research article

Vitamin complex (ascorbic acid, alpha-tocopherol and beta-carotene) induces micronucleus formation in PBMNC unrelated to ROS production

Clara A. Veloso¹, Bárbara F. Oliveira¹, Fernanda Elisa P. Mariani¹,
Fernanda S. Fagundes-Neto², Caroline Maria O. Volpe²,
José Augusto Nogueira-Machado², Míriam M. Chaves¹

¹Laboratório de Bioquímica do Envelhecimento e Doenças Correlacionadas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, ²Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Santa Casa Belo Horizonte, Rua Domingos Vieira, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

11. ANEXO II - Prêmios recebidos

11.1 - 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:

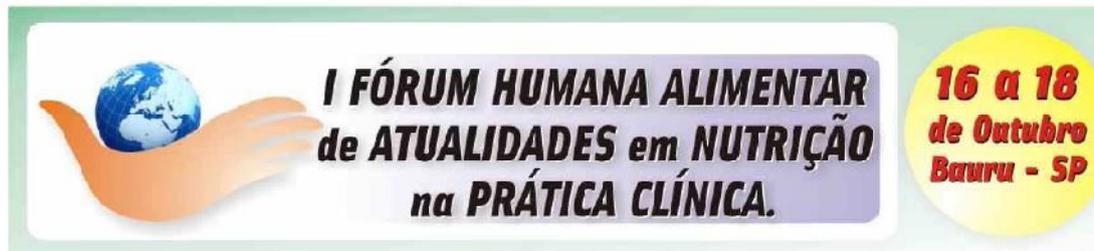
Barbara de Oliveira

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

**Evento 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

12.1. Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O projeto “AVALIAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO REFERENTE À NECESSIDADE DE SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINAS” tem como objetivo avaliar possíveis danos celulares causados pelo β -caroteno, ácido ascórbico, alfa-tocoferol, ácido em células mononucleares durante o processo de envelhecimento.

As células mononucleares serão obtidas a partir de 10 ml de sangue venoso periférico (coletados em tubos vacutainer contendo heparina como anticoagulante – material descartável). Este método não acarreta danos para a saúde, nem prejudica o paciente, mesmo assim, as amostras de sangue periférico serão obtidas somente com a permissão por escrito destes.

Os participantes serão informados sobre todos os procedimentos realizados e poderão se recusar a participar da pesquisa, ou retirar o consentimento, mesmo após a assinatura deste termo. Os mesmos permanecerão anônimos no estudo, não constando em nenhum arquivo o nome completo e/ou endereço, apenas iniciais e números.

Os resultados estarão disponíveis para os participantes. Este projeto visa também publicação dos resultados em revistas especializadas. Não haverá despesas pessoais para o paciente, nem compensação financeira pela sua participação. Garantimos que os exames realizados serão apenas aqueles relativos à pesquisa e que o mesmo não será utilizado, em hipótese alguma, para outro fim além do citado.

Em qualquer época do estudo o doador poderá solicitar esclarecimentos ao investigador principal e a responsável pelo estudo, Miriam Chaves Schultz e Bárbara Fonseca de Oliveira, respectivamente, que poderão ser encontradas no laboratório de Bioquímica do Envelhecimento e Doenças Correlacionadas, situado na Universidade Federal de Minas Gerais – Av. Antônio Carlos, 6627 – ICB – Q4 – sala 179, telefones (31) 3409-2660 e 41410342.

DECLARAÇÃO DE CONCORDÂNCIA

Eu, _____,

documento (tipo e número) _____ concordo em participar da pesquisa “Avaliação do perfil metabólico referente à necessidade de suplementação com vitaminas” desenvolvida na Universidade Federal de Minas Gerais - tel 31-3409-2660. Para isto concordo, sem nenhum pagamento, em doar uma amostra de sangue periférico e autorizo o uso desse material para trabalhos científicos sob coordenação da pesquisadora Dra. Miriam Chaves Schultz.

Belo Horizonte, ___ de _____ de _____

Assinatura do participante ou representante legal



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.


Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG