

ALEXANDRE PEREIRA DE MELLO

**DOENÇA DE ALZHEIMER: ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ESTRESSE
OXIDATIVO E CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS INDUZIDOS POR
HIDROCORTISONA, RESVERATROL E NORADRENALINA EM LEUCÓCITOS
HUMANOS.**

Belo Horizonte, 2015

Alexandre Pereira de Mello

Doença de Alzheimer: Estudo da produção de estresse oxidativo e citocinas pró e anti-inflamatórias induzidos por hidrocortisona, resveratrol e noradrenalina em leucócitos humanos.

Projeto apresentado ao Curso de Especialização em Neurociências do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Neurociências.

Orientadora: Prof^a. Dra. Miriam Chaves Schultz

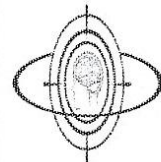
Instituto de Ciências Biológicas
UFMG

Belo Horizonte, 2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CURSO DE NEUROCIÊNCIAS E SUAS FRONTEIRAS



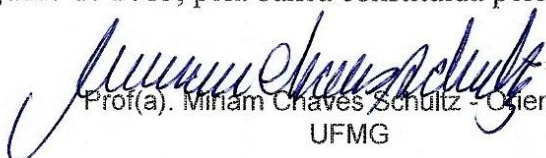
FOLHA DE APROVAÇÃO


**DOENÇA DE ALZHEIMER: ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ESTRESSE
OXIDATIVO E CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS
INDUZIDOS POR HIDROCORTISONA, RESVERATROL E
NORADRENALINA EM LEUCÓCITOS HUMANOS**


ALEXANDRE PEREIRA DE MELLO

Monografia submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de NEUROCIÊNCIAS E SUAS FRONTEIRAS, como requisito para obtenção do certificado de Especialista em NEUROCIÊNCIAS E SUAS FRONTEIRAS, área de concentração NEUROCIÊNCIAS E SUAS INTERFACES.

Aprovada em 16 de julho de 2015, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Miriam Chaves Schultz - Orientador
UFMG


Prof(a). Pricila da Silva Cunha
UFMG


Prof(a). Thaís Maria da Mata Martins
UFMG

Belo Horizonte, 16 de julho de 2015.

Resumo

Evidências indicam que os danos gerados pelos radicais livres afetam negativamente as doenças crônico-degenerativas e que o envelhecimento pode ser caracterizado como um processo inflamatório crônico. Sendo a Doença de Alzheimer a mais comum forma de demência e o estresse oxidativo apresentando uma função primordial na patogênese de doenças neurodegenerativas, este estudo pretende verificar o efeito modulador e/ou neuroprotetor de substâncias neste desequilíbrio entre os níveis pro-oxidantes e anti-oxidantes. Tendo o Resveratrol como uma substância anti-oxidante facilmente obtida pela alimentação, o que torna seu uso particularmente interessante. Juntamente com a hidrocortisona e a noradrenalina como inerentes ao processo inflamatório a ser estudado. Serão utilizadas estas três substâncias no estudo da produção de estresse oxidativo e da produção de citocinas envolvidas na resposta inflamatória e anti-inflamatória em leucócitos humanos.

Abstract

Evidence indicates that the damage caused by free radicals negatively affect chronic diseases and aging can be characterized as a chronic inflammatory process. Since Alzheimer's disease the most common form of dementia and oxidative stress presenting a major role in the pathogenesis of neurodegenerative diseases, this study is to check the modulating effect and / or neuroprotective substances in this imbalance between pro-oxidant levels and anti-oxidants. Having Resveratrol as an anti-oxidant substance is readily obtained by feeding, which makes their use particularly interesting. Along with hydrocortisone and noradrenaline as inherent to the inflammatory process being studied. Are these three substances used in the study of oxidative stress and production of cytokine involved in the inflammatory and the anti-inflammatory response in human leukocytes.

Sumário

1- ANTECEDENTES CIENTÍFICOS	4
2- RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA DO TRABALHO	6
3- OBJETIVOS	11
3.1-Avaliação dos compartimentos oxidativos e redutores em leucócitos humanos	11
3.2-Verificação da liberação de citocinas por leucócitos humanos	11
4- MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1-Seleções dos doadores.....	12
4.2-Coleta de sangue	12
4.3-Separação celular e obtenção de leucócitos.....	12
4.4-Teste de viabilidade celular por incorporação de Azul de Trypan	13
4.5-Geração de estresse oxidativo <i>in vitro</i>	13
4.6-Ensaio de MTT.....	14
4.7-Ensaio de quimioluminescência dependente de luminol.....	15
4.8-Avaliação da produção de óxido nítrico	15
4.9-Quantificação da produção de citocinas	16
5- VIABILIDADE DO PROJETO	17
5.1-Capacitação técnica.....	17
5.2-Seleção de doadores	17
5.3-Reagentes.....	17
5.4-Equipamentos	17
5.5-Recursos financeiros.....	17
6-CRONOGRAMA DE ATIVIDADES	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18

1- ANTECEDENTES CIENTÍFICOS

Evidências indicam que os danos gerados pelos radicais livres afetam primariamente o envelhecimento e as doenças crônico-degenerativas [1]. As influências ambientais também afetam as reações químicas que se manifestam no envelhecimento [2,3]. E ainda, a teoria dos radicais livres prediz que estes estão diretamente relacionados a modificações genéticas e envolvidos nas desordens do envelhecimento [4].

O principal fator de risco para a Doença de Alzheimer (DA) é a idade, com sua incidência dobrando a cada cinco anos, após os 65 anos de idade [5]. Conseqüentemente, se relaciona intimamente aos danos causados pelos radicais livres durante o avançar da idade e sendo a demência a mais comum.

A DA foi descrita em 1907 por Alois Alzheimer [6], por meio de análises histológicas observadas em autópsia de cérebro de um paciente. Em 1910, Kraepelin introduziu a denominação do quadro clínico como doença de Alzheimer [7].

A DA apresenta uma progressão neurodegenerativa que tem como característica o declínio progressivo de múltiplos domínios cognitivos, adoecendo de maneira ocupacional e social [8,9]. Este quadro acarreta uma diminuição funcional progressiva e uma perda gradual de autonomia, que ocasionam nos indivíduos atingidos por ela, a dependência total de outras pessoas. Entre as alterações histopatológicas da DA se destacam as placas senis e os emaranhados neurofibrilares, no neocórtex e no hipocampo [10,11]; devido ao depósito de amiloide [12], nas regiões cerebrais relacionadas ao aprendizado, memória e cognição [13]. Tendo estas desordens neurodegenerativas como marcas da Doença de Alzheimer [6,14].

Além da perda neuronal, também ocorrem respostas inflamatórias, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial [15]. Apresentando ainda déficit colinérgico e alterações sinápticas [16].

Entre vários mecanismos fisiopatológicos conhecidos, a hipótese da cascata amilóide é a mais estudada. No entanto, surgem outras hipóteses focando: na formação de radicais livres, processos inflamatórios e fatores genéticos para desenvolvimento de terapias alternativas ou adjuvantes. Todos estes fatores podem interagir e amplificar estes efeitos, resultando num ciclo vicioso de toxicidade originando a disfunção neuronal e, finalmente, a morte celular [8]. Fatores em estudo ainda incluem o envelhecimento [17], os defeitos mitocondriais [18], diabetes [19,20], condições ambientais [21] e dieta [22].

Em 2010, eram estimados 454 mil novos casos de DA. Sendo projetado um aumento de 35% para 2030 e 959 mil em 2050 (um aumento de 110 por cento desde 2010). Em 2025, o número de pessoas com mais de 65 anos é estimado para mais de 7 milhões (40 por cento dos 5,1 milhões acima 65 anos afetada em 2015). Em 2050, o número de pessoas com 65 anos ou mais com a DA pode quase triplicar (13,8 milhões) [23].

2- RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

O envelhecimento resulta da redução da competência adaptativa ao estresse, ocorrendo uma diminuição da resposta simpática causada por modificações que levam à diminuição do número de receptores de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina). Além disso, as funções relacionadas ao estresse oxidativo, como a produção de radicais livres ou de citocinas pró-inflamatórias são aumentadas com a idade [24,25], caracterizando assim o envelhecimento como um processo inflamatório crônico [26].

No contexto fisiológico, os radicais livres são produzidos naturalmente pelo organismo em processos metabólicos oxidativos. Sendo de extrema necessidade para ativação do sistema imunológico, na desintoxicação de drogas, para a produção de óxido nítrico, em processos de relaxamento dos vasos sanguíneos e garantindo a homeostase intracelular. Existem indicações de danos primários causados pelos radicais livres nos processos crônico-degenerativos [27]. A produção de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ERO/ERN) pode ter causas exógenas ou endógenas, sendo comuns para vários tipos de células com perfil redutor deficitário. Quando a geração de ERO e ERN ultrapassa a capacidade antioxidante da célula, dá-se o nome de estresse oxidativo [28].

Como as ERO reagem com uma grande variedade de componentes celulares, causando danos cumulativos, elas tem implicações no processo de envelhecimento e de doenças neurodegenerativas. Assim, o estresse oxidativo tem uma função primordial no envelhecimento e na patogênese de doenças como a Doença de Alzheimer (DA), onde existe um desequilíbrio entre os níveis pró-oxidantes e antioxidantes [1].

O cérebro humano é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo, necessitando de defesas antioxidantes complexas para manter o balanço oxidativo. No entanto, com o envelhecimento há uma diminuição gradual das defesas antioxidantes que pode resultar em doença, tal como acontece na DA [16, 29].

As mitocôndrias são as principais fontes de estresse oxidativo. Os radicais livres produzidos durante o estresse oxidativo pela fuga de elétrons durante a transferência dos mesmos na cadeia transportadora de elétrons têm sido considerados como patologicamente relevantes na DA. Recentemente, verificou-se que não só o estresse oxidativo está envolvido na etiologia da doença, mas também tem um papel importante na sinalização de mecanismos de morte celular [30,31].

Além do estresse oxidativo, existem consideráveis evidências demonstrando que uma resposta inflamatória patológica está presente em doenças neurodegenerativas, como na Doença de Alzheimer (DA) [32, 33, 34]. De fato, citocinas pró-inflamatórias clássicas estão implicadas com o declínio cognitivo e a demência. A resposta inflamatória resulta, quase sempre, de um estímulo inicial, como trauma ou infecção. A resposta inflamatória aguda, no sistema nervoso central, originada pela ativação imediata das células da glia como resposta a estímulos nocivos, traduz-se numa resposta defensiva para reparar a área lesada. No entanto, se o estímulo for contínuo, desenvolve-se uma condição inflamatória crônica que leva a um fenômeno cumulativo de lesões ao longo do tempo [35].

Na fisiopatologia da DA, o processo inflamatório tem sido considerado desde uma possível causa da doença [36, 37, 26]. Neste contexto, durante o estresse físico é aumentada a secreção de cortisol, cuja biossíntese submete-se ao controle do hormônio ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) no eixo HPA (hipotálamo-pituitária-adrenal) [38]. Sendo um glicocorticóide, funciona como anti-inflamatório, além de potencializar os efeitos das catecolaminas [39].

A ação de corticosteróides sobre a produção de espécies reativas de oxigênio tem sido comprovada em trabalhos experimentais, demonstrando, em indivíduos adultos, que uma injeção única de hidrocortisona foi suficiente para provocar a diminuição significativa da produção de radicais livres derivados do O₂, alcançando um valor mínimo com 2 e 8 horas e retorno ao normal em 24 horas após a administração [40].

A maior fonte de anti-oxidantes é proveniente da alimentação, inclusive a família dos polifenóis [41]. Dentre os componentes desta família está o resveratrol, encontrado em vários produtos agrícolas. Possui uma variedade de efeitos fisiológicos benéficos, incluindo propriedades anti-oxidantes, anti-ateroscleróticas, cardioprotetoras e neuroprotetoras [43]. Tanto em modelos *in vivo* quanto *in vitro*, de muitas patologias, inclusive AD. O resveratrol, uma fitoalexina que é naturalmente sintetizada em resposta a ataque por fungos [42,43,44]. É também encontrada em amendoins, amoras, e outros mais de 70 espécies de plantas que são propensos a ataque por fungos [46], tem sido reconhecido por suas propriedades anti-oxidantes [47,48,49,50]. Neste contexto, o resveratrol pode ser encontrado principalmente nas sementes de uvas, na película das uvas pretas e no vinho tinto. Foi descoberto em pesquisa na PUCRS que a raiz de uma hortaliça chamada azeda possui cem vezes mais resveratrol do que o suco de uva ou o vinho. Quanto mais intensa for a cor, quer do vinho quer das uvas, tanto maior o seu conteúdo em polifenóis . Além do resveratrol, existem outros polifenóis com interesse para a saúde humana, tais como os taninos, flavonas e os ácidos fenólicos [51].

Estudos indicam que o resveratrol pode ajudar a diminuir os níveis de lipoproteínas de baixa densidade, também conhecida como colesterol LDL e aumentar os níveis de lipoproteínas de alta densidade, o colesterol HDL. (O LDL, principalmente no seu estado oxidado, pode acumular-se nas paredes dos vasos sanguíneos, levando à formação de placas de ateroma. Essas placas dão origem à aterosclerose que causa a obstrução dos vasos sanguíneos) [52].

Estudos parecem indicar também um efeito benéfico do resveratrol na prevenção do câncer, pela sua capacidade de conter a proliferação de células tumorais, através da inibição da proteína NF kappa- β , a qual está envolvida na regulação da proliferação celular [53].

Além de excelentes propriedades de eliminação de radicais livres, o resveratrol pode oferecer outros efeitos para a célula, por exemplo, aumentando o tempo de vida em levedura [54]. Este efeito é explicado pela sua capacidade para ativar Sirtuínas [56]. Sendo capaz de aumentar a expectativa de vida de leveduras e vermes, dependente da atuação da proteína Sirtuína (Sir2) [55, 56].

Os múltiplos papéis de resveratrol: como um antioxidante e como um agente promotor do aumento da expectativa de vida; o coloca como um candidato favorável para o tratamento de doenças neurodegenerativas [57,58,59].

Ratos em laboratório, que receberam uma dieta hipercalórica, viveram 20% a mais, comparados com os demais ratos que não ingeriram o resveratrol [62]. Por fim, foi mostrado que para um grupo de humanos obesos, a suplementação de resveratrol por 30 dias, apresentou efeitos benéficos na pressão sistólica e diminuiu os níveis de glicose e lipídeos circulantes no sangue [60].

O balanço pró-oxidante e anti-oxidante pode ser determinante para desencadear respostas negativas ou positivas do sistema imunológico, pois o mesmo apresenta várias propriedades de extrema importância à sobrevivência. Regulado por neurotransmissores, citocinas e hormônios, este interage com diferentes sistemas do organismo, especialmente o sistema nervoso autônomo, o sistema nervoso central e o sistema endócrino. Os diversos estímulos captados pelo cérebro durante diferentes situações podem agir de maneira benéfica ou prejudicial sobre o sistema imune, desencadeando uma série de reações com consequências importantes. Entre estes estímulos, o estresse merece destaque [61].

No contexto do sistema imune que age através de suas células, os leucócitos polimorfonucleares ganham destaque [62], por serem células que estão envolvidas na defesa não específica e na inflamação. Durante esse processo existe um aumento significativo da produção de superóxido, peróxido de hidrogênio e formação de radicais livres.

Diante desses fatos, objetiva-se conhecer a correlação entre os aspectos fisiopatológicos que envolvem o envelhecimento, o Alzheimer, a hidrocortisona, a noradrenalina, o resveratrol, as células do sistema imune e o estresse oxidativo. Além disso, o estudo visa contribuir com o preenchimento da lacuna existente acerca dos conhecimentos fisiopatológicos do indivíduo idoso e suas relações com a Doença de Alzheimer (DA).

Devido ao papel das ERO na fisiopatologia da DA, é possível afirmar que uma terapêutica anti-oxidante e de remoção de radicais livres seja importante no tratamento da doença. Já que são conhecidos muitos anti-oxidantes que não possuem efeitos secundários significativos [63,30].

Considerando que resveratrol pode ser facilmente obtido através da alimentação, que outras ervas que podem fornecer novas opções para o tratamento de pacientes com AD [64,65,66,67] e que remédios derivados de plantas são populares [68]. Existindo mais de 30000 espécies de plantas que podem oferecer aproximadamente 4000 flavonóides [69,70,71]. Investigar os benefícios para a saúde de todos estes compostos naturais em geral e resveratrol, em particular, colocam vários desafios para as próximas décadas.

Com esse conhecimento cria-se uma nova perspectiva em terapias que possam minimizar os efeitos deletérios do envelhecimento e proporcionar uma melhor qualidade de vida para estes indivíduos.

3- OBJETIVOS

Objetivo geral:

Verificar em um ambiente de estresse oxidativo em leucócitos, o possível efeito modulador e/ ou neuroprotetor do resveratrol, noradrenalina ou hidrocortisona.

Objetivos Específicos:

3.1- Avaliação dos compartimentos oxidativos e redutores em leucócitos humanos:

- A capacidade redutora celular por ensaio de MTT, em leucócitos, estimuladas com resveratrol, noradrenalina e hidrocortisona, em ambiente de estresse oxidativo.
- A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), por ensaio de quimioluminescência dependente de luminol, em leucócitos, estimulados com resveratrol, noradrenalina e hidrocortisona, em ambiente de estresse oxidativo.
- Produção de óxido nítrico em leucócitos, estimuladas com resveratrol, noradrenalina e hidrocortisona, em ambiente de estresse oxidativo.

3.2 - Verificação da liberação de citocinas por leucócitos humanos:

- Dosagem de IL-6, IL-8, IL-10 e IL-4 através de kits comerciais.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1-Seleções dos doadores:

Serão selecionados indivíduos dos sexos masculino e feminino divididos em duas faixas etária: 1- (50-60 anos) e 2- (70-85 anos), como sujeitos de pesquisa. Os critérios de inclusão e exclusão deste projeto de pesquisa serão definidos pela equipe médica responsável pela seleção dos sujeitos de pesquisa. Os doadores serão divididos em dois grupos: A) controle e B) portadores da doença de Alzheimer (DA). A escolha do grupo B dependerá de um histórico médico, exames físicos e dados laboratoriais, selecionados pelo Prof. Dr. Edgar Nunes de Moraes e Dr. Rodrigo Santos – (Centro de Referência do Idoso do HC-UFMG). Adotaremos os seguintes critérios de exclusão: fumantes, portadores de infecção, inflamação, desordens lipoproliferativas, arteriosclerose, insuficiência cardíaca, uso de medicamentos que influenciem diretamente na função imune, diabéticos e doenças metabólicas. Este trabalho faz parte de um grande projeto que já foi submetido à Plataforma Brasil e atualmente aguarda parecer do Comitê de Ética da UFMG.

4.2- Coleta de sangue:

Amostras de sangue venoso periférico serão coletadas dos pacientes com DA e dos indivíduos controle por meio da punção venosa, em tubos vacutainer contendo heparina como anticoagulante [72].

4.3-Separação celular e obtenção de leucócitos:

Serão obtidos a partir do sangue periférico, sendo que 4 ml de sangue periférico heparinizado serão adicionados ao gradiente de Ficoll-Hypaque de

densidade 1,12 (3,0ml). Este tubo será centrifugado por 30 minutos a 1500 rpm, originando um anel formado por leucócitos. O anel será então transferido separadamente para um tubo siliconizado e será submetido a três lavagens em PBS. Após as lavagens, as células serão ressuspensas em um ml de PBS. A contagem destas células será realizada no microscópio utilizando uma câmara de Neubauer e o número calculado pela seguinte fórmula: células/mL = $n^{\circ}/4 \times \text{diluição} (100) \times 10^4$.

4.4-Teste de viabilidade celular por incorporação de Azul de Trypan:

Paralelamente aos ensaios, será realizado o teste de viabilidade celular pela incorporação do Azul de Trypan [73]. Para este teste, aos leucócitos será adicionado o corante Azul de Trypan (0,3%) em salina e as células serão contadas em câmara de Neubauer. Após este procedimento, células mortas e vivas serão contadas. As células que incorporaram o corante serão consideradas como não viáveis. Para que o experimento de quimioluminescência seja considerado válido, as amostras equivalentes deverão apresentar pelo menos 75% de células viáveis.

4.5- Geração de estresse oxidativo *in vitro*:

Os leucócitos serão estimulados com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na concentração de 300 μ M, com a finalidade de mimetizar um ambiente de estresse oxidativo. Testes realizados em nosso laboratório já demonstraram que na presença do H_2O_2 há aumento da produção de ERO quando comparado às células que não foram incubadas com H_2O_2 .

4.6- Ensaio de MTT:

O MTT (brometo de tetrazólio) é um sal que avalia a integridade mitocondrial. O teste de MTT [3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium] que avalia a capacidade das desidrogenases em converter o sal MTT (solúvel em água) em cristais de formazan (insolúvel em água) e que constitui-se em um modelo para avaliar a viabilidade celular com base em uma reação colorimétrica [74,75]. A mitocôndria é uma organela de extrema importância neste estudo, pois é a maior fonte de origem de ERO, através da cadeia transportadora de elétrons; e o MTT irá reagir com enzimas indicando assim a atividade da cadeia transportadora de elétrons e, conseqüentemente, a viabilidade da célula. O MTT, quando incubado com células vivas, tem seu substrato quebrado por enzimas mitocondriais denominadas succinato desidrogenases, transformando um composto amarelo em um composto violeta (formazan). A quantidade de cristais formados é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Assim, quanto mais escura a coloração, ao final da reação, maior é a viabilidade celular e a atividade da cadeia respiratória. As células serão colocadas em placas de cultura celular de 96 poços na concentração de 1×10^5 células para cada poço, e um volume final de 200µL de células e meio de cultura RPMI (acrescido de 10% de soro fetal bovino). Serão incubadas em estufa umidificada à 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas para aderência. Decorrido esse tempo, o sobrenadante será retirado e a cada poço será acrescentada uma concentração de noradrenalina 10⁹M, resveratrol 500µM ou hidrocortisona em concentração fisiológica, com exceção do controle (somente células e RPMI). A placa será incubada novamente por 20 minutos e o sobrenadante retirado. Acrescentar-se-á 190µL de RPMI e 10µL da solução de MTT aos poços e a placa será colocada mais uma vez em estufa umidificada com 5% de CO₂ a 37°C por 1 hora. Em seguida, retirar-se-á o sobrenadante e será adicionado 100µL de DMSO homogeneizando, para dissolução dos cristais de formazan gerados. A absorbância será lida a 570nm no leitor de microplacas.

4.7- Ensaio de quimioluminescência dependente de luminol :

Esta técnica baseia-se na reação entre luminol (5 amino 2,3 dihydro 1, 4 phthalozinedione) e as espécies reativas geradas na ausência ou presença das diferentes concentrações das substâncias, individualmente. As células produzem uma luminosidade natural definida como quimioluminescência nativa ou natural. Contudo, esta luminosidade pode ser amplificada, usando-se reagentes químicos que, ao reagirem com o ERO produzido, passam a emitir a luminescência amplificada, conforme a reação: Luminol α aminofitalato + N₂ + Luz (425 nm). Um total de 1×10^6 de leucócitos serão pré-incubadas por 20 minutos, à temperatura de 37°C, na presença de resveratrol 500 μ M, noradrenalina 10⁹M ou hidrocortisona em concentração fisiológica e RPMI para perfazer um volume final de 2mL. Em todas as amostras será adicionado 40 μ L de H₂O₂ para mimetizar um ambiente de estresse oxidativo. Decorridos os 20 minutos, as células serão centrifugadas por 3 minutos a 1500 RPM, todo o sobrenadante retirado, e o pellet de células ressuspenso em 200 μ L de PBS. Em tubos específicos para Luminômetro, serão, então, colocados os 200 μ L de células, 10 μ L de luminol 10⁴M e PBS para completar o volume final de 700 μ L. Cada tubo será colocado no Luminômetro e a leitura será realizada em corridas de 15 minutos. Após o tempo decorrido, será retirado o tubo e a fita de papel com os valores de RLU/min, colocando novo tubo para leitura. O processo será repetido para todos os tubos. Será feita então a média dos minutos de cada tubo, excluindo os cinco primeiros minutos.

4.8- Avaliação da produção de óxido nítrico:

Será avaliada a quantificação de nitrito segundo reação de Griess [76] para observar a produção de óxido nítrico por leucócitos. Para tal será seguido o seguinte protocolo: os leucócitos serão incubados na presença ou ausência de noradrenalina 10⁹M, resveratrol 500 μ M e hidrocortisona em concentração

fisiológica. Em todos os ensaios o volume final será ajustado para 300µl com RPMI pH 7,4. Os leucócitos serão mantidos em placas de cultura celular de 24 poços, em estufa a 37°C e 5% CO₂ (dióxido de carbono) por 24h. A seguir os leucócitos serão centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos, isso resultará num sobrenadante, que será coletado e utilizado para dosagem do nitrito. O pellet será ressuspenso em 200µl de RPMI pH 7,4 e imediatamente, submetido à análise de viabilidade celular. Para dosagem do nitrito será utilizado 100µl de sobrenadante, que serão dispostos em placas de 96 poços. Aos sobrenadantes serão adicionados 100µl de solução de Griess, que é formada de sulfanilamida 1% em 2,5% de ácido fosfórico e naftiletenodiamida 0,1% em 2,5% de ácido fosfórico, numa proporção de 1:1. A concentração de nitrito será calculada por regressão linear, utilizando a curva padrão obtida a partir de uma solução de nitrito de sódio 1mM e RPMI.

4.9-Quantificação da produção de citocinas:

A quantificação da produção de interleucinas será realizada em sobrenadante de cultura (24 horas em estufa 5% CO₂, 37°C) de leucócitos (1 x 10⁶), na presença ou ausência de noradrenalina (10⁹M), resveratrol (500µM) e hidrocortisona em concentração fisiológica. O volume final deverá ser ajustado para 300µL com RPMI. O conteúdo da placa será analisado por um leitor de ELISA, no comprimento de onda 450nm.

5 -VIABILIDADE DO PROJETO

O projeto proposto se sustentará com base nos seguintes itens:

5.1- Capacitação técnica: O aluno está sendo treinado nas técnicas citadas por uma funcionária do laboratório (técnica).

5.2- Seleção de doadores: os doadores com Alzheimer e sem Alzheimer serão selecionados pelos doutores Edgar Nunes de Moraes e Rodrigo Santos – (Centro de Referência do Idoso do Hospital das Clínicas - UFMG).

5.3- Reagentes: todos os reagentes necessários para o desenvolvimento das técnicas propostas encontram-se em nosso laboratório.

5.4- Equipamentos: o laboratório possui todos os equipamentos necessários para o projeto.

5.5- Recursos financeiros: esta linha de pesquisa vem sendo desenvolvida em nosso laboratório com suporte financeiro da FAPEMIG.

6 -CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

ATIVIDADES	TRIMESTRES							
	1	2	3	4	5	6	7	8
SELEÇÃO DE DOADORES	X	X						
ENSAIO DE QUIMIOLUMINESCÊNCIA		X	X	X				
ENSAIO DE MTT				X	X			
ENSAIO DE PRODUÇÃO DE ÓXIDO ÍTRICO					X	X		
QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS						X	X	
CONFECÇÃO DA DISSERTAÇÃO								X

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1-HARMAN, Denham. The aging process. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 78, n. 11, p. 7124-7128, 1981.

2-HARMAN, Denham. The free radical theory of aging. Antioxidants and Redox Signaling, v. 5, n. 5, p. 557-561, 2003.

3-VENDELBO, M. H.; NAIR, K. S. Mitochondrial longevity pathways. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, v. 1813, n. 4, p. 634-644, 2011.

4-HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. The Journal of Gerontology. v.11, p. 298-300, 1956.

5-STOZICKA, Z.; ZILKA, N. e MOVAK, M. Risk and protective factors for sporadic Alzheimer's disease. Acta virologica, v. 51,n. 4, p. 205-222, 2007.

6-SELKOE, Dennis J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. Physiological reviews, v. 81, n. 2, p. 741-766, 2001.

7-SWERDLOW, Russell H. Pathogenesis of Alzheimer's disease. Clinical interventions in aging, v. 2, n. 3, p. 347, 2007.

8-MISTUR, Rachel et al. Current challenges for the early detection of Alzheimer's disease: brain imaging and CSF studies. Journal of Clinical Neurology, v. 5, n. 4, p. 153-166, 2009.

9-VENTURA, Ana LM et al. Cholinergic system: revisiting receptors, regulation and the relationship with Alzheimer disease, schizophrenia, epilepsy and smoking. Revista de Psiquiatria Clínica, v. 37, n. 2, p. 66-72, 2010.

10-CUMMINGS, Jeffrey L. et al. Reduction of behavioral disturbances and caregiver distress by galantamine in patients with Alzheimer's disease. *American Journal of Psychiatry*, 2004.

11-FREITAS, E. V. *Tratado de Geriatria e Gerontologia*. 2 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006.

12-KEIL, Uta et al. Mitochondrial dysfunction induced by disease relevant AbetaPP and tau protein mutations. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, v. 9, n. 2, p. 139-146, 2006.

13-KELLY, C. *Manual da Doença de Alzheimer*. Atlas Medical Publishing, Novartis. 2003.

14-TANZI, Rudolph E.; BERTRAM, Lars. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell*, v. 120, n. 4, p. 545-555, 2005.

15-LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. e NELSON, D. L. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 147, 2011.

16-REDDY, P. Hemachandra. Mitochondrial dysfunction in aging and Alzheimer's disease: strategies to protect neurons. *Antioxidants & redox signaling*, v. 9, n. 10, p. 1647-1658, 2007.

17-SELKOE, Dennis J. Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid\ beta-protein. *Journal of Alzheimer's disease*, v. 3, n. 1, p. 75-82, 2001.

18-REDDY, P. Hemachandra; BEAL, M. Flint. Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease?. *Brain Research Reviews*, v. 49, n. 3, p. 618-632, 2005.

19-SUZANNE, M. D. L. M.; WANDS, Jack R. Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 7, n. 1, p. 45-61, 2005.

20-QIU, Wei Qiao; FOLSTEIN, Marshal F. Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid- β peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. *Neurobiology of aging*, v. 27, n. 2, p. 190-198, 2006.

21-LAZAROV, Orly et al. Environmental enrichment reduces A β levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell*, v. 120, n. 5, p. 701-713, 2005.

22-TCHANTCHOU, Flaubert et al. Apple juice concentrate prevents oxidative damage and impaired maze performance in aged mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 8, n. 3, p. 283-288, 2005.

23-PARIHAR, M. S.; HEMNANI, Taruna. Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. *Journal of Clinical Neuroscience*, v. 11, n. 5, p. 456-467, 2004.

24-CAI, Zhiyou; ZHAO, Bin; RATKA, Anna. Oxidative stress and β -amyloid protein in Alzheimer's disease. *Neuromolecular medicine*, v. 13, n. 4, p. 223-250, 2011.

25-ALVES, G. J. e JOÃO, P. Neuroimunomodulação: sobre o diálogo entre o sistema nervoso e imune. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 29, n. 4, p. 363-369, 2007.

26-MIQUEL, Jaime et al. An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Current pharmaceutical design*, v. 15, n. 26, p. 3003-3026, 2009.

27-DE LA FUENTE, M. Effects of antioxidants on immune system ageing. *European journal of clinical nutrition*, v. 56, p. S5-8, 2002.

28-PERSSON, Torbjörn; **POPESCU**, Bogdan O.; **CEDAZO-MINGUEZ**, Angel. Oxidative stress in Alzheimer's disease: Why did antioxidant therapy fail?. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2014, 2014.

29-LONGO, Frank M.; **MASSA**, Stephen M. Neuroprotective strategies in Alzheimer's disease. *NeuroRx*, v. 1, n. 1, p. 117-127, 2004.

30-CASTELLANI, R. J. et al. *Oxidative Stress and Alzheimer's Disease*. [book auth.] D. Praticò and P. Mecocci. *Studies on Alzheimer's Disease*. Nova York, EUA: Springer Science, 2013.

31-LUQUE-CONTRERAS, Diana et al. Oxidative stress and metabolic syndrome: cause or consequence of Alzheimer's disease?. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2014, 2014.

32-CHRISTEN, Y. *Oxidative stress and Alzheimer disease*. Paris, França: American Society for Clinical Nutrition, 2014.

33-WANG, Xinglong et al. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, v. 1842, n. 8, p. 1240-1247, 2014.

34-TUPPO, Ehab E.; **ARIAS**, Hugo R. The role of inflammation in Alzheimer's disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, v. 37, n. 2, p. 289-305, 2005.

35-GLEESON, Michael et al. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nature Reviews Immunology*, v. 11, n. 9, p. 607-615, 2011.

36-LEEM, Yea-Hyun et al. Chronic exercise ameliorates the neuroinflammation in mice carrying NSE/htau23. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 406, n. 3, p. 359-365, 2011.

37-MORALES, Inelia et al. Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Frontiers in cellular neuroscience*, v. 8, 2014.

38-FUENTE, M. De La; **HERNANZ**, A.; **VALLEJO**, M. C. The immune system in the oxidative stress conditions of aging and hypertension: favorable effects of antioxidants and physical exercise. *Antioxidants & redox signaling*, v. 7, n. 9-10, p. 1356-1366, 2005.

39-DE LA FUENTE, Mónica; **GIMENEZ-LLORT**, Lydia. Models of aging of neuroimmunomodulation: strategies for its improvement. *Neuroimmunomodulation*, v. 17, n. 3, p. 213-216, 2010.

40-KOOLMAN, J. e **RÖHM**, K. H. *Bioquímica: texto e atlas*. 4. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, p. 416, 2013.

41-SILBERNAGL, S. e **DESPOPOULOS**, A. *Fisiologia: texto e atlas*. 7.ed., rev. Porto Alegre: Artmed, p. 298, 2009.

42-CALDAS, Jamil PS et al. Antenatal maternal corticosteroid administration and markers of oxidative stress and inflammation in umbilical cord blood from very low birth weight preterm newborn infants. *Jornal de pediatria*, v. 88, n. 1, p. 61-66, 2012.

43-FUSCO, Domenico et al. Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clinical Interventions in Aging*, v. 2, n. 3, p. 377, 2007.

44-ALARCÓN DE LA LASTRA, Catalina; **VILLEGAS**, Isabel. Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: Mechanisms and clinical implications. *Molecular nutrition & food research*, v. 49, n. 5, p. 405-430, 2005.

45-FRÉMONT, Lucie; **BELGUENDOZ**, Leila; **DELPAL**, Serge. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Life sciences*, v. 64, n. 26, p. 2511-2521, 1999.

46-PERVAIZ, Shazib. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *The FASEB journal*, v. 17, n. 14, p. 1975-1985, 2003.

47-JANG, Jung-Hee; **SURH**, Young-Joon. Protective effect of resveratrol on β -amyloid-induced oxidative PC12 cell death. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 34, n. 8, p. 1100-1110, 2003.

48-RUSSO, A. et al. Red wine micronutrients as protective agents in Alzheimer-like induced insult. *Life sciences*, v. 72, n. 21, p. 2369-2379, 2003.

49-SHARMA, Monisha; **GUPTA**, Y. K. Chronic treatment with trans resveratrol prevents intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. *Life sciences*, v. 71, n. 21, p. 2489-2498, 2002.

50-WANG, Qun et al. Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils. *Brain research*, v. 958, n. 2, p. 439-447, 2002.

51-PANGENI, Rudra et al. Resveratrol: review on therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert opinion on drug delivery*, v. 11, n. 8, p. 1285-1298, 2014.

52-TOMÉ-CARNEIRO, Joao et al. Resveratrol and clinical trials: the crossroad from in vitro studies to human evidence. *Current pharmaceutical design*, v. 19, n. 34, p. 6064, 2013.

53- VANG, Ole et al. What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *PL o S One*, 2011.

54-HOWITZ, Konrad T. et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, v. 425, n. 6954, p. 191-196, 2003.

55-BAUR, Joseph A.; **SINCLAIR**, David A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature reviews Drug discovery*, v. 5, n. 6, p. 493-506, 2006.

56-WOOD, Jason G. et al. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature*, v. 430, n. 7000, p. 686-689, 2004.

57-ANEKONDA, Thimmappa S. Resveratrol—a boon for treating Alzheimer's disease? *Brain research reviews*, v. 52, n. 2, p. 316-326, 2006.

58-MANCUSO, Cesare et al. Mitochondrial dysfunction, free radical generation and cellular stress response in neurodegenerative disorders. *Front Biosci*, v. 12, n. 1, p. 1107-1123, 2007.

59-BAUR, Joseph A. et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, v. 444, n. 7117, p. 337-342, 2006.

60-TIMMERS, Silvie et al. Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell metabolism*, v. 14, n. 5, p. 612-622, 2011.

61-BAUER, M.E.; Stress, glucocorticoids and ageing of the immune system. *Stress: The International Journal on the Biology of Stress*, v. 8, n. 1, p. 69-83, 2005.

62-ABBAS, A. K.; **LICHTMAN**, A. H. e **PILLAI**, S. *Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico*. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 31, 2014.

63-CHRISTEN, Yves. Oxidative stress and Alzheimer disease". *Disciplinary Approaches to Aging: Biology of aging*, v. 71, p. 255, 2002.

64-ANEKONDA, Thimmappa S.; **REDDY**, P. Hemachandra. Can herbs provide a new generation of drugs for treating Alzheimer's disease?. *Brain Research Reviews*, v. 50, n. 2, p. 361-376, 2005.

65-BASTIANETTO, S.; **QUIRION**, R. Natural antioxidants and neurodegenerative diseases. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, v. 9, p. 3447-3452, 2004.

66-HOWES, Melanie-Jayne R.; **HOUGHTON**, Peter J. Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 75, n. 3, p. 513-527, 2003.

67-HOWES, Melanie-Jayne R.; **PERRY**, Nicolette SL; **HOUGHTON**, Peter J. Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Phytotherapy Research*, v. 17, n. 1, p. 1-18, 2003.

68-RASKIN, Ilya et al. Plants and human health in the twenty-first century. *TRENDS in Biotechnology*, v. 20, n. 12, p. 522-531, 2002.

69-Duncan, A.M., Phipps, W.R., Kurzer, M.S., 2003. Phyto-oestrogens. *Best Pract Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 17, 253–271.

70-NIJVELDT, Robert J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American journal of clinical nutrition*, v. 74, n. 4, p. 418-425, 2001.

71-WILLIAMS, Robert J.; **SPENCER**, Jeremy PE; **RICE-EVANS**, Catherine. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 36, n. 7, p. 838-849, 2004.

72-BICALHO, Helena MS; **GONTIJO**, Cristiano M.; **NOGUEIRA-MACHADO**, J. A. A simple technique for simultaneous human leukocytes separation. *Journal of immunological methods*, v. 40, n. 1, p. 115-116, 1981.

73-OLIVEIRA, L. A. e **DIAS**, S. W. *Imunologia, imunopatologia, alergia métodos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan , p 236, 1970.

74-MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983.

75-MALAQUIAS, L.C.C.; **GOLBERG**, S.S.; **SILVA-PEREIRA**, A.A. Role of trypanossomacruzi lipopolyssacaride on human granulocyte biological activies .*Memorial Instituto Oswaldo Cruz*, v.86, p.469-480, 1991.

76-GRIESS, Peter. On a new series of bodies in which nitrogen is substituted for hydrogen. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, v. 154, p. 667-731, 1864.