UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

Expressão de microRNA circulantes em mulheres com excesso de peso suplementadas com castanha-do-brasil

BRUNA ZAVARIZE REIS

Tese para obtenção do título de DOUTOR

Orientadora: Profa. Tit. Silvia Maria Franciscato Cozzolino

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Macedo Rogero

São Paulo

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

Expressão de microRNA circulantes em mulheres com excesso de peso suplementadas com castanha-do-brasil

BRUNA ZAVARIZE REIS

Versão Original

Tese para obtenção do título de DOUTOR
Orientadora: Profa. Tit. Silvia Maria Franciscato Cozzolino
Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Macedo Rogero

São Paulo
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

R375e

REIS, Bruna Zavarize
Expressão de microRNA circulantes em mulheres com excesso de peso suplementadas com castanha-do-brasil / Bruna Zavarize REIS. - São Paulo, 2018.
113 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: COZZOLINO, Silvia Maria Franciscato
Coorientador: ROGERO, Marcelo Macedo

1. microRNA. 2. Síndrome metabólica. 3. Obesidade. 4. Castanha-do-brasil. 5. Selênio. I. T. II. COZZOLINO, Silvia Maria Franciscato, orientador. III. ROGERO, Marcelo Macedo, coorientador.

BRUNA ZAVARIZE REIS

Expressão de microRNA circulantes em mulheres com excesso de peso suplementadas com castanha-do-brasil

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do título de DOUTOR

Profa. Tit. Silvia Maria Franciscato Cozzolino
Orientadora/Presidente

_____

1º examinador

_____

2º examinador

_____

3º examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2018.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Fernando e Terezinha, e aos meus irmãos, Thiago e Fernanda, que sempre acreditaram em meus sonhos e me ajudaram a voar.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força nos momentos de fraqueza e por não deixar as angústias da vida abalarem a minha fé.

À minha família – pai, mãe e irmãos – que sempre acreditaram que eu poderia voar cada vez mais alto. E quando minhas asas perdiam a força, eles me emprestavam a deles, porque esse sonho era de todos nós.

À minha orientadora, Profa. Tit. Silvia M. F. Cozzolino, que me acolheu desde o mestrado e possibilitou a realização de um sonho. Obrigada por acreditar em mim e permitir que eu espalhe suas sementes em novos lugares.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Marcelo Macedo Rogero, por me possibilitar participar do seu grupo de pesquisa e das reuniões enriquecedoras. Obrigada por todas as oportunidades, ensinamentos e reflexões.

À Dra. Cintia Cercato e toda equipe do serviço de endocrinologia do HC-FMUSP, pela colaboração no recrutamento das participantes e por ceder um espaço em seu ambulatório para que pudéssemos realizar a nossa pesquisa.

À Dra. Ludmila Camargo, pela colaboração nas análises computacionais dos microRNA.

Ao Prof. Dr. Fernando Barbosa, pelas análises de selênio e pela atenção de sempre.

À minha parceira e amiga, Dra. Graziela Biude, por me possibilitar caminhar ao seu lado nesta longa e árdua jornada. Essa conquista só foi possível com a sua ajuda!

A Ernesto Vargas, pela amizade, pelos ensinamentos constantes e pela colaboração com nosso trabalho desde os primeiros passos.

Ao meu querido Leonardo Hoff, por todo o apoio durante essa caminhada, por me transmitir força, perseverança e tranquilidade.

A todos os amigos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, em especial: Amanda Romero, Eduardo de Carli, Mayara Miranda, Janaina Donadio, Luciana Tedesco, José Augusto, Marina Sayuri. Vocês tornaram a caminhada mais feliz e colorida. Cada encontro, cada risada e cada café compartilhado será sempre lembrado com muito carinho!

Aos colegas do Laboratório de Genômica Nutricional e Inflamação (GENUIN) por toda a amizade e parceria nesses anos. Aprendi e cresci muito com todos vocês.

Aos colegas do Laboratório de Nutrição-Minerais, inclusive os que já partiram, obrigada pela ajuda, pelos ensinamentos e pelas conversas científicas.

A todos os professores do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, por tantos ensinamentos compartilhados, por toda contribuição e colaboração com nosso trabalho e por todas as oportunidades de crescimento que me concederam.

Aos funcionários e ex-funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Edilson, Roberta, Cleonice, Mônica e Lurdinha, obrigada pela atenção e carinho de sempre.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado e à FAPESP pelo financiamento do projeto de pesquisa (processo número 2015/02906-2).

“*O dia em que nada aprendi, foi um dia não vivido.*”

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

REIS, B. Z. **Expressão de microRNA circulantes em mulheres com excesso de peso suplementadas com castanha-do-brasil.** 2018. 113f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O aumento excessivo de peso corporal acompanhado do acúmulo de gordura visceral eleva o risco de morbidade por hipertensão, diabetes *mellitus* tipo 2 e doença cardiovascular (DCV). O estresse oxidativo e a inflamação desempenham papel etiológico nestas comorbidades. Neste contexto, os microRNA (miRNA) atuam na regulação pós-transcricional no intuito de manter a homeostase celular sob condições de estresse fisiológico. A expressão de miRNA pode ser modulada por nutrientes e compostos bioativos provenientes da alimentação, atuando sobre processos inflamatórios, reduzindo o risco e/ou atenuando a progressão das DCV. A castanha-do-brasil é a maior fonte alimentar de selênio, sendo considerada um alimento com potencial função antioxidante podendo ser utilizado em pacientes com elevado risco cardiovascular. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão de microRNA circulantes em mulheres com excesso de peso antes e após o consumo da castanha-do-brasil. Para isso, foram selecionadas 72 mulheres com excesso de peso que frequentam o serviço de endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). As participantes foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos: grupo intervenção (grupo *Brazil Nut* – BN), que consumiu uma unidade de castanha-do-brasil durante 60 dias, e grupo controle (CO), que não recebeu intervenção durante o mesmo período. Ao início e ao final da intervenção foram realizadas avaliações antropométricas e coleta de sangue. Foram incluídas no estudo 54 participantes: 29 do grupo BN e 25 do grupo CO. Nenhuma das variáveis antropométricas e bioquímicas apresentou variação significativa entre os grupos durante o período de intervenção. Conforme esperado, apenas o grupo BN apresentou um aumento significativo do selênio plasmático e eritrocitário durante o período de intervenção (> 200%; $P<0{,}001$). Foram avaliados 25 miRNA plasmáticos antes e após a intervenção. Dois miRNA (miR-454-3p e miR-584-5p) apresentaram aumento significativo (*fold change* maior que 2,2; $P<0{,}05$) após a ingestão de castanha-do-brasil. A análise dos seus possíveis alvos pelo *software Ingenuity Pathway Analysis* (IPA®, Qiagen) apontou que ambos estão relacionados com a via de ativação do VDR/RXR, podendo apresentar efeitos sobre a homeostase do cálcio, regulação do crescimento e função imune. O miR-454-3p apresentou, ainda, correlação positiva com a variação do selênio plasmático ($r=0{,}432$; $P=0{,}005$) e diversos miRNA apesentaram correlação significativa com parâmetros relacionados à síndrome metabólica e à resistência à insulina. Dessa forma, podemos concluir que o consumo da castanha-do-brasil por 60 dias é capaz de modular a expressão de miRNA circulantes em mulheres com excesso de peso, particularmente do miR-454-3p e do miR-584-5p, podendo estes serem utilizados como possíveis biomarcadores de ingestão e auxiliar, ainda, no entendimento dos mecanismos pelos quais o selênio exerce seu efeito na saúde dessa população.

Palavras-chave: microRNA, síndrome metabólica, doença cardiovascular, castanha-do-brasil, selênio.

ABSTRACT

REIS, B. Z. **Expression of circulating microRNAs in overweight and obese women supplemented with Brazil nut.** 2018. 113f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Excessive body weight gain accompanied by visceral fat accumulation raises the morbidity risk due to hypertension, type 2 diabetes *mellitus* and cardiovascular disease (CVD). Oxidative stress and inflammation play etiological role in these comorbidities. In this context, microRNAs (miRNAs) act in post-transcriptional regulation in order to maintain cellular homeostasis under physiological stress. MicroRNAs expression can be modulated by nutrients and bioactive compounds from the diet, acting on inflammatory processes, reducing the risk and/or attenuating the progression of CVD. Brazil nut is the major food source of selenium, being considered a food with potential antioxidant function to be used in patients with high cardiovascular risk. Thus, the present study aimed to evaluate the expression of circulating miRNAs in overweight and obese women before and after Brazil nuts intake. Thus, we selected 72 overweight and obese women recruited at Division of Endocrinology and Metabolism from the Clinical Hospital (School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil). Participants were randomly assigned to two groups: intervention group (Brazil Nut - BN group), which consumed one Brazil nut for 60 days, and control group (CO), which received no intervention during the same period. At the baseline and at the end of the intervention were performed anthropometric assessments and blood collection. The study included 54 participants: 29 from the BN group and 25 from the CO group. None of the anthropometric and biochemical variables presented significant variation between the groups during the intervention period. As expected, only the BN group showed a significant increase in plasma and erythrocyte selenium during the intervention period (> 200%; $P<0.001$). We evaluated 25 circulating miRNAs before and after the intervention. Two miRNAs (miR-454-3p and miR-584-5p) presented a significant increase (fold change greater than 2.2; $P <0.05$) after Brazil nuts intake. The analysis of potential targets by the Ingenuity Pathway Analysis software (IPA®, Qiagen) indicated that both are related to the VDR/RXR activation pathway, and may have effects on calcium homeostasis, growth regulation and immune function. Furthermore, miR-454-3p presented a positive correlation with plasma selenium ($r = 0.432$, $P = 0.005$) and several miRNAs showed a significant correlation with parameters related to metabolic syndrome and insulin resistance. Thus, we conclude that Brazil nut inatke for 60 days is capable of modulating circulating miRNAs in overweight and obese women, particularly miR-454-3p and miR-584-5p, and these may be used as possible biomarkers of intake and help to understand the mechanisms by which selenium exerts its effect on health of this population.

Key words: microRNA, metabolic syndrome, cardiovascular disease, Brazil nut, selenium.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração dos processos iniciais de lesão endotelial e formação da placa aterosclerótica. 19

Figura 2. Biogênese do microRNA e mecanismos de liberação celular. 21

Figura 3. Estrutura de um exossomo 23

Figura 4. Concentração de selênio em castanha-do-brasil de diferentes regiões brasileiras... 26

Figura 5. Fluxograma de seleção das participantes 35

Figura 6. Expressão relativa ($2^{-\Delta Ct}$) dos microRNA no momento *baseline* nos grupos Controle e *Brazil nut* 51

Figura 7. Expressão relativa ($2^{-\Delta Ct}$) dos microRNA no momento *baseline* das participantes com (n=23) e sem (n=31) Síndrome Metabólica (SM). 55

Figura 8. Expressão relativa ($2^{-\Delta Ct}$) do miR-375 de acordo com os tercis de glicemia de todas as participantes (n=54) no momento *baseline* do estudo. 58

Figura 9. Percentual de variação (%) dos parâmetros avaliados antes e após a intervenção com castanha-do-Brasil nos grupos Controle e *Brazil nut.* 59

Figura 10. Variação (*fold change*) dos 23 microRNA circulantes analisados antes e após a intervenção com castanha-do-Brasil. 61

Figura 11. *Heat Map* e agrupamento hierárquico não supervisionado dos 23 microRNA com expressão representativa. 62

Figura 12. Principais vias canônicas potencialmente reguladas pelo miR-454-3p e pelo miR-584-5p 63

Figura 13. Representação da via canônica de ativação do VDR/RXR. 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição centesimal e concentração de selênio da castanha-do-Brasil utilizada no estudo de intervenção 38

Tabela 2. Características antropométricas e bioquímicas das participantes no momento da primeira avaliação do estudo. 46

Tabela 3. Características socioeconômicas e hábitos de vida das participantes de ambos os grupos do estudo 47

Tabela 4. Características antropométricas e bioquímicas das participantes diagnosticadas com ou sem síndrome metabólica (SM) no momento da primeira avaliação do estudo. 48

Tabela 5. Avaliação das concentrações de 25-hidroxi-vitamina D3 (25(OH)D) e do hormônio tireoestimulante (TSH) nos grupos *Brazil nut* (BN) e Controle (CO) antes (T0) e após a intervenção (T1) 65

Tabela 6. Correlação de *Spearman* entre as variações dos parâmetros bioquímicos e o *fold change* dos 23 microRNA estudados 67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Critérios do *International Diabetes Federation* para diagnóstico de Síndrome Metabólica entre mulheres.....40

Quadro 2. MicroRNA circulantes avaliados no presente estudo 42

Quadro 3. Descrição dos 25 microRNA avaliados com seus potenciais alvos moleculares...50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15

2 REVISÃO DA LITERATURA 18

3 HIPÓTESE 30

4 OBJETIVOS 32

4.1 OBJETIVO GERAL 32
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 32

5 CASUÍSTICA 34

5.1 ASPECTOS ÉTICOS 34
5.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO 34
5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO 36

6 MATERIAL E MÉTODOS 38

6.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E DE SELÊNIO NA CASTANHA-DO-BRASIL 38
6.2 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA 39
6.3 CARACTERIZAÇÃO SOCIOECONÔMICA 39
6.4 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO 39
6.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS 39
6.5.1 Parâmetros bioquímicos para avaliação de Selênio 39
6.5.2 Determinação do perfil lipídico e glicemia de jejum 40
6.5.3 Determinação da vitamina D e do hormônio tireostimulante 40
6.5.4 Diagnóstico de Síndrome Metabólica 40
6.5.5 Avaliação da resistência à insulina 41
6.6 EXPRESSÃO DE MICRORNA CIRCULANTES E PREDIÇÕES DE ALVOS 41
6.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA 43

7 RESULTADOS 46

7.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO 46
7.2 EXPRESSÃO DE MICRORNA CIRCULANTES 49
7.3 MICRORNA CIRCULANTES NA SÍNDROME METABÓLICA 54
7.4 AVALIAÇÃO DA INTERVENÇÃO COM CASTANHA-DO-BRASIL 59
7.5 EFEITO DA INTERVENÇÃO SOBRE OS MICRORNA CIRCULANTES 60
7.6 MICRORNA CIRCULANTES, SELÊNIO E SÍNDROME METABÓLICA 66

8 DISCUSSÃO 69

9 CONCLUSÕES 75

REFERÊNCIAS 77

ANEXOS 89

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A obesidade e a síndrome metabólica (SM) aumentam o risco de hipertensão, dislipidemia, diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) e doença cardiovascular (DCV), uma vez que o aumento excessivo da gordura visceral favorece a ocorrência de resistência à ação da insulina e de disfunção endotelial, as quais promovem um estado pró-aterogênico (ÖZCAN et al., 2004; MOTTILLO et al., 2010; DAWBER et al., 2015).

A fisiopatologia da síndrome metabólica é complexa e pouco compreendida, no entanto, a *International Diabetes Federation* (IDF) enfatiza a obesidade central e a resistência à ação da insulina como importantes fatores causais (IDF, 2005).

Os microRNA (miRNA) são uma classe de RNA não codificantes que geralmente estão envolvidos no silenciamento gênico pós-transcricional, induzindo a degradação do RNA mensageiro (mRNA) ou a repressão translacional por ligação a um mRNA alvo (HUNTZINGER; IZAURRALDE, 2011). Cabe destacar que um único miRNA tem a capacidade de regular centenas de mRNA, controlando ambos os processos fisiológicos e fisiopatológicos e, desse modo, constata-se que os miRNA podem influenciar o risco de doenças crônicas não transmissíveis (CLOONAN et al., 2011). Os miRNA podem ser encontrados em fluidos corporais humanos como o plasma – denominados miRNA circulantes – e alguns estudos sugerem que eles podem ser transferidos para outras células ou tecidos para exercer papel tecido-específico (GUO et al., 2010; BARILE et al., 2016). Além disso, os miRNA podem ser modulados pela alimentação e por compostos bioativos isolados, indicando que a modificação dos hábitos alimentares pode ser uma abordagem terapêutica promissora na redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis (TOMÉ-CARNEIRO et al., 2013; ORTEGA et al., 2015; QUINTANILHA et al., 2017).

As nozes são ricas em ácidos graxos insaturados, vitaminas, minerais e vários compostos bioativos, que contribuem para a redução do risco de doenças crônicas, particularmente as DCV, conforme observado em estudos epidemiológicos e de intervenção (ROS; MATAIX, 2006; IBARROLA-JURADO et al., 2013; DEL GOBBO et al., 2015). A castanha-do-brasil é reconhecida particularmente pela sua alta concentração de selênio, que é um componente essencial de várias selenoproteínas envolvidas em funções enzimáticas essenciais, como a glutationa peroxidase (GPx) (BURK, 2002; PAPP et al., 2007; CARDOSO et al., 2017).

Devido ao reconhecimento do papel das selenoproteínas na proteção do organismo contra o estresse oxidativo, o mineral selênio (Se) tem sido alvo de diversos estudos que buscam avaliar seu efeito na redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis, incluindo câncer, DCV e DM2 (NÈVE, 1996; RAYMAN, 2000). Baixas concentrações de selênio no plasma têm sido associadas ao aumento do risco de desenvolvimento de doença arterial coronariana (FLORES-MATEO et al., 2006; SCHNABEL et al., 2008; ZHANG et al., 2015).

Alguns estudos demonstraram efeitos benéficos da ingestão da castanha-do-brasil sobre o *status* de selênio, atividade da enzima GPx, estresse oxidativo e lipídios séricos entre obesos e não-obesos, mas nenhum deles avaliou o efeito da ingestão desta castanha modulando miRNA circulantes (STRUNZ et al., 2008; MARANHÃO et al., 2011; COMINETTI et al., 2012). Isso é de particular interesse, uma vez que alimentos ricos em selênio podem induzir alterações em miRNA circulantes e, consequentemente, modificar o risco de doenças crônicas não transmissíveis em mulheres obesas ou com síndrome metabólica.

Revisão da Literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. OBESIDADE, SÍNDROME METABÓLICA E DOENÇAS ASSOCIADAS

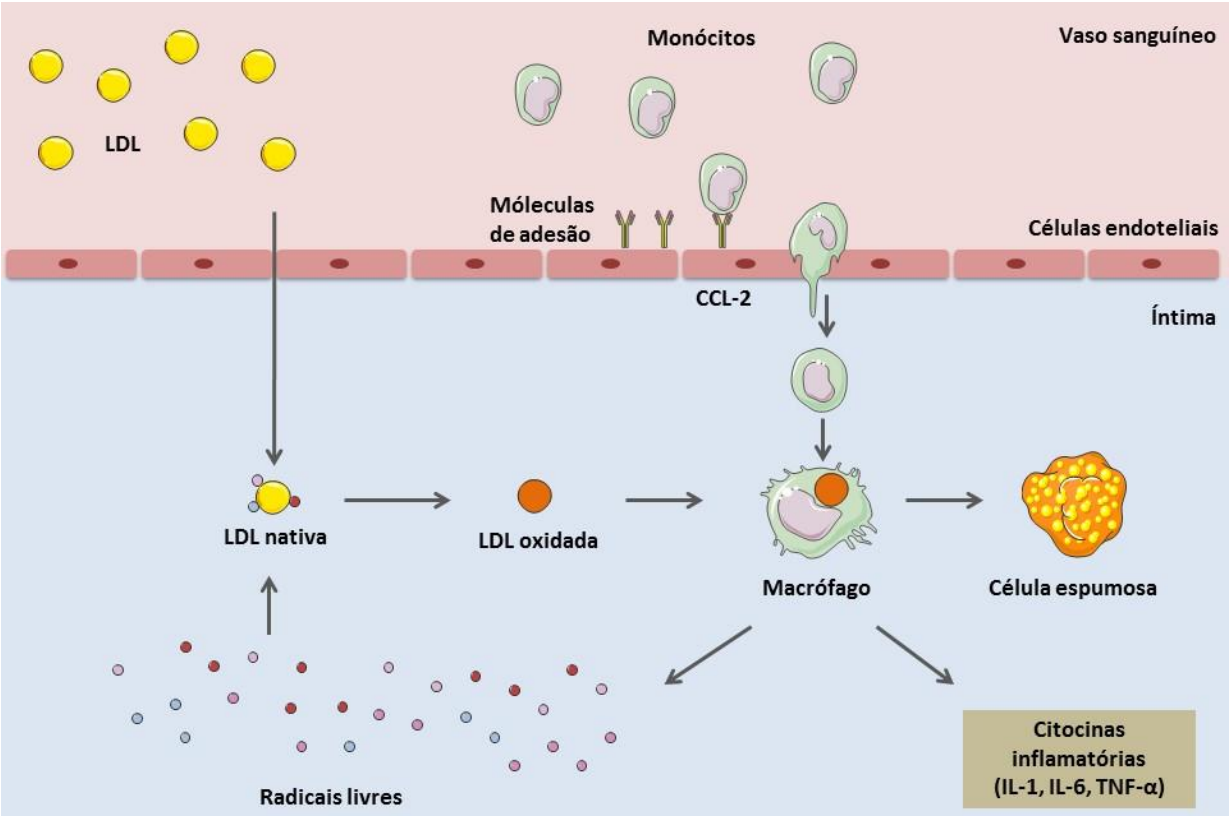
A obesidade e a síndrome metabólica (SM) compõem um conjunto de fatores de risco para doenças cardiovasculares (DCV), uma vez que são caracterizadas por diversas alterações metabólicas como resistência à ação da insulina, diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), aumento do depósito de gordura visceral, hipertensão arterial e dislipidemia aterogênica – caracterizada pela hipertrigliceridemia, diminuição do colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-c) e elevação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c) (ECKEL et al., 2005). Dessa forma, ambas as condições têm importância epidemiológica, visto que são responsáveis pelo aumento da mortalidade cardiovascular em até 2 vezes (GAMI et al., 2007; MOTTILLO et al., 2010).

O aumento do tecido adiposo visceral está associado significativamente ao maior risco de hipertensão arterial, DM2 e síndrome metabólica (FOX et al., 2007). Isso ocorre porque os adipócitos presentes nessa região são metabolicamente diferentes dos adipócitos da região subcutânea, com diferenças na inervação, regulação hormonal e maior capacidade de secreção de adipocinas. O fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e a interleucina-6 (IL-6) são importantes substâncias secretadas pelos adipócitos capazes de promover inflamação sistêmica e, juntamente com a endotelina 1, angiotensina I e II, resistina e leptina têm efeitos diversos sobre a função vascular, sendo associados à disfunção endotelial (GREENBERG; OBIN, 2006; TILG; MOSCHEN, 2006; RAUCCI et al., 2013).

As DCV podem ser amplamente classificadas em doença arterial coronariana (DAC), doença cerebrovascular e doença vascular periférica. Embora o termo se refira tecnicamente a qualquer doença que afete o sistema cardiovascular, geralmente é utilizado para se referir àquelas relacionadas com a aterosclerose, visto que a placa aterosclerótica é uma situação comum a todos esses casos (KULLER et al., 1995; RAITAKARI et al., 2003). A aterosclerose é uma doença multifatorial crônica que pode ser causada principalmente por um processo inflamatório e/ou estresse oxidativo, tendo como resultado a placa de ateroma – uma lesão focal no interior da camada íntima das artérias pequenas e médias (LIBBY et al., 2009; MANDUTEANU; SIMIONESCU, 2012).

Na fase inicial da aterosclerose, diante da disfunção endotelial, uma cascata de eventos é desencadeada pela interação entre monócitos oriundos do sangue periférico e células

endoteliais ativadas (Figura 1). Após a adesão, monócitos e linfócitos T migram entre as células endoteliais para se alojarem na camada íntima do endotélio. Essa transmigração é ativada pela presença de fatores quimioatrativos, dentre os quais destacam-se a proteína quimioatrativa de monócitos (CCL-2) e seu receptor (CCR-2), a LDL oxidada (LDL-ox), a lipoproteína(a), a interleucina-1 (IL-1) e o TNF-α (QUEHENBERGER, 2005). Posteriormente, os monócitos se diferenciam em macrófagos, bem como há aumento da síntese de receptores do tipo *scavenger* (ScR) e *toll-like* (TLR). Os ScR mediam a internalização da LDL-ox, que leva à formação da célula espumosa, enquanto a ativação da via de sinalização do TLR -4 culmina na liberação de citocinas pró-inflamatórias, proteases e moléculas vasoativas (HANSSON et al., 2006).



Legenda: LDL: lipoproteína de baixa densidade; CCL-2: proteína quimioatrativa de monócitos; IL-1: interleucina-1; IL-6: interleucina-6; TNF- α: fator de necrose tumoral alfa.
A partir da disfunção endotelial, há aumento na infiltração de partículas de LDL na íntima do endotélio vascular e da expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais. Após a adesão a estas moléculas, os monócitos migram entre as células endoteliais para se alojarem na camada íntima do endotélio, onde vão se diferenciar em macrófagos. Paralelamente, a partícula de LDL infiltrada na sua forma nativa pode interagir com os radicais livres produzidos naquela região, que irão oxidar a partícula, gerando LDL oxidada. Os macrófagos fagocitam essa partícula, formando as células espumosas (ou *foam cells*). Esse processo envolve a formação de mais radicais livres e de citocinas pró-inflamatórias, que acarretará em maior ativação celular endotelial. **Fonte:** Adaptado de HANSSON et al., 2006.

Figura 1. Ilustração dos processos iniciais de lesão endotelial e formação da placa aterosclerótica.

A partícula de LDL no seu estado nativo não é aterogênica. Ela necessita estar extensivamente modificada para servir como ligante do receptor ScR. Essas modificações envolvem a ação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, formando a LDL-ox (INSULL, 2009). Portanto, não é o acúmulo de lipídios ou o agrupamento de lipoproteínas *per se* que está envolvido na aterogênese, mas a peroxidação lipídica na parede vascular, pois esse evento levará à produção local de espécies reativas, que irão mediar o recrutamento de monócitos, a proliferação e a ativação celular endotelial (MANDUTEANU; SIMIONESCU, 2012). Nesse contexto, o estresse oxidativo e a inflamação podem desempenhar papel etiológico na fisiopatologia da aterosclerose, uma vez que a geração excessiva de espécies reativas de oxigênio parece ser o evento chave para o início e progressão da disfunção endotelial (LIBBY et al., 2009; PASTORI et al., 2014).

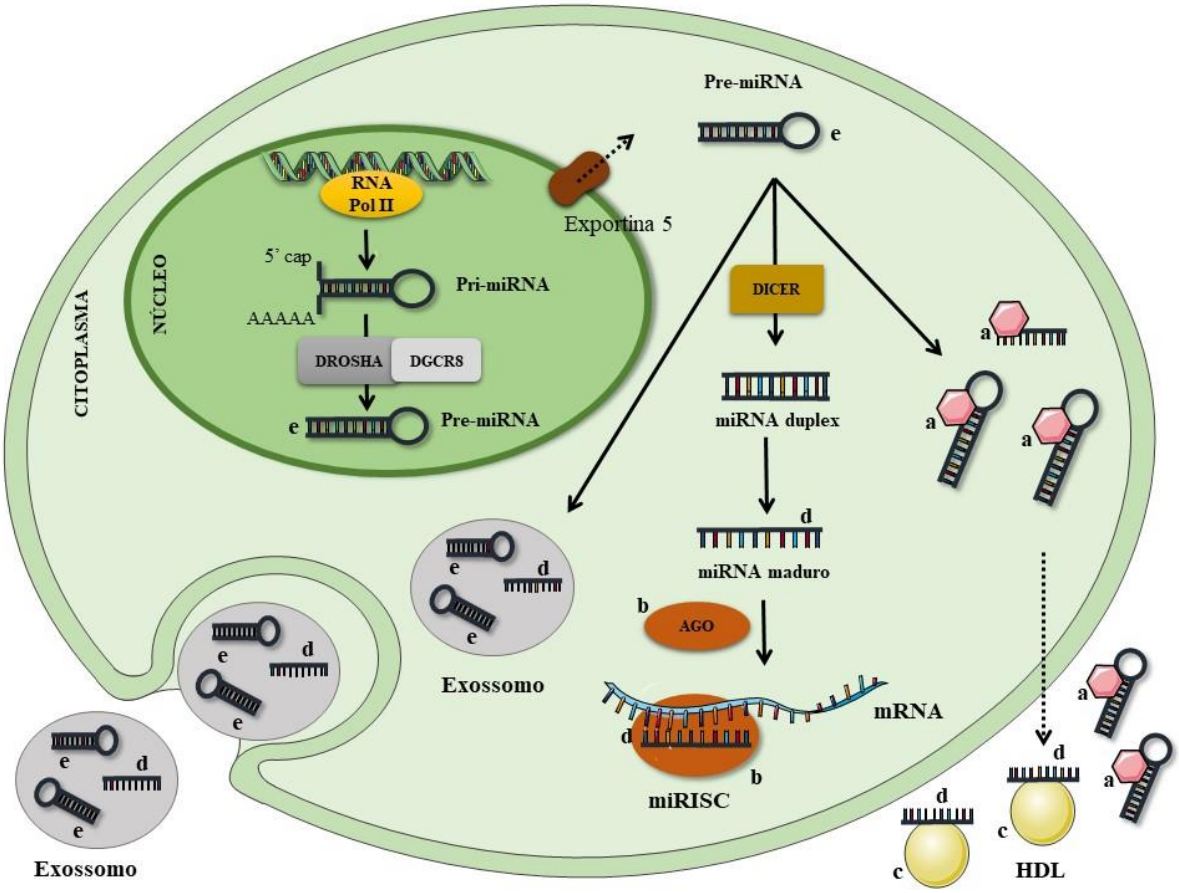
Portanto, intervenções que visem minimizar o estresse oxidativo em pacientes com elevado risco cardiovascular apresentam grande relevância clínica.

2.2. MicroRNA CIRCULANTES: BIOGÊNESE, MECANISMOS DE AÇÃO E PAPEL BIOLÓGICO

MicroRNA (miRNA) são pequenas sequências de RNA não codificantes (entre 12 e 25 nucleotídeos) que podem regular a expressão gênica, principalmente, por meio da interação com o RNA mensageiro (mRNA), podendo tanto inibir a etapa de tradução proteica quanto regular a degradação do mRNA (PAPAGEORGIOU et al., 2012). Os miRNA se ligam a regiões do mRNA causando a clivagem deste ou suprimindo a maquinaria da tradução proteica (CHEN et al., 2012).

A biogênese de um miRNA diz respeito a todos os eventos que ocorrem desde a sua transcrição gênica até a sua maturação no citoplasma da célula (Figura 2). De acordo com a via canônica de biogênese, o miRNA é transcrito a partir de um gene por meio da RNA polimerase II, que por sua vez irá gerar um transcrito longo denominado miRNA primário (pri-miRNA). Este transcrito formado apresenta-se na forma de *stem-loop* e é clivado no núcleo pelo complexo Drosha/DGCR8, que dará origem a um pré-miRNA (~70 nucleotídeos). Em seguida, o pré-miRNA é exportado para o citoplasma pela exportina-5, juntamente com seu cofator RanGTP. Já no citoplasma, o pré-miRNA é processado pela enzima Dicer e forma uma estrutura dupla fita de miRNA. Uma das fitas geradas é acoplada a proteínas da família Argonauta e

forma o complexo de silenciamento induzido por miRNA – miRISC (*microRNA Induced Silecing Complex*) (LIN; GREGORY, 2015).



O microRNA (miRNA) é transcrito pela RNA polimerase II (RNA Pol II), sendo formado inicialmente o miRNA primário (pri-miRNA), que possui estrutura de *stem-loop*, uma 7-metilguanosina (CAP) no 5' terminal e poliadenilado no 3'. O pri-miRNA é clivado pelo complexo microprocessador Drosha/DGCR8 e vira um precursor de miRNA (pré-miRNA) (letra e) com estrutura de *hairpin*. Esse precursor será transportado para o citoplasma por meio da proteína Exportina 5, onde acontecerá ação da enzima Dicer, que irá remover a estrutura *hairpin* e formar uma dupla fita de miRNA (miRNA duplex). A dupla fita irá se acoplar à proteína Argonauta (AGO) que irá selecionar a sua fita guia e formará o complexo de silenciamento induzido por miRNA (miRISC) (letra b). Esse complexo se liga a regiões do RNA mensageiro (mRNA) causando a clivagem do mesmo ou suprimindo a maquinaria da tradução proteica. Os mecanismos de liberação celular incluem o pré-miRNA (letra e) ou o miRNA maduro (letra d) associado às proteínas de ligação ao RNA (letra a), como Ago2 ou a sua ligação a lipoproteínas de alta densidade (HDL) (letra c). Além disso, o pré-miRNA ou o miRNA maduro podem ser incorporados em pequenas vesículas chamadas exossomos – vesículas extracelulares de origem endossomal considerados mediadores importantes da comunicação intercelular. **Fonte:** QUINTANILHA et al., 2017

Figura 2. Biogênese do microRNA e mecanismos de liberação celular.

A partir da dupla fita do pré-miRNA podem ser gerados dois miRNA maduros, um a partir da região 5’ e outro da 3’, possuindo funções e alvos diferentes. Para alguns miRNA, o braço 5p (traduzido a partir da região 5’) é o mais expresso, entretanto outros apresentam o braço 3p como o mais expresso. Essa diferença pode ser resultado do processo de clivagem ineficiente das enzimas Drosha e Dicer, ou mesmo por outras alterações decorrentes do processo de biogênese e maturação do miRNA, variando de acordo com o tecido, estágio do desenvolvimento e a espécie estudada (CLOONAN et al., 2011; GRIFFITHS-JONES et al., 2011).

O miRISC é composto pela proteína Argonauta (AGO) e um miRNA guia, podendo incluir também proteínas auxiliares que ampliam ou modificam sua função. Após o complexo miRISC ter sido montado, o miRNA guia irá direcioná-lo até o alvo, promovendo a regulação da expressão gênica (HUNTZINGER; IZAURRALDE, 2011).

O principal mecanismo de ação do miRNA é em nível pós-transcricional, regulando a expressão gênica por meio da inibição da tradução. Entretanto, eles podem atuar desestabilizando o transcrito-alvo ou promovendo o silenciamento gênico (HUNTZINGER; IZAURRALDE, 2011). Existe, ainda, relato da atuação dos miRNA na promoção da transcrição, por meio da sua interação direta com a região *TATA box* do gene, facilitando o recrutamento e montagem do complexo iniciador da transcrição e aumentando a atividade da região promotora do gene (ZHANG et al., 2014).

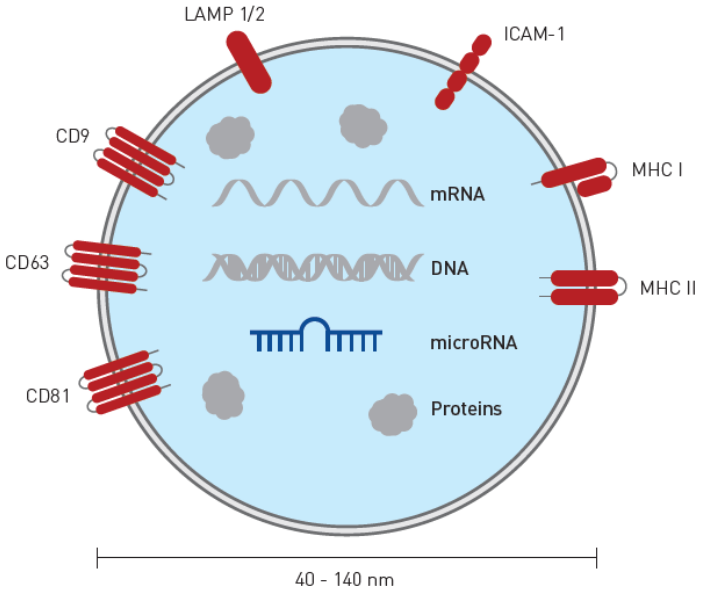
Estima-se que os miRNA regulem mais de 60% de toda expressão gênica (FRIEDMAN et al., 2009), sendo essenciais em diversas atividades biológicas, desde o crescimento e a diferenciação celular até a apoptose (BARTEL; CHEN, 2004). Nos últimos anos, tem-se investigado o envolvimento de miRNA na resposta inflamatória, na proliferação celular, no estresse oxidativo, na ativação plaquetária, na função endotelial, angiogênese e formação da placa aterosclerótica (DAI; AHMED, 2011; SMALL; OLSON, 2011; SIASOS et al., 2013).

Dessa forma, destaca-se o papel crucial dos miRNA no desenvolvimento de diversas doenças, inclusive das DCV. Recentemente, vem sendo proposto a sua utilização como biomarcador de progressão, diagnóstico e resposta ao tratamento em diversas circunstâncias (XU et al., 2012), sendo considerados de alta sensibilidade e especificidade (MARGULIES, 2009). A sua utilização como biomarcador apresenta grande potencial de estudo, uma vez que eles são secretados pelas células e transportados na circulação sanguínea, podendo ser detectados de maneira minimamente invasiva em diversos biofluidos corporais (soro/plasma, urina ou saliva), além de apresentar grande estabilidade pós-coleta, pois são resistentes a ciclos

de congelamento/descongelamento repetitivos e sofrem pouca ação de RNases (MITCHELL et al., 2008).

Os miRNA circulantes ainda possuem papel desconhecido e muito se discute sobre a sua origem – não se sabe ao certo se eles são produtos de excreção celular ou se possuem secreção programada. No entanto, existem alguns estudos que apontam funções importantes, incluindo a capacidade de modular células imunes e a capacidade de se transferirem para outras células ou órgãos e exercerem papel tecido-específico (GUO et al., 2010; BARILE et al., 2016).

Essas funções são conferidas principalmente pela presença de miRNA em vesículas como os exossomos, os quais possuem em sua membrana proteínas que permitem o reconhecimento por diversos tecidos (Figura 3). Os exossomos são vesículas de 40 a 140 nm de diâmetro envolta por uma bicamada lipídica. São compostos por proteínas, DNA, RNA mensageiro e microRNA. Além disso possuem diversas proteínas de superfície de membrana que são exclusivas de alguns exossomos tecido-específicos (VALADI et al., 2007; BARILE et al., 2016). Todas as células eucariontes parecem manter a capacidade de secretar exossomos, mas essa função foi mais caracterizada em células tumorais, inflamatórias, epiteliais, neuronais e de origem mesenquimal, inclusive células musculares e adipócitos (VALADI et al., 2007; LACHENAL et al., 2011; FERRANTE et al., 2014; BARILE et al., 2016).



CD: Grupo de diferenciação. LAMP: proteína associada a membrana lisossomal. ICAM: molécula de adesão intercelular. MHC: complexo de histocompatibilidade principal. mRNA: RNA mensageiro.

Fonte: https://www.exiqon.com/

Figura 3. Estrutura de um exossomo

Além dos exossomos, os miRNA podem circular acoplados a diversas estruturas diferentes: microvesículas, corpos apoptóticos, lipoproteínas (LDL ou HDL) e complexos ribonucleoproteicos (ligados à Argonauta) (XU et al., 2012).

No tocante ao papel biológico dos miRNA na fisiopatologia da DCV, verifica-se que o miR-145 e o miR-143 estão relacionados à proteção contra danos à parede arterial devido à regulação da proliferação e diferenciação das células musculares lisas (CORDES et al., 2009). O miR-145 encontra-se significativamente reduzido no plasma de pacientes com doença arterial coronariana, além de apresentar forte correlação com a gravidade da doença (GAO et al., 2015). Alguns miRNA, no entanto, podem estar relacionados ao agravamento da aterosclerose, como o miR-34a, que reduz a proliferação celular no endotélio em resposta ao estresse fisiológico, dificultando o reparo tecidual. Este mecanismo é mediado pela inibição da sirtuina 1 (SIRT1), um alvo direto do miR-34a, induzindo a senescência celular (ARANHA et al., 2011).

A manutenção da função endotelial pode atenuar as possíveis implicações da aterosclerose, haja visto que esse tecido está em constante exposição a estímulos fisiológicos e fisiopatológicos (HENNIG et al., 1994). Nesse contexto, os nutrientes provenientes da dieta podem agir modulando, em nível celular, processos inflamatórios, agregação plaquetária e, eventualmente, a ruptura dessas placas, prevenindo e/ou atenuando a progressão da aterosclerose (DE CATERINA et al., 2006).

Assim como a expressão de mRNA, os miRNA também podem ter sua expressão regulada por fatores ambientais e dietéticos. Diversos estudos já demonstraram que os miRNA podem ser regulados pela alimentação ou mesmo por compostos bioativos isolados (QUINTANILHA et al., 2017), apresentando resultados promissores na investigação do papel da alimentação na modulação do risco de doenças crônicas.

2.3. CASTANHA-DO-BRASIL, SELÊNIO E SEU POTENCIAL ANTIOXIDANTE

A relação entre fatores dietéticos na redução do risco de DCV tem sido bastante estudada nas últimas décadas. Uma revisão sistemática avaliou a relação de diversos fatores dietéticos com desfechos cardiovasculares e encontrou fortes associações entre o consumo de determinados alimentos e a redução do risco de DCV. Dentre os fatores dietéticos incluídos nessa categoria, destaca-se a ingestão de castanhas (MENTE et al., 2009). Isso pode estar associado ao fato de o consumo regular de oleaginosas promover a redução do colesterol total,

colesterol associado à LDL, ApoB e triacilglicerois (DEL GOBBO et al., 2015), além de o seu consumo estar associado a menor chance de desenvolver obesidade (OR: 0,61; p<0,001), síndrome metabólica (OR: 0,74; p<0,001) e DM2 (OR: 0,87; p=0,043) (IBARROLA-JURADO et al., 2013).

As castanhas compõem um grupo de frutos secos com casca rígida que inclui amêndoa, nozes, castanha de caju, nós pecan, macadâmia, pinha, pistache, avelã, amendoim e castanha-do-brasil. Também são conhecidas como oleaginosas por seu alto teor de lipídios totais variando de 46% na castanha-de-caju e pistache, até 76% na macadâmia. Por essa razão, as oleaginosas são os alimentos mais ricos em lipídios após os óleos vegetais. Em geral, possuem baixo conteúdo de ácidos graxos saturados (AGS), variando de 4 a 16%, e alto teor de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) e ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) (ROS; MATAIX, 2006). A castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*), particularmente, apresenta cerca de 25% de AGS (predominando o ácido palmítico – 15%), 34% de AGMI (predominando o ácido oleico – 33%), e 41% de AGPI (com predominância do ácido linoleico – 41%) (CARDOSO et al., 2017).

As castanhas são alimentos de alto valor nutricional além do energético, possuem minerais e vitaminas, compostos fenólicos e fitosteróis. A castanha-do-brasil, além de apresentar as características nutricionais comuns ao grupo das castanhas, possui um teor de polifenóis comparável aos alimentos com maiores teores desse componente consumidos no Brasil, como a banana e a cebola (FALLER; FIALHO, 2009). Estudos realizados em nosso laboratório encontraram uma concentração média de compostos fenólicos na forma livre de 695 mg/100 g de castanha-do-brasil, contribuindo de forma relevante para a capacidade antioxidante *in vitro* deste alimento (PIRES, 2012).

No que se refere ao teor de minerais, a castanha-do-brasil como já referido é a oleaginosa que apresenta maior concentração de selênio, elemento químico que atua como componente de selenoproteínas nas reações antioxidantes e redox, no metabolismo dos hormônios tireoidianos e na função imune (THOMSON et al., 2008).

A concentração de selênio nos alimentos varia de acordo com a sua região de cultivo, isso porque a concentração de selênio no solo reflete a sua concentração no alimento (CARDOSO et al., 2017). Recentemente, o Laboratório de Nutrição-Minerais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP realizou uma análise da concentração de selênio em castanhas adquiridas em mercados de diferentes localidades do Brasil. Apesar de não ser possível realizar o rastreamento do plantio de todas as amostras disponíveis, foi possível concluir que existe uma grande variação na concentração deste elemento nas castanhas-do-brasil analisadas. Amostras adquiridas nos mercados de São Paulo apresentaram concentrações de selênio que variaram de

5,0 a 11,6 µg/g em base seca. Por outro lado, as castanhas provenientes do Amazonas apresentaram concentrações bem superiores, variando de 29,9 a 71,5 µg de selênio/g em base seca (Figura 4) (CARDOSO et al., 2017). Esta variação regional na concentração de selênio nos alimentos já havia sido descrita anteriormente (CHANG et al., 1995; FERREIRA et al., 2002; FAVARO et al., 1997) e pode afetar o estado nutricional em relação a esse elemento da população e dos animais que vivem nestas regiões (HINTZE et al., 2001). Solos com concentrações de selênio inferior a 0,05 µg/g estão associados com dieta deficiente do mineral, enquanto solos com concentrações superiores a 5 µg de selênio/g estão associado com intoxicação por esse elemento (OLDFIELD, 1999).

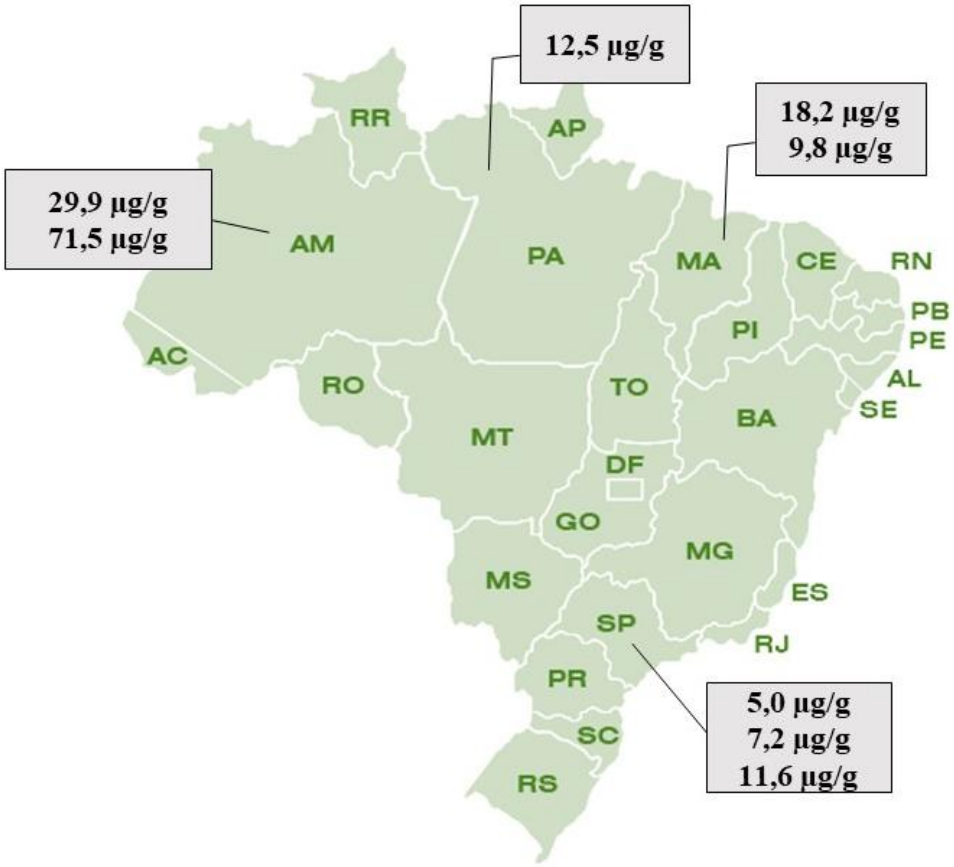


Figura 4. Concentração de selênio em castanha-do-brasil de diferentes regiões brasileiras**.** As localizações assinaladas no mapa referem-se ao local de compra do alimento. Valores expressos em µg/g em base seca. **Fonte:** CARDOSO et al., 2017.

A deficiência de selênio está associada a uma maior mortalidade por câncer coloretal, de pulmão e de próstata (BLEYS et al., 2008) e por doenças cardiovasculares (LUBOS et al., 2010). Resultados parciais do estudo Athero*Gene* (coorte europeia que acompanha pacientes com doença arterial coronariana) demonstraram que baixas concentrações de selênio plasmático (< 61 µg/dL) estão fortemente associadas à maior mortalidade em pacientes com síndrome coronariana aguda (LUBOS et al., 2010). Flores-Mateo et al. (2006) fizeram uma meta-análise de estudos com suplementação de selênio e observaram que um aumento de 50% da concentração sérica de selênio estava associado à redução de 24% no risco de doença arterial coronariana. A suplementação de selênio em pacientes com doença coronariana é capaz de melhorar a capacidade antioxidante por meio do aumento da expressão e da atividade da enzima GPx1 nas células endoteliais da parede arterial (SCHNABEL et al., 2008).

Modificações oxidativas dentro da parede arterial que podem iniciar e/ou contribuir para a aterogênese provavelmente ocorrem quando há um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes. Nesse contexto, o sistema de defesa antioxidante enzimático possui papel relevante (STOCKER; KEANEY, 2004). Alguns minerais são fundamentais para a completa eficiência desse sistema, destacando-se o selênio por meio da enzima GPx. As glutationas peroxidases estão amplamente distribuídas em tecidos animais e atuam reduzindo peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) e hidroperóxidos orgânicos livres a partir da glutationa reduzida (GSH), gerando água e álcool, respectivamente (PAPP et al., 2007).

Atualmente são conhecidos cinco membros da família das GPx que dependem do selênio para sua formação: GPx1 – a selenoproteína mais abundante em mamíferos, está presente no citosol celular, sendo considerada uma enzima eritrocitária; GPx2 – gastrintestinal, protege contra toxicidade causada por hidroperóxidos lipídicos; GPx3 – plasmática, tem expressão elevada nos rins e pode ter função antioxidante nos espaços extracelulares; GPx4 – responsável pela redução de hidroperóxidos lipídicos; GPx6 – localizada no epitélio olfatório e tecidos embrionários (PAPP et al., 2007; LABUNSKYY et al., 2014).

O papel do selênio nas DCV tem sido amplamente estudado, porém os resultados são conflitantes. Em 2006, uma meta-análise concluiu que houve uma associação inversa entre as concentrações de selênio e a incidência de DCV (FLORES-MATEO et al., 2006). Em contraste, Xun et al. (2010) não encontraram associações entre os valores de selênio avaliado na unha e biomarcadores de aterosclerose subclínica em adultos jovens americanos.

Recentemente, uma meta-análise incluiu 16 estudos prospectivos observacionais e 16 ensaios clínicos randomizados (RCT). Os autores observaram resultados diferentes para os estudos prospectivos, nos quais houve associação inversa entre o *status* de selênio e o risco de

DCV, enquanto que nos RCT o efeito foi nulo. Estes resultados indicam a importância de considerar o estado nutricional dos indivíduos relativo a este micronutriente, a dose, a forma química do selênio suplementado e o desenho do estudo na interpretação dos resultados (ZHANG et al., 2015).

Dessa forma, sugere-se que o selênio pode exercer várias funções importantes no sistema cardiovascular, principalmente devido às suas características antioxidantes. Embora o papel da suplementação de selênio de forma isolada na redução do risco de doenças cardiovasculares ainda seja inconclusivo, o uso da castanha-do-brasil como fonte de selênio tem sido bastante estudado e vem apresentando resultados promissores na melhora no *status* de selênio e na atividade da GPx (THOMSON et al., 2008; CARDOSO et al., 2015; DONADIO et al., 2018), bem como no aumento das concentrações de HDL-c e diminuição do risco aterogênico por meio da avaliação dos índices de Castelli I e II (COMINETTI et al., 2012).

A utilização de alimentos ricos em selênio como alternativa de suplementação é preferível para melhorar o estado nutricional de uma população por apresentar menor risco de toxicidade (FINLEY, 2005; THOMSON et al., 2008). Além disso, a castanha-do-brasil contém selênio na sua forma orgânica e mais biodisponível, a selenometionina (BODÓ et al., 2003; SILVA et al., 2013) representando um alimento com potencial valor nutritivo e funcional a ser utilizado em pacientes que apresentam elevado risco de DCV.

Hipótese

3. HIPÓTESE

O consumo da castanha-do-brasil modula a expressão dos microRNA circulantes em mulheres com excesso de peso e/ou síndrome metabólica.

Objetivos

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão de microRNA circulantes em mulheres com excesso de peso antes e após o consumo da castanha-do-brasil

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar microRNA circulantes diferencialmente expressos em mulheres com síndrome metabólica.
- Realizar predições computacionais das principais vias canônicas potencialmente reguladas pelos microRNA alterados após o consumo da castanha-do-brasil em mulheres com excesso de peso.

Casuística

5. CASUÍSTICA

5.1. ASPECTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa do qual se origina este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CAAE: 40506215.5.0000.0067) (ANEXO A) e registrado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBec) sob o número RBR-2nfy5q (http://www.ensaiosclinicos.gov.br/rg/RBR-2nfy5q/).

Todas as participantes que aceitaram participar da pesquisa receberam e assinaram duas vias do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) após todos os esclarecimentos sobre o estudo (ANEXO B).

5.2. DELINEAMENTO DO ESTUDO

Este estudo é do tipo prospectivo randomizado, no qual as participantes foram distribuídas aleatoriamente em um grupo que recebeu castanha-do-brasil por 60 dias ou em um grupo controle, que não consumiu a castanha durante esse mesmo tempo. A distribuição das participantes foi feita por sorteio utilizando envelopes opacos e lacrados. No momento da primeira visita cada participante escolheu aleatoriamente um envelope que definiu o seu respectivo grupo.

O tamanho da amostra foi estimado utilizando o *software* estatístico G*Power Versão 3.1.5 (FAUL et al., 2007). Foi realizado o cálculo *a priori* para comparação de médias independentes utilizando o teste *t* unicaudal, considerando uma alocação de 1:1 entre os grupos. A variável quantitativa selecionada para a estimativa do cálculo amostral foi a concentração de selênio plasmático (µg/L). Adotou-se uma probabilidade de erro alfa de 0,05 e um poder de teste de 0,95. O desvio padrão foi obtido do estudo de Cominetti et al. (2012) cujo objetivo foi avaliar o efeito do consumo de selênio sobre o risco aterogênico em mulheres obesas. A magnitude do efeito foi calculada baseada nos estudos de Thomson et al. (2008) e Cominetti et al. (2012), sendo obtido um valor de 0,9.

Dessa forma, o tamanho da amostra foi estimado em 56 participantes (considerando uma alocação de 28 indivíduos em cada grupo). Entretanto, para prevenir eventuais perdas comuns em estudos longitudinais prospectivos, recomenda-se a correção do cálculo amostral em até 30% (MIOT, 2011). Assim, a amostra final foi composta por 72 participantes (considerando

uma alocação de 36 indivíduos em cada grupo), as quais foram recrutadas nas dependências do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HC-FMUSP).

No dia da primeira coleta de sangue (T0), as participantes alocadas para o grupo castanha (grupo *Brazil nut* – BN) receberam frascos com a quantidade necessária a ser consumida durante o estudo (60 castanhas). No rótulo dos frascos estavam disponíveis as informações nutricionais, bem como as instruções corretas para o armazenamento e o consumo deste alimento. O grupo controle foi orientado a não consumir a castanha-do-brasil durante o período do estudo, bem como evitar qualquer alimento que contivesse este ingrediente na composição.

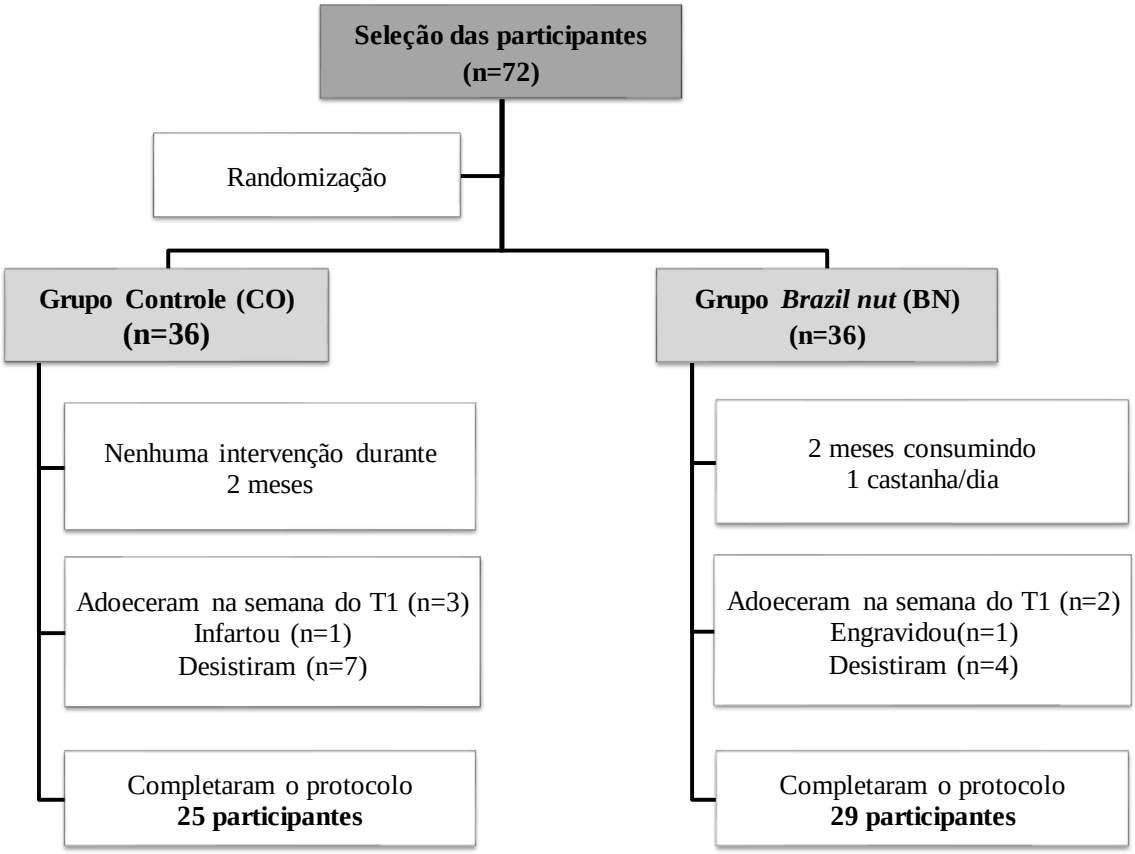


Figura 5. Fluxograma de seleção das participantes

Durante o período de suplementação, as participantes de ambos os grupos foram contatadas por telefone para o acompanhamento do seguimento, avaliação da alimentação (recordatório alimentar) e eventuais problemas com relação ao andamento da pesquisa. Ao final do período de dois meses (T1), foi realizada a segunda coleta de sangue, finalizando o protocolo

de suplementação. O fluxograma de execução de todo o protocolo experimental do macroprojeto está apresentado na Figura 5.

5.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Os critérios de inclusão desta pesquisa foram: mulheres com idade entre 19 e 55 anos e IMC $\geq$ 28,9 kg/m^2. Este valor de IMC foi estipulado tendo em vista que é o ponto de corte proposto por Stern et al. (2005) e pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2014) como forte valor preditivo da resistência à insulina.

As voluntárias não seriam incluídas na pesquisa se estivessem gestantes, se participassem de algum outro estudo clínico, se consumissem bebida alcoólica de forma abusiva, se fossem fumantes, fizessem uso de qualquer suplemento de vitaminas e minerais, realizassem atividade física intensa ou relatassem alergia alimentar a oleaginosas ou consumo regular de castanha-do-brasil. A presença de doenças como infecção recente, doenças inflamatórias e/ou reumatológicas, diabetes *mellitus* tipo 1, doenças gastrointestinais crônicas (doença inflamatória intestinal, doença celíaca etc.) e câncer também consistiram em critério de não-inclusão.

Material e Métodos

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E DE SELÊNIO NA CASTANHA-DO-BRASIL

As castanhas que foram utilizadas neste estudo foram doadas pela empresa Agropecuária Aruanã S/A (Itacotiara – AM). Os lotes das castanhas, após serem recebidos pelo Laboratório de Nutrição-Minerais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, foram mantidos na própria embalagem fornecida pelo fabricante (embalagem a vácuo protegidas da ação da luz e do ar) e imediatamente armazenados em freezer -20ºC.

Para a determinação da composição centesimal e da concentração de selênio (Se), foi retirada uma amostra aleatória de castanha de cada lote recebido. Em seguida, as castanhas foram trituradas e submetidas ao processo de liofilização para determinação da umidade da amostra. As amostras liofilizadas foram utilizadas para determinação de cinzas, lipídios e proteínas. O carboidrato foi estimado por diferença. A composição centesimal foi determinada de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (cinzas e lipídios) e da *Association of Official Analyctical Chemists* (proteínas) (AOAC, 2000).

A concentração de selênio foi determinada por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, Perkin Elmer DRC II) conforme metodologia previamente padronizada pelo Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil (BATISTA et al., 2009). Todos os dados da composição da castanha-do-brasil utilizada no presente estudo são apresentados na Tabela 1. Considerando que o peso médio de uma unidade de castanha-do-brasil é de cerca de 5 g, totalizou-se uma oferta de aproximadamente 1.176 µg de selênio ao dia.

Tabela 1. Composição centesimal e concentração de selênio da castanha-do-Brasil utilizada no estudo de intervenção

Energia e Nutrientes	Média (DP)
Energia (kcal/100 g)	706,13 (3,82)
Umidade (%)	1,65 (0,21)
Cinzas (g/100 g)	2,94 (0,08)
Carboidratos (g/100 g)	15,91 (0,65)
Proteínas (g/100 g)	15,60 (0,95)
Lipídios (g/100 g)	64,90 (1,84)
Selênio (µg/g)	235,2 (49,1)

Valores apresentados em Média (Desvio Padrão)

6.2. AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

Antes e depois da intervenção realizou-se uma avaliação da composição corporal. Foi avaliado peso, estatura e circunferências da cintura. O estado nutricional das participantes foi avaliado pelo indicador Índice de Massa Corporal – IMC (kg/m²) – e analisado segundo a classificação da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1998).

A avaliação do percentual de gordura corporal foi realizada com auxílio da impedância bioelétrica com o equipamento *Biodynamics* modelo 310e. As participantes foram orientadas a permanecerem em jejum antes da realização deste exame.

6.3. CARACTERIZAÇÃO SOCIOECONÔMICA

Foram coletados dados socioeconômicos sobre etnia, estado civil, renda familiar (número de salários mínimos) e grau de instrução, além de histórico de saúde, hábitos de vida e uso de medicamentos. Os dados foram preenchidos em formulário próprio (ANEXO C).

6.4. COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

A coleta de sangue foi realizada no próprio ambulatório do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HC-FMUSP) por um profissional de enfermagem. Amostras de 25 mL foram coletadas no período da manhã, com as participantes em jejum de 10 a 12 horas. As amostras de sangue foram destinadas às análises de selênio, perfil lipídico e expressão de microRNA.

6.5. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

6.5.1. Parâmetros bioquímicos para avaliação de Selênio

A concentração de selênio foi determinada no plasma e eritrócitos, por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, Perkin Elmer DRC II) conforme

metodologia previamente padronizada pelo Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil (BATISTA et al., 2009).

6.5.2. Determinação do perfil lipídico e glicemia de jejum

A glicemia de jejum e o perfil lipídico – colesterol total (CT), triacilglicerol (TG), colesterol associado à lipoproteína de alta densidade (HDL-c) e colesterol associado à lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) – foram determinados em um analisador bioquímico (Labmax 240), utilizando *kits* disponíveis comercialmente (Labtest®).

6.5.3. Determinação da vitamina D e do hormônio tireostimulante

Foram realizadas dosagens de 25-hidroxi-vitamina D3 (25(OH)D3) e do hormônio tireostimulante (TSH) por meio de *kits* de ELISA (Elabscience®, Texas, USA).

6.5.4. Diagnóstico de Síndrome Metabólica

O diagnóstico de Síndrome Metabólica (SM) foi realizado segundo critérios estabelecidos pelo *International Diabetes Federation* (IDF, 2005), que é definido pela presença de obesidade abdominal (circunferência da cintura ≥ 80 cm para mulheres) associada a pelo menos dois dos critérios descritos no Quadro 1.

Quadro 1. Critérios do *International Diabetes Federation* para diagnóstico de Síndrome Metabólica entre mulheres.

PARÂMETRO	PONTO DE CORTE
Triacilglicerol sérico	> 150 mg/dL (ou em uso de medicação para dislipidemia)
HDL-colesterol	< 50 mg/dL (ou em uso de medicação para dislipidemia)
Pressão arterial	≥ 130 x 85 mmHg (ou em uso de medicação hipotensora)
Glicemia de jejum	≥ 100 mg/dL (ou em uso de medicação hipoglicemiante)

FONTE: *International Diabetes Federation* (IDF, 2005).

6.5.5. Avaliação da resistência à insulina

Foi realizada a dosagem plasmática de insulina pela técnica Multiplex utilizando *kits* comerciais (Milliplex, Merck Millipore). Em seguida foi realizado o cálculo do HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment*) por meio da fórmula: (Insulina * Glicose) / 22,5, sendo a insulina expressa em μU/mL e a glicose em mmol/L.

O diagnóstico de resistência à insulina seguiu os critérios propostos pela Sociedade Brasileira de Diabetes (STERN et al., 2005; SBD, 2014), que consiste na presença de pelo menos um dos fatores abaixo:

HOMA-IR > 4,65

IMC > 28,9 kg/m²

IMC > 27,5 kg/m² e HOMA-IR > 3,60

6.6. EXPRESSÃO DE microRNA CIRCULANTES E PREDIÇÕES DE ALVOS

Foram selecionados 25 microRNA circulantes para avaliar a diferença de expressão em resposta à suplementação com castanha-do-brasil. A seleção foi baseada em um estudo piloto realizado pelo Laboratório de Genômica Nutricional e Inflamação (GENUIN), que objetivou validar miRNA circulantes no plasma. Foram analisados 752 miRNA em amostras de plasma de mulheres e verificou-se que apenas 25 apresentaram expressão significativa (P<0,05) neste tipo de biofluido. O Quadro 2 apresenta a relação dos microRNA que foram avaliados no presente estudo.

Todos os experimentos envolvendo miRNA foram conduzidos na Exiqon (Exiqon Services, Vedbaek, Dinamarca) conforme metodologia previamente validada (BLONDAL et al., 2013).

O RNA total foi extraído do plasma usando *kit* de isolamento miRCURY RNA *isolation Kit – Biofluids* (Exiqon, Vedbaek, Dinamarca) em uma placa automatizada de 96 poços. Adicionou-se uma mistura RNA *spike-in* (UniSp2, UniSp4 e UniSp5) na amostra no passo de purificação para permitir a monitorização da eficiência de extração de RNA. O RNA total purificado foi eluído em um volume final de 50 μL.

Quadro 2. MicroRNA circulantes avaliados no presente estudo

miR-200b-3p	miR-548c-5p
miR-200c-3p	miR-7-5p
miR-143-3p	miR-30a-5p
miR-145-5p	miR-193a-5p
miR-34a-3p	miR-191-5p
miR-205-5p	miR-29a-3p
miR-375	miR-505-3p
miR-10b-5p	miR-188-5p
miR-342-3p	miR-584-5p
miR-150-5p	miR-18a-5p
miR-2110	miR-486-3p
miR-33b-5p	miR-153-3p
miR-454-3p	

Realizou-se a transcrição reversa do RNA (2 µL) em reações de 10 µL usando o *kit* miRCURY LNA™ *Universal* RT microRNA PCR, *Polyadenylation and cDNA synthesis* (Exiqon). O controle de síntese de cDNA (UniSp6) foi adicionado na reação de transcrição reversa e testado para a expressão dos RNAs sintéticos. Este controle é usado para confirmar que a transcrição reversa e a amplificação ocorrem com igual eficiência em todas as amostras. Amostras com eficiência de extração reduzida, como visto pelo maior nível de UniSp2 e UniSp4 foram descartadas.

O cDNA foi diluído 50x e analisado por PCR em tempo real em reações de 10 uL, de acordo com o protocolo para o miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR. Cada microRNA foi analisado uma vez por qPCR no painel microRNA *Ready-to-Use* PCR, *Custom Pick and Mix panel* utilizando ExiLENT SYBR® Green master mix. Os controles negativos foram analisados em paralelo às amostras.

A amplificação foi realizada num sistema LightCycler® 480 Real-Time PCR (Roche) em placas de 384 poços. As curvas de amplificação foram analisadas utilizando o *software* Roche LC (Roche), tanto para determinação do valor de Ct (pelo método da 2ª derivada) quanto para análise da curva de *melting*. Os valores de Ct superiores a 37 foram excluídos.

Para controle de hemólise foram avaliados dois miRNA. Um que é expresso em glóbulos vermelhos (miRNA-451) e um que é relativamente estável no plasma e não é afetado pela hemólise (miRNA-23a). O nível do miRNA específico do eritrócito deve estar relacionado

a um miRNA que não seja afetado pela hemólise, permitindo, assim, a identificação de amostras com alto risco de hemólise e, se necessário, a eliminação da mesma. Para isso, calcula-se a diferença miR-23a − miR-451 e os resultados superiores a 7,0 são considerados com alto risco de hemólise (BLONDAL et al., 2013).

Todos os dados foram normalizados para a média dos ensaios detectados em todas as amostras. Para a normalização dos resultados, adotou-se como referência a média geométrica do let-7i-5p e do miR-30e-5p. Para o cálculo do *fold change* utilizou-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008), comparando o pós-suplementação com o *baseline* de cada participante, considerando $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{pós-suplementação}} - Ct_{\text{referência}}) - (Ct_{baseline} - Ct_{\text{referência}})$.

A busca dos principais alvos dos miRNA analisados foi realizada por meio da ferramenta *online* DIANA Web Server (http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=microT_CDS/index) utilizando a busca combinada do microRNA com os termos “vias inflamatórias” ou “resistência à insulina”, buscando filtrar para os alvos potencialmente envolvidos em ambos os contextos.

Após a identificação dos miRNA alterados com o consumo da castanha-do-brasil, foram realizadas análises computacionais das vias potencialmente reguladas pelos miRNA de interesse, utilizando o *software Ingenuity Pathway Analysis* (IPA®, Qiagen, EUA). A lista de alvos validados experimentalmente dos miRNAs diferencialmente expressos após o consumo de castanha-do-brasil foi usada para identificar as vias canônicas enriquecidas

Os alvos dos miRNA que o programa IPA fornece são derivados de diferentes bases de dados, como o DIANA-TarBase (http://diana.imis.athena-innovation.gr/) e TargetScan (http://www.targetscan.org/vert_71/), que são bases de dados *online* que catalogam diversos miRNA validados experimentalmente com suas respectivas interações gênicas.

6.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada no programa SPSS versão 18. Foram calculadas medidas de tendência central (média e mediana), proporção e dispersão (desvio-padrão e intervalo interquartil). A normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Quando os dados apresentaram distribuição normal utilizou-se o teste t de *Student* para comparação de médias entre amostras independentes (não-pareadas). Para os dados não paramétricos, utilizou-se o teste de *Mann-Whitney*. Para avaliar se havia diferença entre as prevalências descritas, realizou-se o teste qui-quadrado de Pearson (χ^2).

Para avaliar a mudança dos parâmetros ao longo do estudo, realizou-se o cálculo do percentual de variação pela fórmula: (Pós-intervenção – *Baseline*) * 100 / *Baseline*.

Para avaliação do efeito tempo e intervenção conjuntamente, realizou-se uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA *repeated measures*). Em todas as análises os resultados foram considerados significativos quando o α foi menor que 5% ($P<0,05$).

Resultados

7. RESULTADOS

7.1. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO

As variáveis antropométricas e bioquímicas das participantes que completaram o protocolo encontram-se descritas na Tabela 2, de acordo com o grupo ao qual foram alocadas no início do estudo. A média de idade das participantes foi de 39,7 ± 1,2 anos e os grupos não diferiram em nenhum dos parâmetros analisados no *baseline*, com exceção da concentração plasmática de selênio. As participantes do grupo CO apresentaram concentração de selênio plasmático significativamente menor (P<0,001) quando comparadas ao grupo BN. Entretanto, os valores de selênio eritrocitário não diferiram entre os grupos.

A prevalência da síndrome metabólica também não diferiu entre os grupos (P=0,307), totalizando 23 participantes diagnosticadas no início do estudo.

Tabela 2. Características antropométricas e bioquímicas das participantes no momento da primeira avaliação do estudo.

	Controle (n=25)	***Brazil nut* (n=29)**	***P***
Idade (anos)	41,0 (34,0 – 46,0)	39,0 (32,0 – 47,5)	0,598
IMC (kg/m²)	34,6 (31,9 – 40,5)	34,9 (31,2 – 37,5)	0,303
Gordura corporal (%)	45,1 (41,9 – 50,6)	44,9 (39,9 – 50,9)	0,388
Circunferência da cintura (cm)	97,8 (90,9 – 107,4)	100,7 (94,5 – 106,4)	0,679
Glicemia (mg/dL)	83,0 (72,3 – 90,0)	83,0 (71,0 – 98,5)	0,376[a]
Insulina (pg/mL)	269,5 (112,5 – 497,5)	279,0 (172,3 – 487,5)	0,709[a]
HOMA-IR	1,5 (0,6 – 4,0)	1,4 (1,0 – 2,4)	0,876[a]
Colesterol total (mg/dL)	195,5 (165,3 – 207,5)	171,5 (150,0 – 202,5)	0,229
LDL-c (mg/dL)	124,5 (102,5 – 144,0)	108,5 (93,0 – 132,5)	0,321
HDL-c (mg/dL)	46,0 (40,3 – 54,0)	50,5 (46,0 – 57,7)	0,087[a]
Triacilglicerol (mg/dL)	88,0 (65,8 – 119,5)	83,0 (65,3 – 129,0)	0,795[a]
Selênio plasmático (µg/L)	66,0 (59,3 – 76,9)	87,1 (78,8 – 102,4)	<0,001[a]
Selênio eritrocitário (µg/L)	125,7 (114,5 – 147,5)	125,4 (111,8 – 146,6)	0,842[a]
Síndrome Metabólica[†] (n, %)	13 (52,0)	10 (34,5)	0,307[b]

Os dados apresentados são mediana e (intervalo interquartil). [†] Para Síndrome Metabólica os valores são apresentados como número absoluto e (frequência relativa).
P-valor calculado pelo teste *t* de *Student* para amostras não pareadas.
[a] Teste Mann-Whitney
[b] Teste qui-quadrado de Pearson (χ^2)

Tabela 3. Características socioeconômicas e hábitos de vida das participantes de ambos os grupos do estudo

Variáveis	Grupo CO (n=25)		Grupo BN (n=29)		*P*
	N	%	N	%	
Estado civil					
Solteira	13	52,0	9	31,0	0,401
Casada	9	36,0	17	58,6	
Divorciada	2	8,0	2	6,9	
Viúva	1	3,4	1	3,4	
Etnia					
Branca	6	24,0	11	37,9	0,461
Negra	6	24,0	6	20,7	
Parda/Mulata	12	48,0	12	41,4	
Oriental	1	4,0	0	0,0	
Grau de instrução					
Fundamental incompleto	2	8,0	0	0,0	0,074
Fundamental completo	0	0,0	1	3,4	
Médio incompleto	1	4,0	2	6,9	
Médio completo	8	32,0	11	37,9	
Superior incompleto	4	16,0	11	37,9	
Superior completo	10	40,0	4	13,8	
Renda Familiar [a]					
> 1 SM	2	8,0	0	0,0	0,158
1 – 2 SM	3	12,0	5	17,9	
2 – 3 SM	6	24,0	9	32,1	
3 – 5 SM	8	32,0	12	42,9	
> 5 SM	6	24,0	2	7,1	
Menopausa					
Sim	3	12,0	2	6,9	0,862
Não	22	88,0	27	93,1	
Filhos					
Sim	15	60,0	24	82,8	0,119
Não	10	40,0	5	17,2	
Tabagismo					
Nunca fumou	2	8,0	6	20,7	0,180
Ex-fumante	23	92,0	23	79,3	

P-valor calculado pelo teste qui-quadrado de Pearson (χ^2)
[a] Renda familiar expressa em salários mínimos (SM): R$ 788,00 (valor vigente no momento da coleta).

As características socioeconômicas e hábitos de vida das participantes de ambos os grupos do estudo estão apresentadas na Tabela 3. Não houve diferença entre as proporções apresentadas. Observa-se que em ambos os grupos a maioria das participantes é de etnia parda ou mulata e possui pelo menos o ensino médio completo.

Visando caracterizar as participantes com Síndrome Metabólica (SM), realizamos uma comparação das variáveis antropométricas e bioquímicas entre as participantes diagnosticadas com ou sem SM no *baseline* do estudo (Tabela 4), independente do grupo ao qual foram alocadas. Observa-se que as participantes com SM eram mais velhas e apresentaram valores mais elevados de circunferência da cintura, glicemia e concentrações plasmáticas de colesterol total, LDL-c e triacilglicerol.

Tabela 4. Características antropométricas e bioquímicas das participantes diagnosticadas com ou sem síndrome metabólica (SM) no momento da primeira avaliação do estudo.

	Sem SM (n=31)	**Com SM (n=23)**	***P***
Idade (anos)	37,5 (28,8 – 45,3)	46,0 (41,0 – 50,0)	0,002
IMC (kg/m²)	34,4 (31,2 – 37,7)	34,6 (33,2 – 37,1)	0,208 [a]
Gordura corporal (%)	44,9 (39,9 – 50,9)	45,6 (42,6 – 49,5)	0,287
Circunferência da cintura (cm)	98,3 (90,7 – 102,9)	102,4 (97,8 – 109,6)	0,027
Glicemia (mg/dL)	81,5 (68,7 – 90,0)	90,0 (81,0 – 107,0)	0,001[a]
Insulina (pg/mL)	292,0 (125,8 – 500,6)	276,0 (167,0 – 639,0)	0,406[a]
HOMA-IR	1,35 (0,69 – 2,46)	1,64 (1,02 – 4,17)	0,154[a]
Colesterol total (mg/dL)	167,0 (144,3 – 193,5)	206,0 (177,0 – 217,0)	<0,001
LDL-c (mg/dL)	107,5 (92,0 – 125,0)	131,0 (106,0 – 150,0)	0,033
HDL-c (mg/dL)	50,0 (44,8 – 57,0)	48,0 (43,0 – 58,0)	0,985
Triacilglicerol (mg/dL)	78,5 (64,0 – 116,3)	118,0 (84,0 – 200,0)	0,004[a]
Selênio plasmático (µg/L)	80,9 (63,8 – 89,1)	69,5 (64,8 – 102,4)	0,621[a]
Selênio eritrocitário (µg/L)	132,6 (109,2 – 150,3)	122,0 (114,6 – 145,5)	0,630[a]

Os dados apresentados são mediana e (intervalo interquartil).
P-valor calculado pelo teste *t* de *Student* para amostras não pareadas.
[a] Teste Mann-Whitney

7.2. EXPRESSÃO DE MicroRNA CIRCULANTES

Foi avaliada a expressão de 25 microRNA. O quadro 3 apresenta a descrição dos 25 microRNA avaliados com seus potenciais alvos moleculares preditos pelo *software* DIANA, filtrados pela relevância na resposta inflamatória ou na resistência à insulina.

A Figura 6 apresenta a expressão relativa dos miRNA no início do estudo (*baseline*) nos grupos Controle e *Brazil nut*. Não houve diferença significativa em relaçao à expressão relativa dos miRNA entre os grupos no momento *baseline*.

Quadro 3. Descrição dos 25 microRNA avaliados com seus potenciais alvos moleculares.

microRNA	Potenciais alvos moleculares*
miR-200b-3p	AP-1, TLR4, PI3-K, IKK-beta, Akt-3, IRS1
miR-200c-3p	AP-1, TLR4, PI3-K, IKK-beta, Akt-3, IRS1
miR-143-3p	IL-4R, IL-18, ERK, AMPK
miR-145-5p	SP1, SMAD3, IKK- α, MAPK3
miR-34a-3p	TNF-α, JNK, AP-1
miR-205-5p	IL-1R, JNK, SMAD2
miR-375	SMAD2, SOCS4, PI3-K, IRS1, INSR
miR-10b-5p	AMPK, PI3-K
miR-342-3p	AMPK
miR-150-5p	GLP1R, PGC1, TLR5, PI3-K, Akt-3
miR-2110	ERK, GLP1R, JNK3, IL-1R, IGF-1, INSR, AMPK
miR-33b-5p	AMPK, IRS1, IRS2
miR-454-3p	IGF-1, AMPK, PGC1, STAT3, JNK3
miR-548c-5p	AMPK, JNK, IRS1, NF-κB, IL-22, IL-17
miR-7-5p	IRS1, IRS2, PI3-K
miR-30a-5p	SOCS1, SOCS3, PGC1, PI3-K, IFNGR2, IRS1, IL-1α
miR-193a-5p	IFNGR2, IL-12, TGF-beta
miR-191-5p	MAPK1, TRAF5
miR-29a-3p	TNFR1, TRAF5, IGF-1
miR-505-3p	IFN-γ
miR-188-5p	SOCS4, Akt-3
miR-584-5p	ERK, SMAD2
miR-18a-5p	TRAF5, IGF-1, SMAD2, JNK, PI3-K
miR-486-3p	Akt-2, NF-κB
miR-153-3p	IRS2, TGF-beta, PGC1, SOCS2, AMPK, IGF-1, TLR4

* Alvos preditos *in silico* filtrados pela relevância na resposta inflamatória ou na resistência à insulina (http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools)

Akt: proteína quinase B. AMPK: proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina. AP-1: proteína ativadora 1. ERK: quinase regulada pelo sinal extracelular. GLP1R: receptor do peptídeo semelhante a glucagon 1. IFN: interferon gama. IFNGR: receptor do interferon gama. IGF: fator de crescimento similar à insulina. IKK: quinase do inibidor do fator de transcrição NF-κB. IL: interleucina. INSR: receptor de insulina. IRS: substrato do receptor de insulina. JNK: c-Jun amino terminal quinase.MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno. NF-κB: fator de transcrição NF-*kappa* B. PGC1: coativador do receptor ativado por proliferadores de peroxissomos. PI3-K: fosfatidilinositol-3-quinase. SMAD: proteína transdutora de sinal. SOCS: supressor da sinalização de citocinas. SP1: fator de transcrição. STAT: transdutor de sinal e ativador de transcrição. TGF: fator de transformação do crescimento. TLR4: receptor do tipo *Toll 4*. TNF: fator de necrose tumoral. TNFR: receptor do fator de necrose tumoral. TRAF: Fator associado ao receptor de TNF.

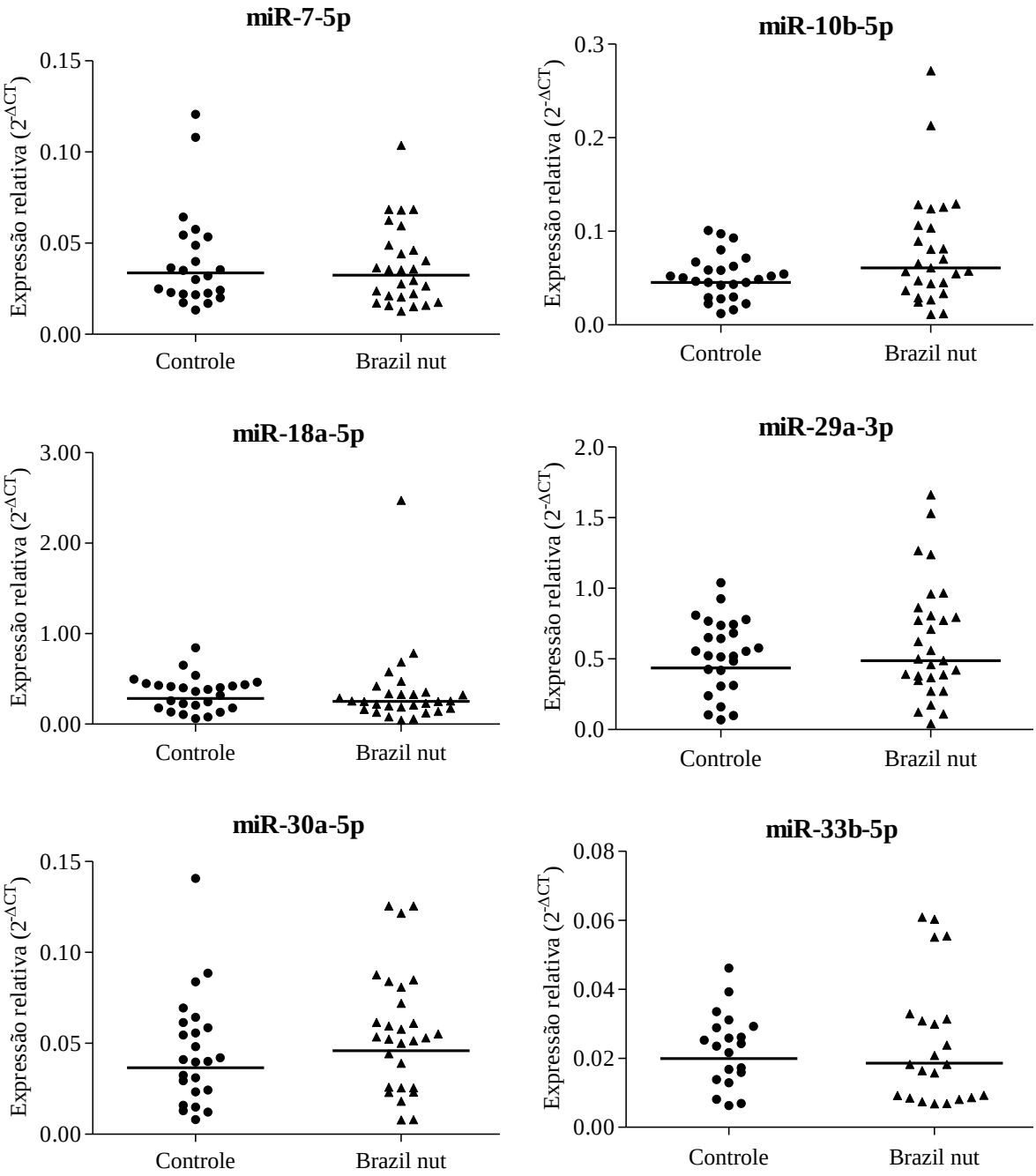


Figura 6. Expressão relativa ($2^{-\Delta Ct}$) dos microRNA no momento *baseline* nos grupos Controle e *Brazil nut*

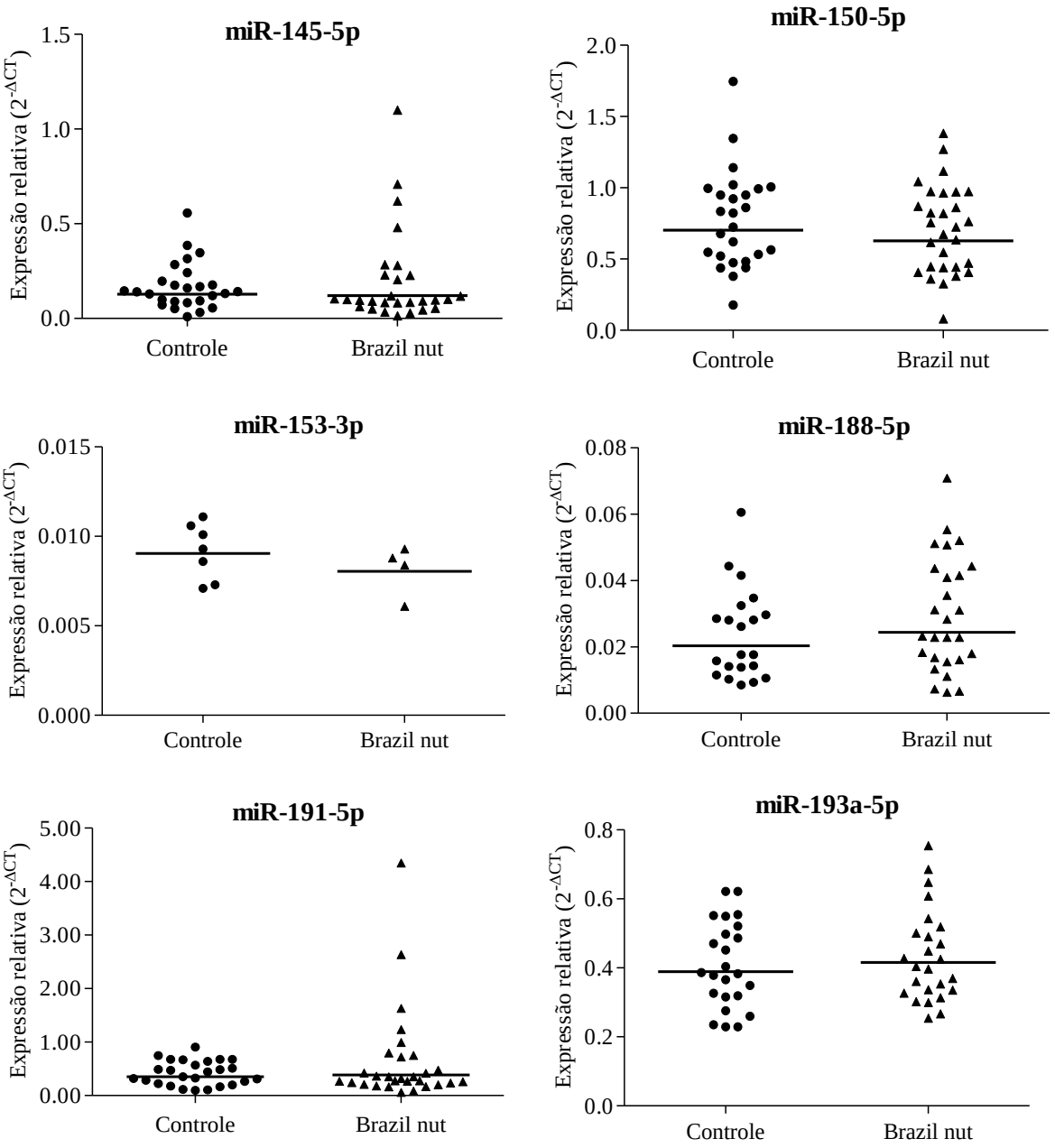


Figura 6 (continuação). Expressão relativa ($2^{-\Delta Ct}$) dos microRNA no momento *baseline* nos grupos Controle e *Brazil nut*

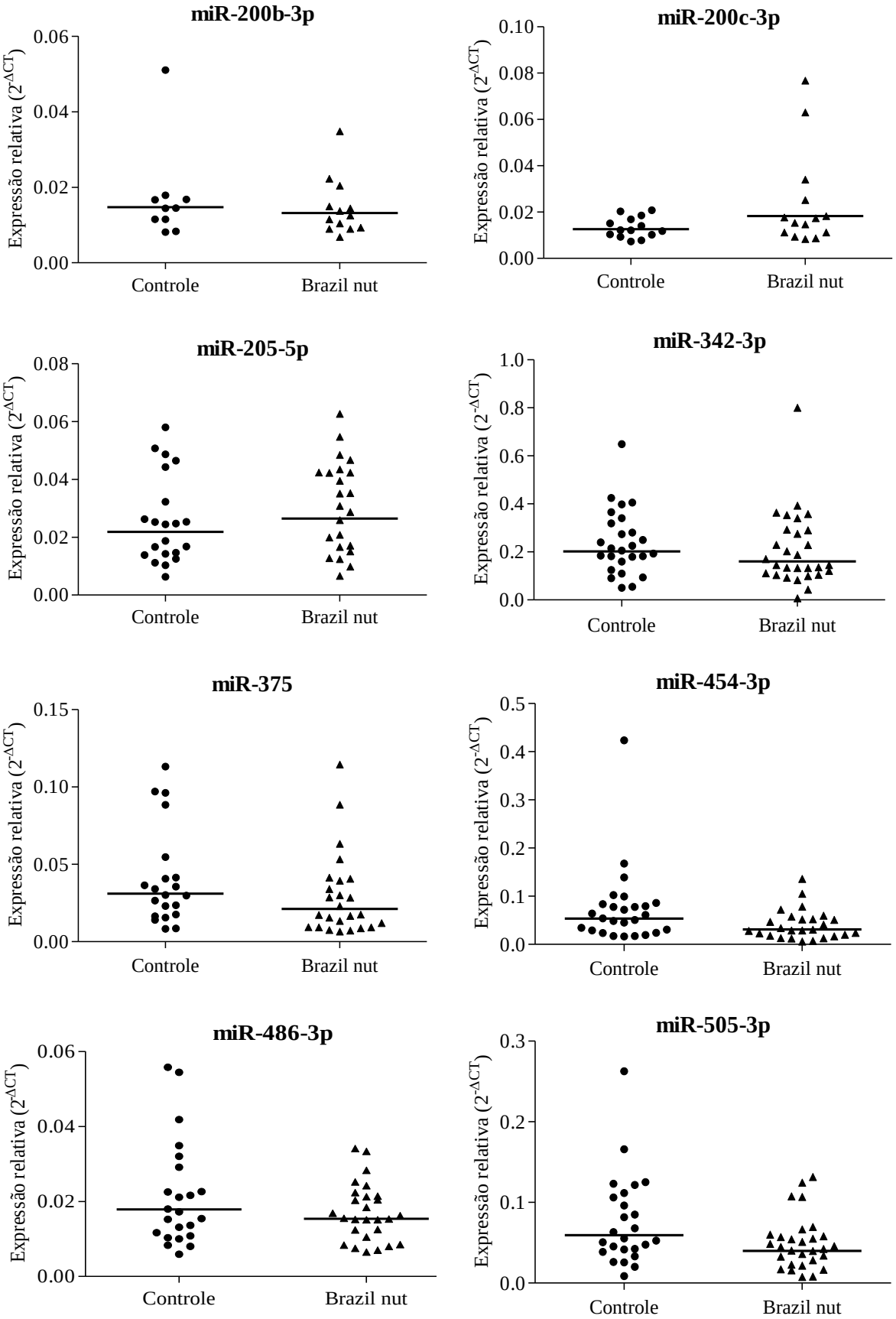


Figura 6 (continuação). Expressão relativa ($2^{-\Delta Ct}$) dos microRNA no momento *baseline* nos grupos Controle e *Brazil nut*

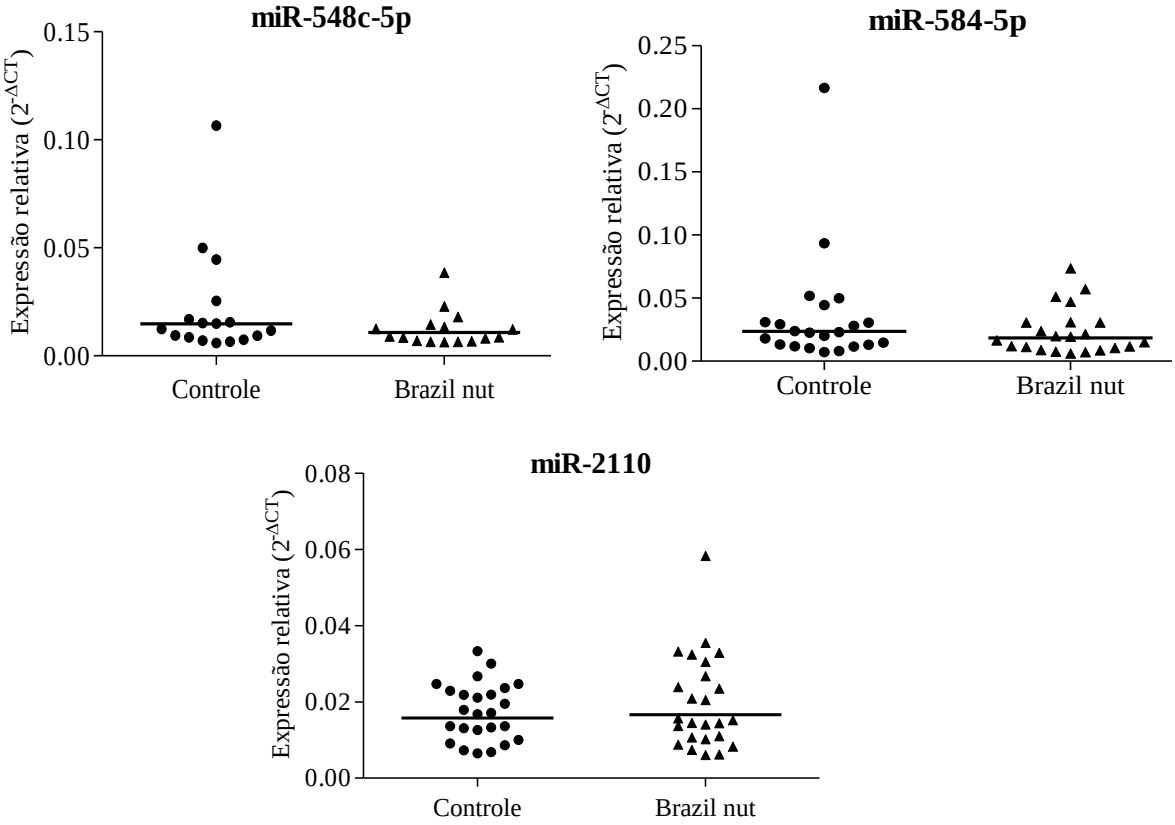


Figura 6 (continuação). Expressão relativa ($2^{-\Delta Ct}$) dos microRNA no momento *baseline* nos grupos Controle e *Brazil nut*

Dentre os 25 microRNA circulantes avaliados, dois deles (miR-153-3p e miR-34a) apresentaram expressão pouco representativa na amostra (menos de 20% dos participantes) e, desse modo não foram considerados nas avaliações subsequentes de resposta à intervenção.

7.3. MicroRNA CIRCULANTES NA SÍNDROME METABÓLICA

A fim de investigar o efeito da síndrome metabólica (SM) sobre o perfil de expressão de 25 miRNA circulantes no início do estudo, foram realizadas comparações entre as participantes com diagnóstico de SM (n=23) e as mulheres sem SM (n=31), independente do grupo ao qual cada participante pertencia (Figura 7).

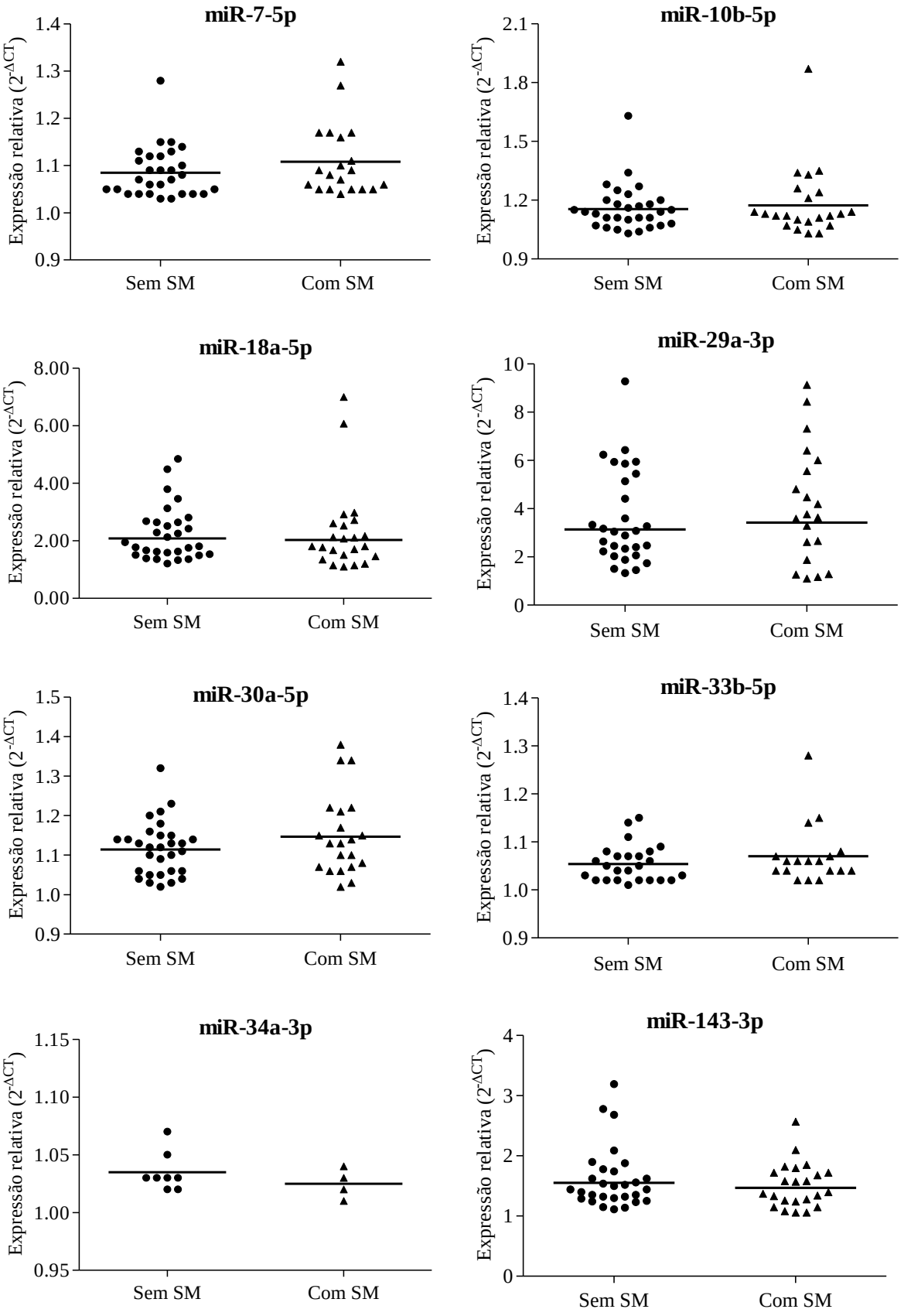


Figura 7. Expressão relativa ($2^{-\Delta Ct}$) dos microRNA no momento *baseline* das participantes com (n=23) e sem (n=31) Síndrome Metabólica (SM).
P-valor calculado pelo teste Mann-Whitney (ilustrado somente quando < 0,05).

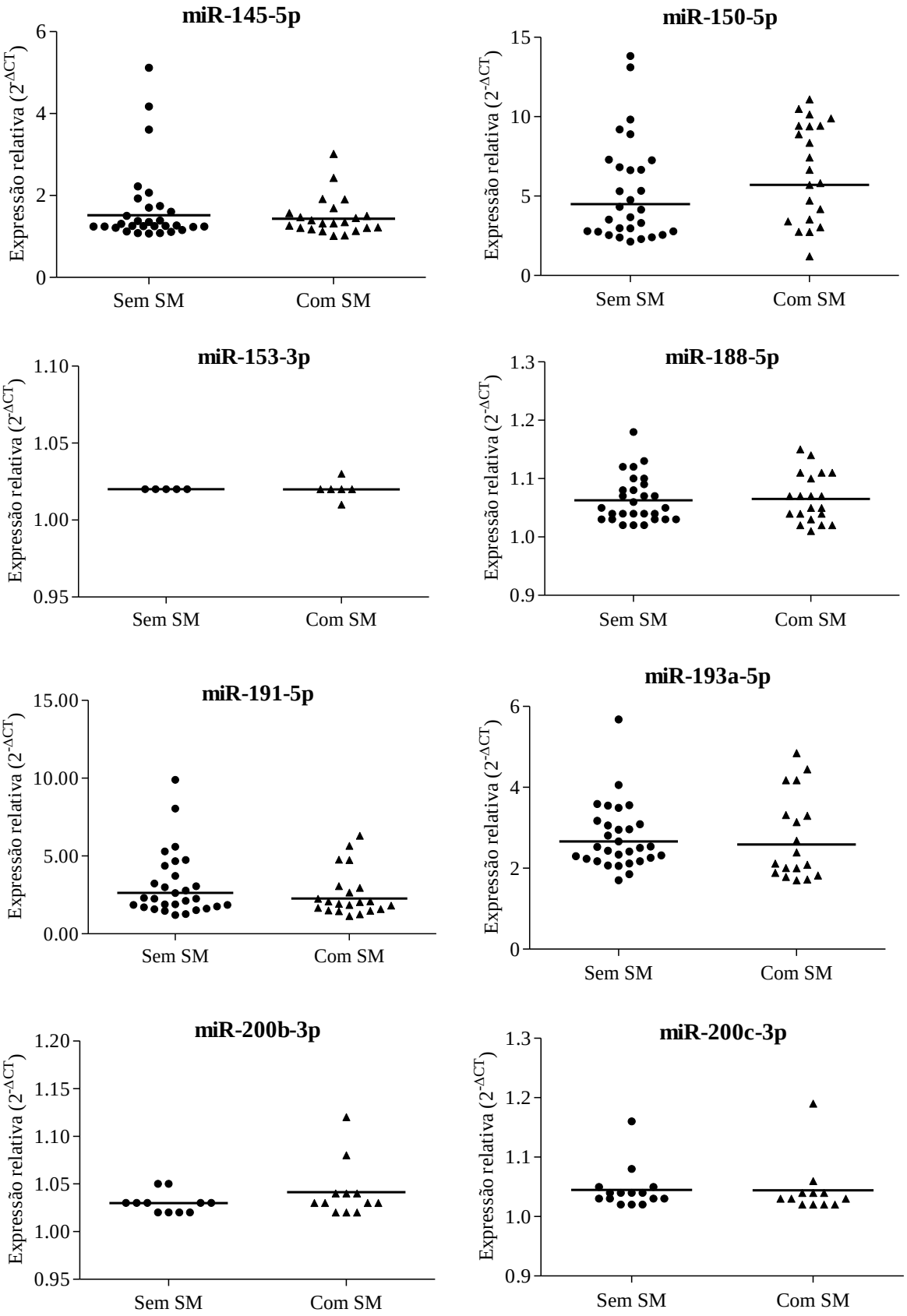


Figura 7 (continuação). Expressão relativa ($2^{-\Delta Ct}$) dos microRNA no momento *baseline* das participantes com (n=23) e sem (n=31) Síndrome Metabólica (SM).
P-valor calculado pelo teste Mann-Whitney (ilustrado somente quando < 0,05).

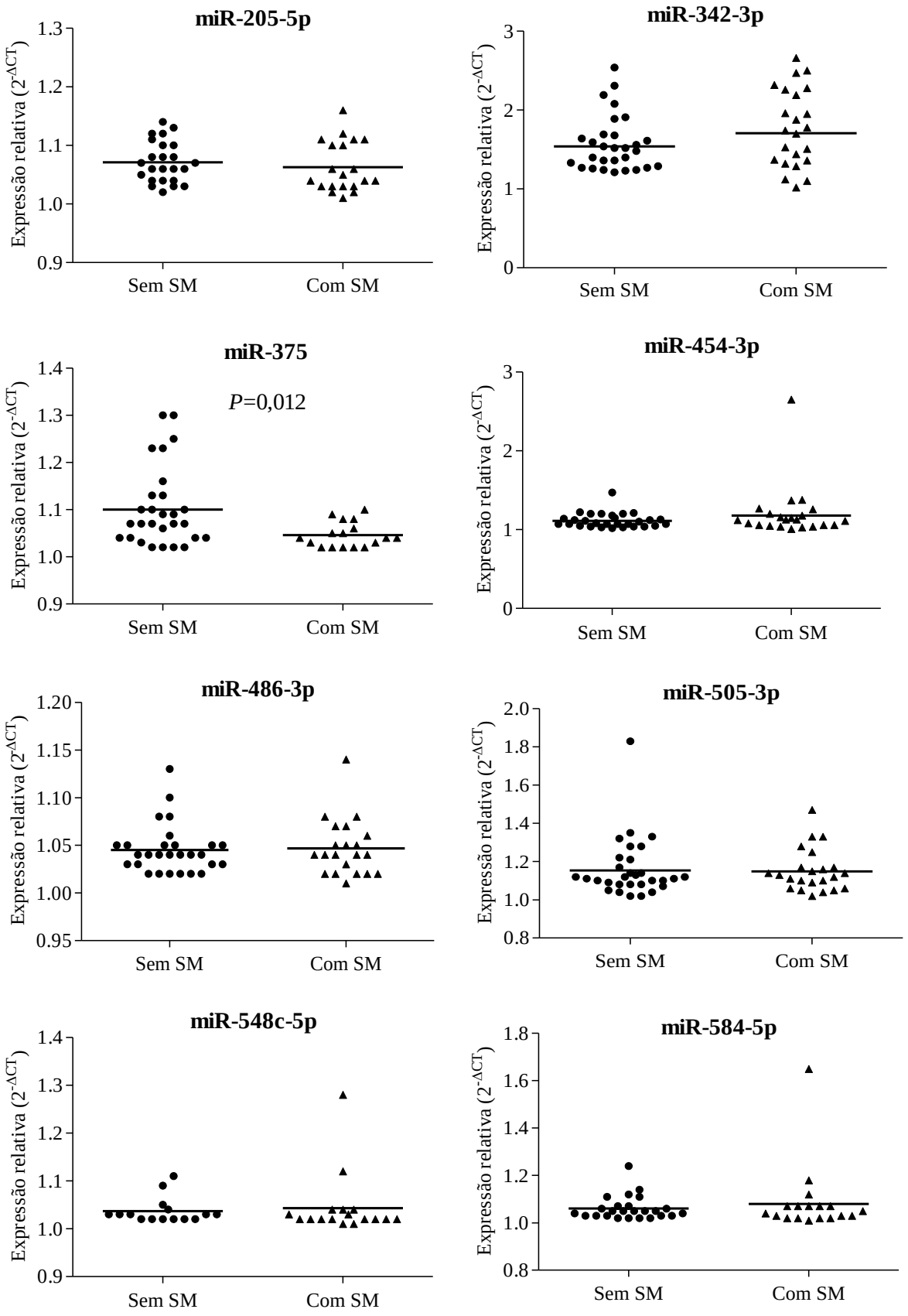


Figura 7 (continuação). Expressão relativa ($2^{-\Delta Ct}$) dos microRNA no momento *baseline* das participantes com (n=23) e sem (n=31) Síndrome Metabólica (SM).
P-valor calculado pelo teste Mann-Whitney (ilustrado somente quando < 0,05).

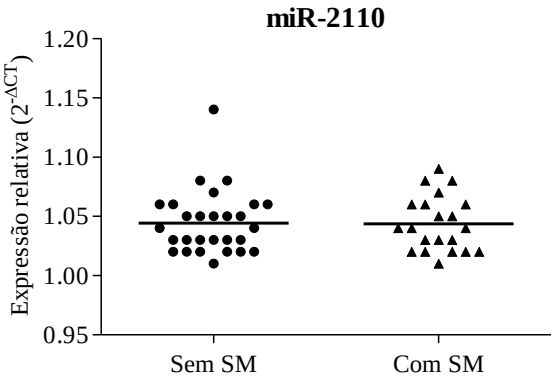


Figura 7 (continuação). Expressão relativa ($2^{-\Delta Ct}$) dos microRNA no momento *baseline* das participantes com (n=23) e sem (n=31) Síndrome Metabólica (SM).
P-valor calculado pelo teste Mann-Whitney (ilustrado somente quando < 0,05).

Observou-se que apenas o miR-375 apresentou expressão diferente entre os grupos. As participantes com SM apresentam expressão significativamente reduzida deste microRNA (P=0,012). A fim de investigar a relação deste miRNA com os componentes da SM individualizados (triacilglicerol, glicemia, HDL-c e pressão arterial) realizamos análises comparativas da expressão do miR-375 de acordo com o tercil de cada um destes parâmetros. A expressão deste miRNA apresentou significância somente quando comparada aos tercis de glicemia (Figura 8).

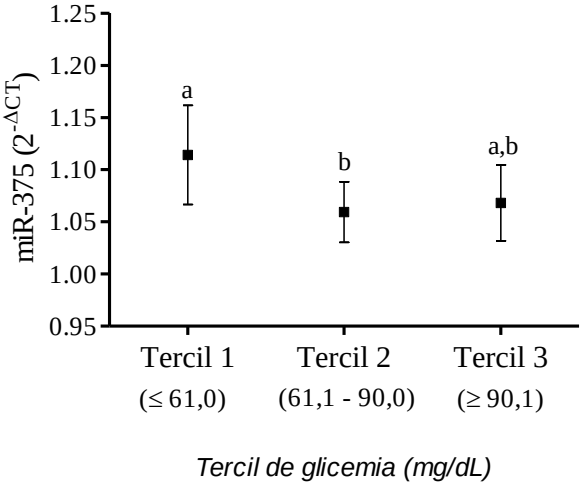
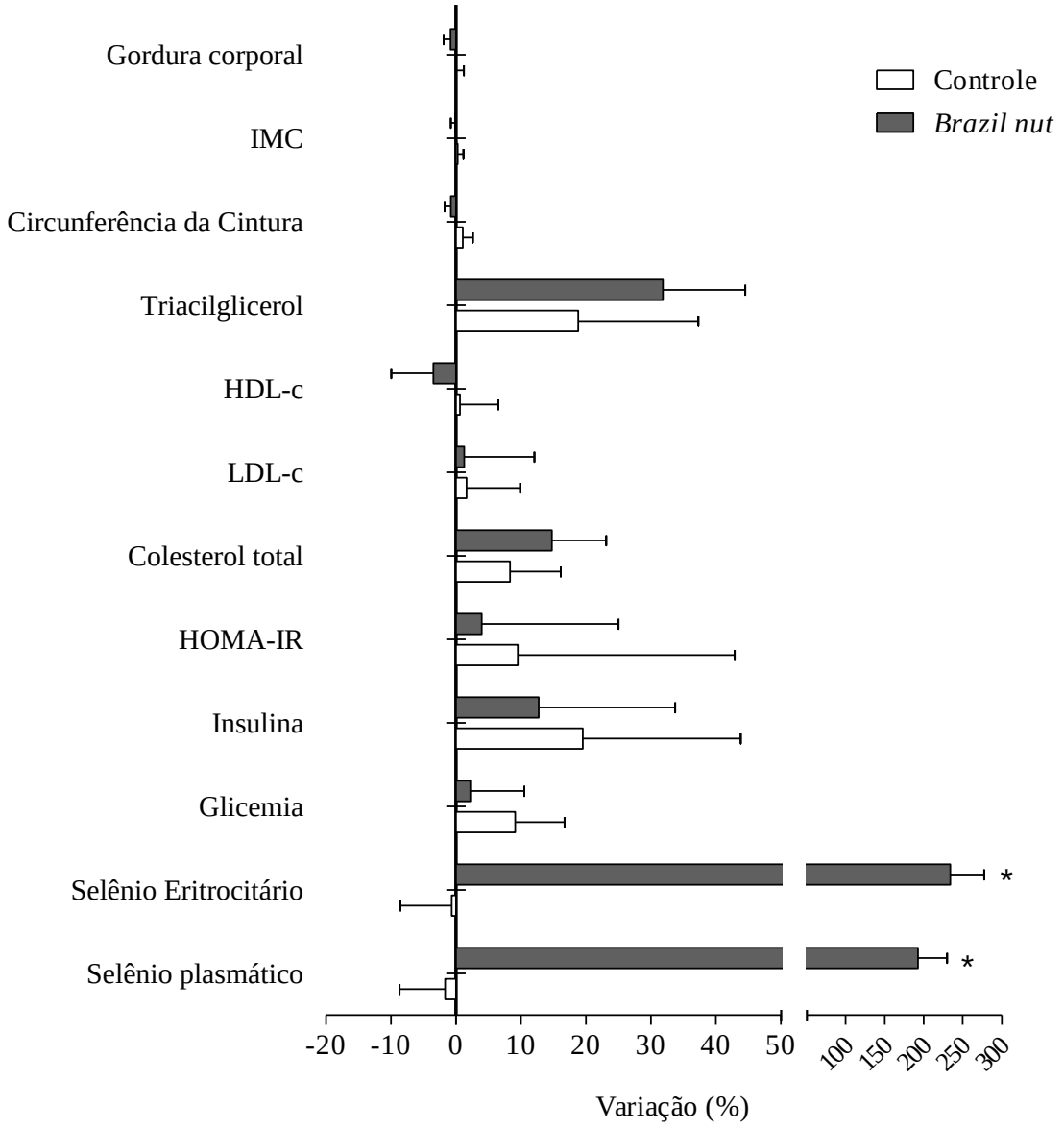


Figura 8. Expressão relativa ($2^{-\Delta Ct}$) do miR-375 de acordo com os tercis de glicemia de todas as participantes (n=54) no momento *baseline* do estudo.
Letras diferentes representam diferença significante (p<0,05 pelo teste Mann-Whitney).

7.4. AVALIAÇÃO DA INTERVENÇÃO COM CASTANHA-DO-BRASIL

Para investigar a variação dos valores relacionados aos exames bioquímicos e antropométricos ao longo do estudo, realizou-se o cálculo do percentual de variação, apresentados na Figura 9. Conforme esperado, apenas os biomarcadores do estado nutricional relativo ao selênio tiveram uma variação significativa após a intervenção. O grupo BN apresentou aumento de cerca de 200% no selênio plasmático e eritrocitário (*P*<0,001).



Valores apresentados como média e IC 95%. **P*<0,001 (Mann-Whitney).

Figura 9. Percentual de variação (%) dos parâmetros avaliados antes e após a intervenção com castanha-do-Brasil nos grupos Controle e *Brazil nut.*

7.5. EFEITO DA INTERVENÇÃO SOBRE OS MicroRNA CIRCULANTES

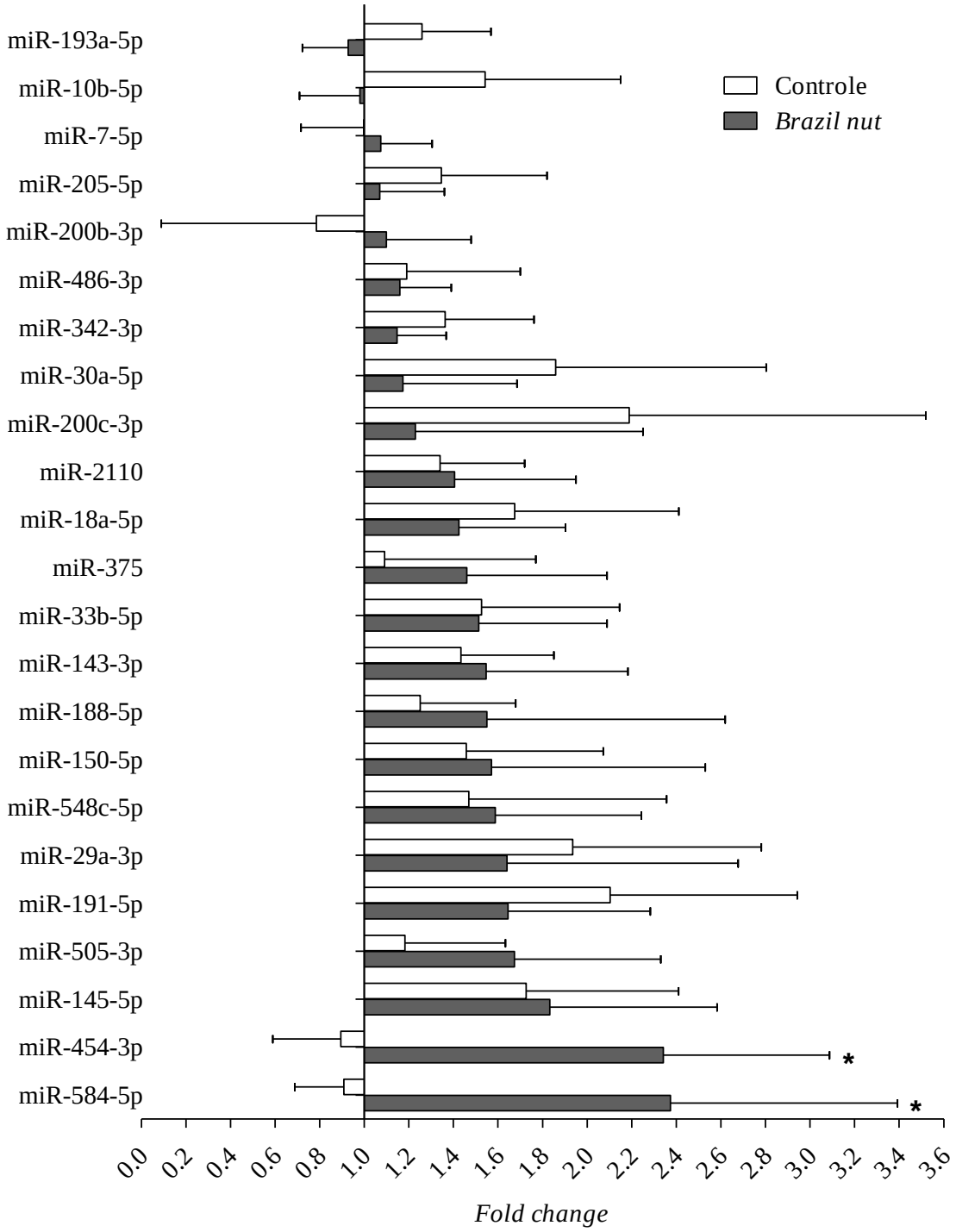
O efeito da intervenção com a castanha-do-Brasil sobre a variação (*fold change*) dos 23 microRNA circulantes com expressão representativa é apresentado na Figura 10. Dois miRNA (miR-454-3p e miR-584-5p) apresentaram aumento significativo (P <0,05) após a ingestão de castanha-do-brasil.

O *heat map* apresentado na Figura 11 mostra o resultado do agrupamento hierárquico não supervisionado dos 23 microRNA com expressão representativa. Observou-se que as amostras não se agruparam nem pelo tipo de intervenção (com ou sem castanha) nem pelo tempo da avaliação (antes ou após dois meses).

A análise dos possíveis alvos dos miRNA alterados após o consumo da castanha (miR-454-3p e miR-584-5p) pelo IPA® identificou um total de 1494 alvos, sendo 1095 alvos do miR-454-3p e 447 alvos do miR-584-5p. Filtrando para alvos altamente preditos ou que foram validados experimentalmente obteve-se um total de 313 alvos, sendo 237 alvos do miR-454-3p e 77 alvos do miR-584-5p. Filtrando para alvos que foram validados experimentalmente obteve-se um total de 9 alvos, todos relacionados ao miR-454-3p.

Os nove alvos preditos que foram previamente validados experimentalmente foram: ATG2B (*autophagy related* 2B), CSF1 (*colony stimulating factor* 1), DICER1, HOXA5 (*homeobox* A5), MAFB (MAF bZIP *transcription factor* B), MEOX2 (*mesenchyme homeobox* 2), SMAD4, TAC1 (*tachykinin precursor* 1) e ZFPM2 (*zinc finger protein*, FOG *family member* 2).

Em seguida, foram identificadas as 10 principais vias canônicas potencialmente reguladas pelos miRNA alterados durante o consumo de castanha (Figura 12). Observa-se que as três principais vias estão relacionadas à ativação do VDR/RXR (receptor de vitamina D e receptor de retinoide), à sinalização de receptores de glicocorticoides e à sinalização de FGF (fator de crescimento de fibroblastos).



Valores apresentados como média e IC 95%. *P<0,05 (Mann-Whitney).

Figura 10. Variação (*fold change*) dos 23 microRNA circulantes analisados antes e após a intervenção com castanha-do-Brasil.

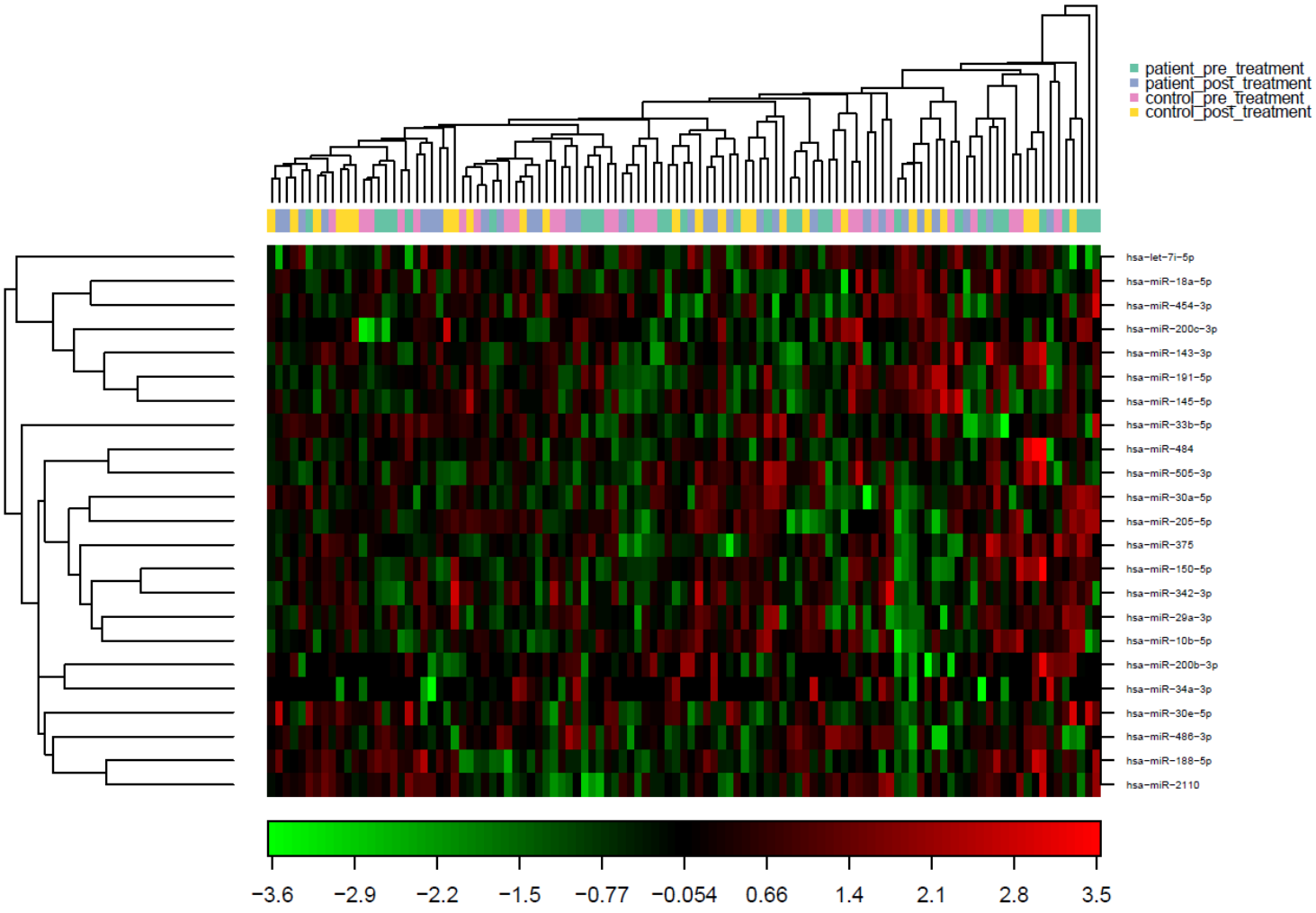


Figura 11. *Heat Map* e agrupamento hierárquico não supervisionado dos 23 microRNA com expressão representativa.
Os valores normalizados (ΔCq) foram utilizados para a análise. Cada linha representa um microRNA e cada coluna representa uma amostra. A árvore de agrupamento de microRNA é mostrada à esquerda. A escala de cores mostrada na parte inferior ilustra o nível de expressão relativa de um microRNA em todas as amostras: a cor vermelha representa um nível de expressão acima da média, a cor verde representa a expressão inferior à média.

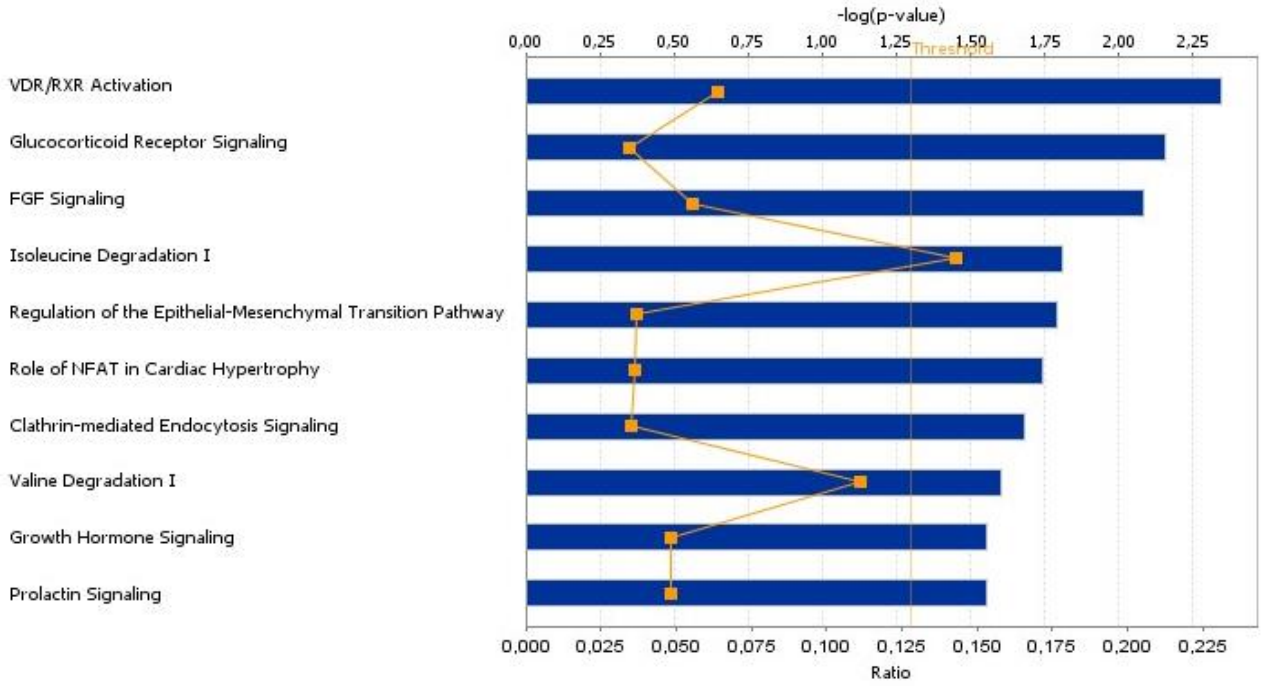


Figura 12. Principais vias canônicas potencialmente reguladas pelo miR-454-3p e pelo miR-584-5p

Após a identificação das principais vias, buscou-se investigar os alvos dos microRNA na primeira delas, referente à via de ativação do VDR/RXR.

A Figura 13 representa a via canônica de ativação do receptor heterodímero VDR/RXR (receptor de vitamina D e receptor de retinoide) com os alvos preditos do miR-454-3p e do miR-584-5p. É possível observar que o miR-454-3p possui cinco alvos potencialmente *downregulated* e o miR-584-5p possui três alvos potencialmente *downregulated* nesta via.

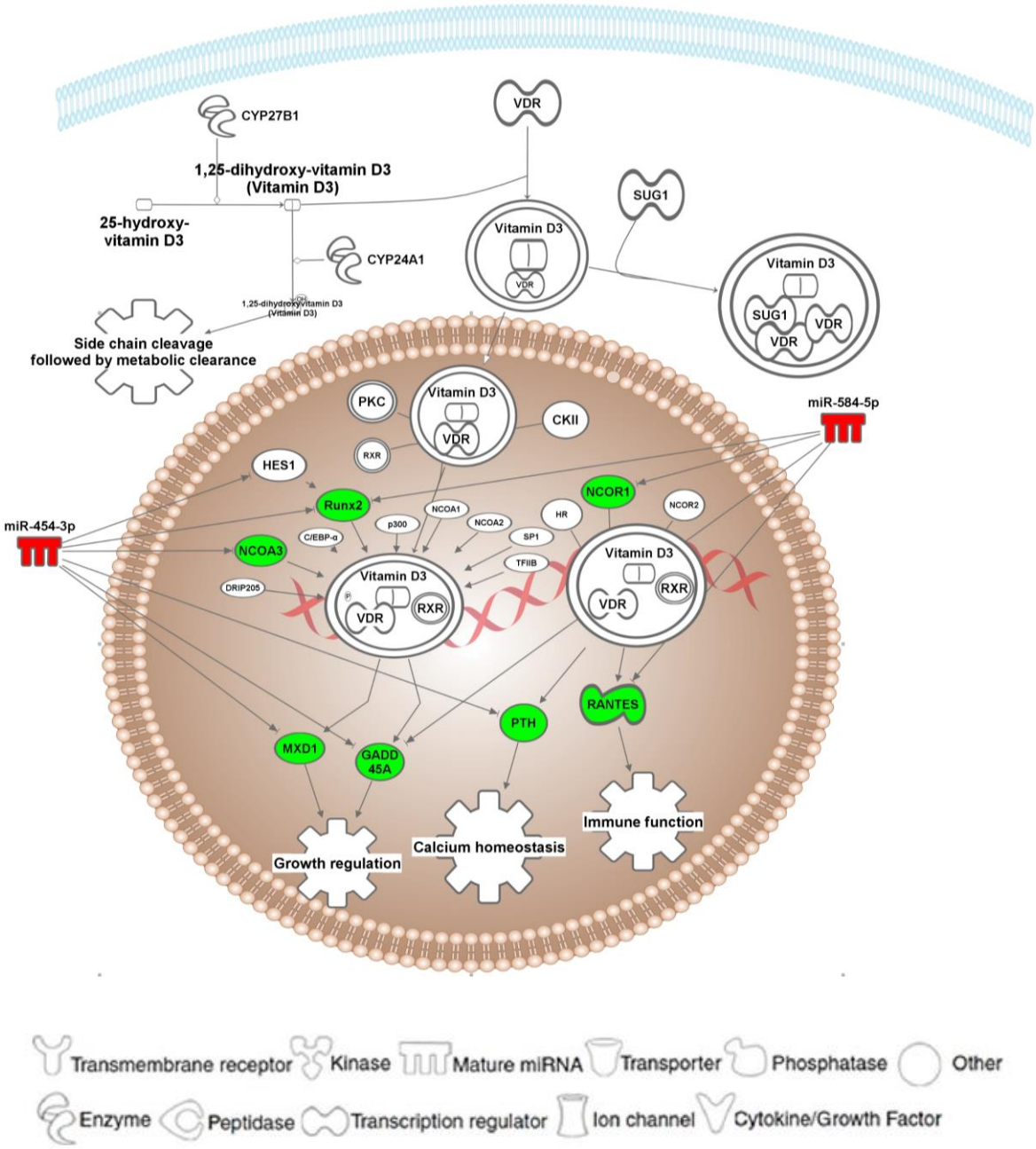


Figura 13. Representação da via canônica de ativação do VDR/RXR.
O miR-454-3p e miR-584-5p são representados na graduação de vermelho com base em seu valor de alteração de *fold change*. Os alvos dos miRNA são representados em verde, com base na previsão de sua expressão (correlação inversa com seus miRNA regulados positivamente). Os alvos do miR-454-3p são RUNX2 (*runt related transcription factor*), NCOA3 (*nuclear receptor coactivator* 3), MXD1 (MAX *dimerization protein* 1), GADD45A (*growth arrest and* DNA *damage inducible alpha*) e PTH (paratormônio). Os alvos do miR-584-5p são NCOR1 (*nuclear receptor co-repressor* 1), PTH e RANTES (C-C *motif chemokine ligand* 5).

Com base nessas observações, buscamos investigar possíveis efeitos biológicos provocados pela ingestão da castanha-do-brasil nas concentrações de 25-hidroxi-vitamina D3 (25(OH)D) – metabólito diretamente envolvido na ativação da via analisada – e do hormônio tireoestimulante (TSH) – considerando a sua ação sobre a glândula tireoide e a sua estreita relação com o *status* de selênio (Tabela 5). Não foram observadas alterações em nenhum dos parâmetros avaliados no decorrer do período de intervenção. Entretanto, observou-se que todas as participantes apresentaram deficiência de vitamina D (<20 ng/mL) em ambos os tempos do estudo (MAEDA et al., 2014).

Em relação aos valores de TSH, todas as participantes em ambos os tempos encontravam-se dentro da faixa de normalidade (0,4 – 4,5 mU/L) proposta pela Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SGARBI et al., 2013).

Tabela 5. Avaliação das concentrações de 25-hidroxi-vitamina D3 (25(OH)D) e do hormônio tireoestimulante (TSH) nos grupos *Brazil nut* (BN) e Controle (CO) antes (T0) e após a intervenção (T1)

	Brazil nut (n=29)			Controle (n=25)			*P*
	T0	T1	Δ	T0	T1	Δ	
25(OH)D (ng/mL)	10,44 (2,06)	10,84 (3,01)	-0,25	8,99 (1,19)	9,08 (1,76)	0,34	0,530
TSH (mU/L)	2,22 (0,80)	2,26 (0,77)	0,04	2,19 (0,61)	1,91 (0,68)	-0,28	0,131

Valores apresentados em Média (Desvio Padrão).
T0 = início do estudo. T1 = após 8 semanas de intervenção. Δ = T1 - T0, representa a variação média dos parâmetros avaliados após a intervenção.
P calculado pela análise de variância para medidas repetidas: avaliação do efeito tempo e intervenção (ANOVA *repeated measures*).

7.6. MicroRNA CIRCULANTES, SELÊNIO E SÍNDROME METABÓLICA

Para determinar a relação entre a variação dos miRNA circulantes com a variação do *status* de selênio e alguns parâmetros relacionados à SM e à resistência à ação da insulina (glicemia de jejum, insulina, HOMA-IR, triacilglicerol, HDL-c e colesterol total), foi realizado um teste de correlação de *Spearman* entre a variação ($\Delta_{\text{pós-tratamento - baseline}}$) de cada parâmetro bioquímico com o *fold change* de cada microRNA (Tabela 6).

Observou-se que o miR-454-3p apresentou correlação positiva com a variação de selênio plasmático (r=0,432; P=0,005), enquanto a mudança nas concentrações de selênio eritrocitário foi inversamente correlacionada com as variações no miR-191-5p (r=−0,279, P=0,041) e no miR-200c-3p (r=−0,501, P=0,034).

Em relação às variações na glicemia de jejum, observou-se correlação positiva com o *fold change* do miR-505-3p (r=0,396, P=0,003) e do miR-7-5p (r=0,361, P=0,011), enquanto o aumento na insulinemia foi correlacionado positivamente com o miR-188-5p (r=0,325, P=0,036). Além disso, mudanças no miR-143-3p refletiram alterações no índice HOMA-IR (r=0,320, P=0,023).

A variação nos valores de HDL-c (r=0,327, P=0,016) e de colesterol total (r=0,329, P=0,015) foi positivamente correlacionada ao *fold change* do miR-29a-3p. Além disso, as alterações nos valores de colesterol total também foram correlacionadas positivamente com o miR-150-5p (r=0,336, P=0,013), miR-33b-5p (r=0,323, P=0,048), miR-30a-5p (r=0,319, P=0,024) e miR-193a-5p (r=0,304, P=0,045), e inversamente correlacionadas com o miR-454-3p (r=−0,304, P=0,036) e miR-486-3p (r=− 0,363, P=0,017).

Alterações na concentração plasmática de triacilglicerol não apresentaram correlação com o *fold change* dos miRNA avaliados.

Tabela 6. Correlação de *Spearman* entre as variações dos parâmetros bioquímicos e o *fold change* dos 23 microRNA estudados

microRNA	Δ Se plasma	Δ Se eritrocitário	Δ glicemia	Δ insulina	Δ HOMA-IR	Δ TG	Δ HDL-c	Δ CT
miR-584-5p	0,335 (0,061)	0,201 (0,226)	0,070 (0,676)	-0,096 (0,571)	0,059 (0,731)	0,130 (0,435)	-0,202 (0,223)	-0,252 (0,127)
miR-454-3p	**0,432 (0,005)**	0,255 (0,080)	0,059 (0,689)	-0,075 (0,616)	0,063 (0,672)	0,050 (0,738)	-0,216 (0,140)	**-0,304 (0,036)**
miR-145-5p	0,186 (0,222)	-0,003 (0,983)	0,025 (0,859)	0,195 (0,171)	0,197 (0,165)	0,030 (0,832)	0,014 (0,919)	-0,035 (0,807)
miR-505-3p	0,162 (0,282)	0,061 (0,663)	**0,396 (0,003)**	0,042 (0,767)	0,181 (0,199)	-0,097 (0,489)	0,130 (0,353)	0,085 (0,547)
miR-191-5p	0,046 (0,757)	**-0,279 (0,041)**	0,159 (0,250)	0,081 (0,567)	0,107 (0,446)	0,110 (0,429)	0,116 (0,405)	0,212 (0,123)
miR-29a-3p	-0,063 (0,672)	-0,234 (0,089)	0,165 (0,232)	0,057 (0,684)	0,132 (0,346)	0,262 (0,056)	**0,327 (0,016)**	**0,329 (0,015)**
miR-548c-5p	0,367 (0,123)	0,127 (0,562)	0,167 (0,447)	-0,095 (0,673)	0,008 (0,970)	-0,236 (0,278)	-0,034 (0,878)	-0,205 (0,349)
miR-150-5p	0,014 (0,926)	-0,019 (0,890)	0,187 (0,176)	-0,152 (0,279)	0,042 (0,766)	0,257 (0,061)	0,138 (0,320)	**0,336 (0,013)**
miR-188-5p	-0,086 (0,609)	-0,177 (0,256)	-0,007 (0,966)	**0,325 (0,036)**	0,178 (0,261)	-0,045 (0,775)	0,000 (0,999)	-0,157 (0,316)
miR-143-3p	0,038 (0,804)	-0,229 (0,106)	0,249 (0,078)	0,257 (0,071)	**0,320 (0,023)**	-0,086 (0,551)	0,125 (0,384)	0,103 (0,473)
miR-33b-5p	-0,259 (0,153)	-0,148 (0,376)	0,303 (0,065)	0,058 (0,732)	0,158 (0,350)	0,047 (0,779)	0,120 (0,474)	**0,323 (0,048)**
miR-375	-0,064 (0,736)	0,130 (0,457)	0,001 (0,999)	0,123 (0,480)	-0,030 (0,863)	-0,316 (0,065)	0,125 (0,475)	-0,225 (0,194)
miR-18a-5p	0,086 (0,564)	-0,102 (0,462)	-0,160 (0,248)	0,016 (0,907)	-0,080 (0,567)	0,037 (0,793)	0,267 (0,051)	-0,064 (0,647)
miR-2110	0,115 (0,498)	-0,130 (0,412)	-0,014 (0,929)	0,041 (0,795)	0,088 (0,579)	0,226 (0,151)	0,007 (0,963)	0,153 (0,333)
miR-200c-3p	-0,157 (0,576)	**-0,501 (0,034)**	-0,004 (0,987)	0,154 (0,542)	0,148 (0,559)	0,072 (0,776)	-0,397 (0,103)	-0,039 (0,877)
miR-30a-5p	-0,186 (0,232)	-0,136 (0,347)	0,172 (0,233)	0,008 (0,959)	0,050 (0,731)	0,186 (0,197)	0,162 (0,262)	**0,319 (0,024)**
miR-342-3p	0,047 (0,754)	-0,165 (0,239)	0,065 (0,646)	0,188 (0,182)	0,155 (0,272)	0,265 (0,055)	0,254 (0,067)	0,183 (0,189)
miR-486-3p	0,039 (0,817)	0,095 (0,545)	-0,215 (0,165)	-0,215 (0,172)	-0,296 (0,057)	0,098 (0,530)	-0,253 (0,101)	**-0,363 (0,017)**
miR-200b-3p	0,117 (0,765)	0,110 (0,721)	-0,118 (0,700)	-0,280 (0,354)	-0,148 (0,629)	-0,082 (0,789)	-0,019 (0,950)	-0,242 (0,426)
miR-205-5p	-0,036 (0,840)	-0,061 (0,708)	0,021 (0,895)	0,143 (0,385)	0,145 (0,377)	0,122 (0,454)	-0,179 (0,268)	-0,075 (0,647)
miR-7-5p	0,075 (0,639)	-0,040 (0,787)	**0,361 (0,011)**	-0,110 (0,456)	0,048 (0,745)	0,035 (0,812)	-0,027 (0,852)	0,009 (0,950)
miR-10b-5p	-0,073 (0,638)	-0,064 (0,653)	0,163 (0,252)	-0,106 (0,462)	-0,022 (0,880)	0,204 (0,151)	-0,218 (0,125)	-0,049 (0,731)
miR-193a-5p	-0,255 (0,112)	-0,256 (0,094)	0,137 (0,377)	-0,111 (0,474)	-0,068 (0,660)	-0,020 (0,899)	0,247 (0,106)	**0,304 (0,045)**

Correlações simples foram testadas para todas as participantes (n = 54). Os resultados representam o coeficiente de correlação e o seu respectivo (valor P). Correlações significativas são mostradas em negrito. Δ = variação pós-tratamento - *baseline*. Se = selênio. TG = triacilglicerol. CT = colesterol total.

Discussão

8. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo a avaliar o efeito de um alimento com alta concentração de selênio sobre a expressão de microRNA circulantes em mulheres com excesso de peso e/ou síndrome metabólica. Considerando que o tamanho médio da castanha-do-brasil é de aproximadamente 5 g, totalizou-se uma oferta de aproximadamente 1.176,0 µg de selênio ao dia. A recomendação de ingestão de selênio para adultos (RDA) é de 55 µg/dia, e a dose na qual não se observa efeito adverso (NOAEL) é de 800 µg/dia (IOM, 2006). Uma única unidade ao dia de castanha-do-brasil ultrapassa mais de 20 vezes a RDA e já ultrapassa o valor de NOAEL, extrapolando inclusive a dose na qual algum efeito adverso já pode ser observado (LOAEL = 900 µg/dia). Apesar disso, no presente trabalho não foram observados efeitos adversos oriundos dessa intervenção. A ingestão de uma castanha-do-brasil durante 60 dias aumentou significativamente o *status* de selênio sem afetar os parâmetros relacionados à composição corporal, ao perfil lipídico e à homeostase da glicose.

Alguns estudos, contudo, apontam que concentração sérica elevada de selênio está relacionada a efeitos adversos no perfil lipídico (LACLAUSTRA et al., 2010; STRANGES et al., 2010), apresentando uma relação linear com a concentração de colesterol total e de LDL-c. A relação com a concentração sérica de triacilglicerol, entretanto, apresenta uma curva com formato em U, na qual o selênio parece ser benéfico até concentrações de 120 µg/L (LACLAUSTRA et al., 2010).

Em relação ao efeito do selênio sobre a homeostase da glicose, alguns estudos mostram que o aumento da ingestão de selênio está associado ao aumento no risco de DM2 (STRANGES et al., 2010). A suplementação desse mineral, tanto na sua forma orgânica (200 µg/d de selenometionina) (LIPPMAN et al., 2009) quanto na forma inorgânica (200 µg/d de levedura de selênio) (STRANGES et al., 2007), foi associada a uma maior incidência de DM2. Apesar desses resultados, uma meta-análise, cujo objetivo foi avaliar a associação entre a suplementação de selênio e o risco de DM2, sugeriu não haver efeito significativo dessa suplementação sobre o risco de DM2, indicando que mais estudos devem investigar essa associação (MAO et al., 2014).

Em relação ao efeito do consumo da castanha-do-brasil sobre a expressão de microRNA circulantes, observou-se aumento significativo em dois miRNA (miR-454-3p e miR-584-5p), que estão relacionados à via de ativação VDR/RXR, apresentando alvos potencialmente *downregulated* nesta via, indicando uma possível ação indireta dos miRNA em diminuir a

ativação do receptor da vitamina D. Dessa forma, esta regulação pode apresentar efeitos sobre a homeostase do cálcio, regulação do crescimento e sob a função imune.

O receptor da vitamina D (VDR) pertence à superfamília dos receptores nucleares dos fatores reguladores da transcrição dos hormônios esteroides, ácido retinoico, hormônio tireoidiano e vitamina D. Após a ligação da 1,25 dihidroxivitamina D (calcitriol) com o VDR, este interage com o receptor do ácido retinoico, formando um complexo heterodimérico (VDR-RXR) que, por sua vez, se liga a sequências específicas do DNA, conhecidas como elemento responsivo à vitamina D (VDRE) (HAUSSLER et al., 2011).

Embora seja denominada vitamina D, conceitualmente se trata de um pré-hormônio, o qual, juntamente com o paratormônio (PTH), atuam como importantes reguladores da homeostase do cálcio e do metabolismo ósseo (MAEDA et al., 2014). O VDR pode ser encontrado em quase todos os tecidos do organismo, e outras ações não relacionadas ao metabolismo ósseo têm sido imputadas a esse receptor nuclear (HAUSSLER et al., 2011).

Nossos resultados corroboram a hipótese de que o selênio parece ter relação com a homeostase óssea, como sugerido por alguns autores (MORENO-REYES et al., 2001; SUN et al., 2011; CAO et al., 2012; HOEG et al., 2012; BEUKHOF et al., 2016). O selênio, por meio de selenoproteínas, está presente no microambiente dos condrócitos, sendo considerado essencial para a regulação da reabsorção e remodelação óssea, podendo influenciar a sinalização redox intra e extracelular, a atividade de fatores de transcrição, a modificação pós-traducional de proteínas e a produção de espécies reativas de oxigênio (SUN et al., 2011; ZENG et al., 2013). Alguns estudos demonstram que a deficiência de selênio é prejudicial à microarquitetura óssea, aumentando a reabsorção óssea, possivelmente através da diminuição do potencial antioxidante desse tecido (CAO et al., 2012; PIETSCHMANN et al., 2014).

Um estudo de base populacional realizado em cinco cidades europeias com mulheres saudáveis na pós-menopausa observou que a concentração sérica de selênio foi associada positivamente com a vitamina D (β=0,110; P<0,001) e inversamente relacionada com a concentração do PTH (β= -0,125; P<0,001), além de apresentar associação positiva com a densidade mineral óssea (β=0,072; P=0,004), sugerindo que o *status* de selênio pode ter relação direta com a saúde óssea (HOEG et al., 2012).

Tendo em vista a relação entre selênio, vitamina D e homeostase óssea, os resultados do nosso estudo sugerem a participação de dois miRNA neste contexto (miR-454-3p e miR-584-5p). Entretanto, não observamos diferença nas concentrações de 25(OH)D antes ou após a ingestão de castanha-do-brasil. Um fator limitante desta investigação no presente estudo são as diferentes localizações compartimentais avaliadas (plasma e célula). Todos os alvos dos

miRNA propostos pelo IPA® estão localizados no núcleo da célula, porém nós quantificamos apenas os miRNA extracelulares (plasmáticos). Além disso, não é possível inferir que esses miRNA sejam capazes de entrar em qualquer célula para exercer esses efeitos. Mais pesquisas deverão ser realizadas para investigar esta capacidade nestes miRNA e observar os efeitos preditos *in silico*.

A ausência de alteração no TSH era esperada, tendo em vista que as participantes encontravam-se dentro da faixa de normalidade proposta pela Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SGARBI et al., 2013). Por outro lado, em relação à vitamina D, todas as participantes apresentaram deficiência (< 20 ng/mL) em ambos os tempos do estudo, com valores de vitamina D ligeiramente inferiores ao observado em outro estudo de base populacional em São Paulo (SP), no qual a média da concentração de 25(OH)D para mulheres foi de 20,4 ng/mL (MARTINI et al., 2013).

Sabe-se que a obesidade é um fator de risco para deficiência em vitamina D, havendo uma relação inversa entre adiposidade e concentrações séricas de 25(OH)D. Uma meta-análise sugeriu que para cada aumento de 1 kg/m² no IMC há redução de 1,15% na concentração plasmática de 25(OH)D (VIMALESWARAN et al., 2013). Alguns autores sugerem que essa relação pode estar ligada ao depósito de vitamina D no tecido adiposo, tornando-a menos biodisponível para a circulação sanguínea (BLUM et al., 2008; SCHUCHU et al., 2009).

A hipovitaminose D leva à osteomalácia, ao hiperparatiroidismo secundário e, consequentemente, ao aumento da reabsorção óssea, favorecendo a perda de massa óssea e o desenvolvimento de osteopenia e osteoporose (MAEDA et al., 2014). Recentemente, foi demonstrado que a deficiência de vitamina D pode aumentar o risco de morte por doenças cardiometabólicas associadas ao excesso de peso (AL-KHALIDI et al., 2018).

A Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia propõe que, para populações de maior risco (incluindo pacientes obesos), as concentrações de 25(OH)D devem ser mantidas acima de 30 ng/mL, tendo em vista que nesta faixa os benefícios da vitamina D são mais evidentes, especialmente no que se refere a doenças osteometabólicas (MAEDA et al., 2014).

Outro resultado relevante refere-se à correlação de diversos miRNAs com o *status* de selênio e alguns parâmetros relacionados à SM e resistência à ação da insulina (glicemia de jejum, insulina, HOMA-IR, HDL-c e colesterol total), sugerindo que as alterações no perfil de expressão de miRNA circulantes podem refletir tanto o aumento da ingestão de selênio como as alterações nos parâmetros bioquímicos relacionados à SM citados acima.

As alterações nos *status* de selênio foram correlacionadas positivamente com o miR-454-3p e inversamente com o miR-191-5p e miR-200c-3p. Resultados semelhantes foram

observados em um estudo de suplementação com selênio e coenzima Q10 em idosos na Suíça. Os autores observaram que após a suplementação houve aumento significativo do miR-454-3p e redução do miR-191-5p. O miR-200c-3p, diferentemente do presente estudo, foi positivamente associado ao *status* de selênio, apresentando aumento significativo após a suplementação (ALEHAGEN et al., 2017). Obviamente este estudo possui comparação limitada ao nosso, tendo em vista a diferença tanto na suplementação quanto no público avaliado. Entretanto, nenhum outro estudo avaliou, em seres humanos, os efeitos da alta ingestão de selênio sobre microRNA circulantes.

Diversos estudos já demonstraram associações entre microRNA circulantes e aspectos relacionados à SM, principalmente na homeostase da glicose e metabolismo lipídico (KAROLINA et al., 2012; WANG et al., 2013; RAITOHARJU et al., 2014; SHAH et al., 2017). O miR-143, por exemplo, foi associado à maior incidência de SM na população chinesa (YE et al., 2013), corroborando a correlação positiva deste miR com o índice HOMA-IR observada em nosso trabalho. O miR-143 possui expressão elevada na obesidade e está relacionado à resistência à insulina por inibição da ativação da Akt (JORDAN et al., 2011). A Akt é uma proteína quinase envolvida na cascata de sinalização intracelular da insulina. Uma vez ativada, esta proteína auxilia na translocação no transportador GLUT-4 para a membrana celular, aumentando a captação de glicose (CZECH, 2017).

O miR-33b apresentou correlação positiva com a concentração sérica de colesterol total, confirmando seu papel no metabolismo do colesterol (RAYNER et al., 2010; ARYAL et al., 2017). Esse miRNA inibe a expressão do transportador de colesterol ABCA1 (ATP-*Binding Cassette* A1), que é um dos principais reguladores da biogênese da HDL, comprometendo o transporte reverso do colesterol. Um estudo em macacos demonstrou que a inibição farmacológica do miR-33b aumentou a expressão hepática de ABCA1, aumentando os níveis de HDL e reduzindo as concentrações de triacilglicerol, podendo ser portanto um alvo terapêutico potencial para tratamento das dislipidemias (RAYNER et al., 2010).

Levando em consideração o uso dos microRNA como biomarcadores de doenças, nosso estudo identificou um miRNA expresso diferencialmente em mulheres com SM – miR-375 – cuja expressão foi significativamente reduzida nesta condição. O miR-375 circulante é considerado um biomarcador para a função das células β pancreáticas, pois é o microRNA mais expresso nestas células e regula a secreção de insulina, considerado fundamental para a homeostase normal da glicose (WEI et al., 2013; LI, 2014; ELIASSON et al., 2017). Nesse contexto, a deleção genética do miR-375 em camundongos compromete a capacidade proliferativa do pâncreas endócrino, reduzindo a massa das células β e resultando em

hiperglicemia e um estado diabético descompensado (POY et al., 2009). Corroborando esta hipótese, nós observamos que as participantes com menor glicemia (tercil 1) apresentaram maior expressão do miR-375 em relação àquelas do tercil 2, indicando que a glicemia pode ser o fator-chave dentro da SM que regula a expressão deste miRNA.

Diante deste cenário, nossos resultados sugerem que as participantes com SM podem apresentar potencial risco de comprometimento da função pancreática, indicada pela redução significativa da expressão do miR-375 em comparação àquelas sem SM.

O estudo dos microRNA consiste em uma ferramenta inovadora para investigar o mecanismo pelo qual os nutrientes e os compostos bioativos podem modular o risco de doenças. A sua utilização como biomarcador permite o acompanhamento dos estudos de intervenção por meio da observação de respostas mais rápidas e com maior sensibilidade. Entretanto, esses estudos ainda precisam avançar, principalmente em relação à validação desses biomarcadores circulantes em diversas populações, para então serem amplamente utilizados nas pesquisas clínicas.

Deve-se ressaltar que os miRNA circulantes podem ser originados em diferentes tecidos, não sendo possível responder se a sua expressão foi alterada em resposta direta ou indireta à intervenção realizada, tampouco se essa alteração terá efeito metabólico.

Outras limitações do presente estudo se referem ao pequeno número amostral, que dificulta algumas comparações estatísticas, principalmente devido às grandes variações interindividuais nos microRNA circulantes. Além disso, também é importante avaliar separadamente o efeito do selênio nesses desfechos, a fim de entender melhor o mecanismo pelo qual este mineral pode atuar nesse contexto.

Conclusões

9. CONCLUSÕES

O consumo da castanha-do-brasil modula a expressão de miRNA circulantes em mulheres com excesso de peso, particularmente do miR-454-3p e do miR-584-5p, que participam da via de ativação VDR/RXR, sugerindo existir uma relação entre o alto consumo de selênio e possíveis efeitos sobre a homeostase do cálcio, regulação do crescimento e sob a função imune. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar estes efeitos biológicos.

Além disso, a identificação da menor expressão do miR-375 em mulheres com síndrome metabólica indica uma possível relação desse miRNA com esta condição clínica, apresentando grande potencial para ser validado como biomarcador de síndrome metabólica em estudos futuros.

Referências

REFERÊNCIAS

AL-KHALIDI, B. et al. Metabolically healthy obesity, vitamin D, and all-cause and cardiometabolic mortality risk in NHANES III. **Clinical Nutrition**, 2018.

ALEHAGEN, U. et al. Significant changes in circulating microRNA by dietary supplementation of selenium and coenzyme Q10 in healthy elderly males. A subgroup analysis of a prospective randomized double-blind placebo-controlled trial among elderly Swedish citizens. **PloS one,** v. 12, n. 4, p. e0174880, 2017.

AOAC. **Official methods of Analysis of AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICVAL CHEMISTS)**. Washington: Assoc. Off. Agric. Chem., 2000.

ARANHA, M. M.; SANTOS, D. M.; SOLA, S. E. A. miR-34a regulates mouse neural stem cell differentiation. **PLoS ONE**. v. 6, n. 8, p. e21396, 2011.

ARYAL, B. et al. MicroRNAs and lipid metabolism. **Curr Opin Lipidol,** v. 28, n. 3, p. 273-280, 2017.

BARILE, L. et al. Roles of exosomes in cardioprotection. **European Heart Journal,** v. 38, n. 18, p. 1372-1379, 2016.

BARTEL, D. P.; CHEN, C. Z. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. **Nature Reviews Genetics**. v. 5, p. 396-400, 2004.

BATISTA, B. L. et al. Exploiting dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS) for sequential determination of trace elements in blood using a dilute-and-shoot procedure. **Analytica chimica acta**. v. 639, p. 13-18, 2009.

BEUKHOF, C. M. et al. Selenium Status Is Positively Associated with Bone Mineral Density in Healthy Aging European Men. **PLoS One,** v. 11, n. 4, p. e0152748, 2016.

BLEYS, J.; NAVAS-ACIEN, A.; GUALLAR, E. Serum selenium levels and all-cause, cancer, and cardiovascular mortality among US adults. **Archives of internal medicine**. v. 168, p. 404-410, 2008.

BLONDAL, T. et al. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. **Methods,** v. 59, n. 1, p. S1-S6, 2013.

BLUM, M. et al. Vitamin D 3 in fat tissue. **Endocrine,** v. 33, n. 1, p. 90-94, 2008.

BODÓ, E. T. et al. Preparation, homogeneity and stability studies of a candidate LRM for Se speciation. **Analytical and bioanalytical chemistry,** v. 377, n. 1, p. 32-38, 2003.

BURK, R. Selenium, an antioxidant nutrient. **Nutr Clin Care,** v. 5, n. 2, p. 75-79, 2002.

CAO, J. J.; GREGOIRE, B. R.; ZENG, H. Selenium deficiency decreases antioxidative capacity and is detrimental to bone microarchitecture in mice. **J Nutr,** v. 142, n. 8, p. 1526-31, 2012.

CARDOSO, B. R.; APOLINÁRIO, D.; DA SILVA BANDEIRA, V. E. A. Effects of Brazil nut consumption on selenium status and cognitive performance in older adults with mild cognitive impairment: a randomized controlled pilot trial. **European journal of nutrition,** v. 55, n. 1, p. 107-116, 2015.

CARDOSO, B. R. et al. Brazil nuts: Nutritional composition, health benefits and safety aspects. **Food Research International,** v. 100, p. 9-18, 2017.

CHANG, C. C. et al. Selenium content of Brazil nuts from two geographic locations in Brazil. **Chemosphere**. v. 30, n. 4, p. 801-802, 1995.

CHEN, W. J. et al. The magic and mystery of microRNA-27 in atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 222, n. 2, p. 314-323, 2012.

CLOONAN, N. et al. MicroRNAs and their functions isomiRs function cooperatively to target commom biological pathways. **Genome biology,** v. 12, n. 12, p. R126, 2011

COMINETTI, C. et al. Brazilian nut consumption improves selenium status and glutathione peroxidase activity and reduces atherogenic risk in obese women. **Nutrition Research,** v. 32, n. 6, p. 403-407, 2012.

CORDES, K. R.; SHEEHY, N. T.; WHITE, M. P. E. A. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. **Nature,** v. 460, n. 7256, p. 705, 2009.

CZECH, M. P. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. **Nature medicine,** v. 23, n. 7, p. 804, 2017.

DAI, R.; AHMED, S. A. MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. **Translational Research**, v. 157, n. 4, p. 163-179, 2011.

DAWBER, T. R.; MOORE, F. E.; MANN, G. V. Coronary heart disease in the Framingham study. **International journal of epidemiology,** v. 44, n. 6, p. 1767-1780, 2015.

DE CATERINA, R. et al. Nutritional mechanisms that influence cardiovascular disease. **The American journal of clinical nutrition.** v. 83, n. 2, p. 421S-426S, 2006.

DEL GOBBO, L. C. et al. Effects of tree nuts on blood lipids, apolipoproteins, and blood pressure: systematic review, meta-analysis, and dose-response of 61 controlled intervention trials. **The American journal of clinical nutrition**, v. 102, n. 6, p. 1347-1356, 2015.

DONADIO, J. L. S. et al. Genetic variants in selenoprotein genes modulate biomarkers of selenium status in response to Brazil nut supplementation (the SU.BRA.NUT study). **Clinical Nutrition**, 2018.

ECKEL, R. H.; GRUNDY, S. M.; ZIMMET, P. Z. The metabolic syndrome. **The Lancet**. v. 365, n. 9468, p. 1415-1428, 2005.

ELIASSON, L. The small RNA miR-375 - a pancreatic islet abundant miRNA with multiple roles in endocrine beta cell function. **Mol Cell Endocrinol,** v. 456, p. 95-101, Nov 15 2017.

FALLER, A. L. K.; FIALHO, E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, p. 211-218, 2009.

FAUL, F. et al. G* Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. **Behavior research methods,** v. 39, n. 2, p. 175-191, 2007.

FAVARO, D. I. T. et al. Determination of various nutrients and toxic elements in different Brazilian regional diets by neutron activation analysis. **Journal of trace elements in medicine and biology**, v. 11, n. 3, p. 129-136, 1997.

FERRANTE, S. C. et al. Adipocyte-derived exosomal miRNAs: a novel mechanism for obesity-related disease. **Pediatric research**, v. 77, n. 3, p. 447, 2015.

FERREIRA, K. S. et al. Concentrações de selênio em alimentos consumidos no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 11, p. 172-177, 2002.

FINLEY, J. Selenium accumulation in plant foods. **Nutrition Reviews**, v. 63, p. 196-202, 2005.

FLORES-MATEO, G. et al. Selenium and coronary heart disease: A meta-analysis. **The American journal of clinical nutrition**, v. 84, n. 4, p. 762-773, 2006.

FOX, C. S., et al. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. **Circulation**, v. 116, p. 39-48, 2007.

FRIEDMAN, R. C. et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome research,** v. 19, p. 92-105, 2009.

GAMI, A. S. et al. Metabolic Syndrome and Risk of Incident Cardiovascular Events and Death: A Systematic Review and Meta-Analysis of Longitudinal Studies. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 49, n. 4, p. 403-414, 2007.

GAO, H. et al. Plasma levels of microRNA-145 are associated with severity of coronary artery disease. **PloS one,** v. 10, n. 5, p. e0123477, 2015.

GREENBERG, A. S.; OBIN, M. S. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. **The American journal of clinical nutrition**, v. 83, n. 2, p. 461S-465S, 2006.

GRIFFITHS-JONES, S. et al. MicroRNA evolution by arm switching. **EMBO reports**, v. 12, n. 2, p. 172-177, 2011.

GUO, M. et al. miR-146a in PBMCs modulates Th1 function in patients with acute coronary syndrome. **Immunology and cell biology,** v. 88, p. 555-564, 2010.

HANSSON, G. K.; ROBERTSON, A.-K. L.; SÖDERBERG-NAUCLÉR, C. Inflammation and atherosclerosis. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.,** v. 1, p. 297-329, 2006.

HAUSSLER, M. R. et al. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1α, 25 (OH) 2vitamin D3: genomic and non-genomic mechanisms. **Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism,** v. 25, n. 4, p. 543-559, 2011.

HENNIG, B. et al. Nutrition, endothelial cell metabolism, and atherosclerosis. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition,** v. 34, p. 253-282, 1994.

HINTZE, K. J. et al. Areas with high concentrations of selenium in the soil and forage produce beef with enhanced concentrations of selenium. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 1062-1067, 2001.

HOEG, A. et al. Bone turnover and bone mineral density are independently related to selenium status in healthy euthyroid postmenopausal women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism,** v. 97, n. 11, p. 4061-4070, 2012.

HUNTZINGER, E.; IZAURRALDE, E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, p. 99-110, 2011.

IBARROLA-JURADO, N. et al. Cross-Sectional Assessment of Nut Consumption and Obesity, Metabolic Syndrome and Other Cardiometabolic Risk Factors: The PREDIMED Study. **PLoS ONE,** v. 8, n. 2, p. e57367, 2013.

IDF (International Diabetes Federation). ZIMMET, P. Z.; ALBERTI, K. G.; SHAW, J. International Diabetes Federation: The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. **Diabetes voice**. v. 50, p. 31-33, 2005.

INSULL, W. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. **The American journal of medicine**, v. 122, n. 1, p. S3-S14, 2009.

IOM (Institute of Medicine). OTTEN, J. J. et al. (Ed.). **Dietary reference intakes: the essential guide to nutrient requirements.** Washington, DC: National Academies Press. Institute of Medicine (IOM), 2006.

JORDAN, S. D. et al. Obesity-induced overexpression of miRNA-143 inhibits insulin-stimulated AKT activation and impairs glucose metabolism. **Nature cell biology,** v. 13, n. 4, p. 434, 2011.

KAROLINA, D. S. et al. Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome. **J Clin Endocrinol Metab,** v. 97, n. 12, p. E2271-6, 2012.

KULLER, L. H. et al. Subclinical disease as an independent risk factor for cardiovascular disease. **Circulation,** v. 92, n. 4, p. 720-726, 1995.

LABUNSKYY, V. M.; HATFIELD, D. L.; GLADYSHEV, V. N. Selenoproteins: Molecular Pathways and Physiological Roles. **Physiological reviews**, v. 94, n. 3, p. 739-777, 2014.

LACHENAL, G. et al. Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. **Molecular and Cellular Neuroscience,** v. 46, p. 409-418, 2011.

LACLAUSTRA M, S. S. et al. Serum selenium and serum lipids in US adults: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003–2004. **Atherosclerosis**, v. 210, p. 643–648, 2010.

LI, X. MiR-375, a microRNA related to diabetes. **Gene,** v. 533, n. 1, p. 1-4, 2014.

LIBBY P, R. P. et al. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 54, n. 23, p. 2129-2138, 2009.

LIN, S.; GREGORY, R. I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. **Nature Reviews,** v. 15, p. 321-333, 2015.

LIPPMAN, S. M. et al. Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). **Jama,** v. 301, n. 1, p. 39-51, 2009.

LUBOS, E. et al. Serum selenium and prognosis in cardiovascular disease: results from the AtheroGene study. **Atherosclerosis**, v. 209, n. 1, p. 271-277, 2010.

MAEDA, S. S. et al. Recomendações da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) para o diagnóstico e tratamento da hipovitaminose D. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 2014.

MANDUTEANU, I.; SIMIONESCU, M. Inflammation in atherosclerosis: a cause or a result of vascular disorders? **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 16, n. 9, p. 1978-1990, 2012.

MAO, S.; ZHANG, A.; HUANG, S. Selenium supplementation and the risk of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Endocrine,** v. 47, n. 3, p. 758–763, 2014.

MARANHÃO, P. A. et al. Brazil nuts intake improves lipid profile, oxidative stress and microvascular function in obese adolescents: a randomized controlled trial. **Nutrition & metabolism**, v. 8, n. 1, p. 32, 2011.

MARGULIES, K. MicroRNAs as novel myocardial biomarkers. **Clinical Chemistry,** v. 55, n. 1, p. 1897–1899, 2009.

MARTINI, L. A. et al. Prevalence and correlates of calcium and vitamin D status adequacy in adolescents, adults, and elderly from the Health Survey—São Paulo. **Nutrition,** v. 29, n. 6, p. 845-850, 2013.

MENTE, A. E. A. A systematic review of the evidence supporting a causal link between dietary factors and coronary heart disease. **Archives of internal medicine**, v. 169, p. 659-669, 2009.

MIOT, H. A. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. **J Vasc Bras**, v. 10, n. 4, p. 275-8,.

MITCHELL, P. S. et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 10513-10518, 2008.

MORENO-REYES, R. et al. Selenium deficiency-induced growth retardation is associated with an impaired bone metabolism and osteopenia. **J Bone Miner Res,** v. 16, n. 8, p. 1556-63, 2001.

MOTTILLO, S. et al. The metabolic syndrome and cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 56, p. 1113-1132, 2010.

NÈVE, J. Selenium as a risk factor for cardiovascular diseases. **Journal of cardiovascular risk**, v. 3, n. 1, p. 42-47, 1996.

OLDFIELD, James E. **Selenium world atlas.** Selenium-Tellurium Development Association, Selenium World Atlas(Belgium), 1999.

ORTEGA, F. J. et al. Circulating profiling reveals the effect of a polyunsaturated fatty acid-enriched diet on common microRNAs. **The Journal of nutritional biochemistry,** v. 26, n. 10, p. 1095-1101, 2015.

PAPAGEORGIOU, N. et al. The role of microRNAs in cardiovascular disease. **Current medicinal chemistry,** v. 19, p. 2605-2610 p. 2012.

PAPP, L. V. et al. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. **Antioxidants & redox signaling,** v. 9, n. 7, p. 775-806, 2007.

PASTORI, D.; CARNEVALE, R.; PIGNATELLI, P. Is there a clinical role for oxidative stress biomarkers in atherosclerotic diseases? **Intern Emerg Med,** v. 9, p. 123-131, 2014.

PIETSCHMANN, N. et al. Selenoprotein P is the essential selenium transporter for bones. **Metallomics,** v. 6, n. 5, p. 1043-1049, 2014.

PIRES, L. V. **Efeito da suplementação com castanha-do-brasil (Bertholletia excelsa H.B.K.) na expressão gênica de citocinas inflamatórias e sua relação com o estresse oxidativo em pacientes com diabetes mellitus tipo 1. [Tese de doutorado]**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2012.

POY, M. N. et al. miR-375 maintains normal pancreatic α- and β-cell mass. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** v. 106, n. 14, p. 5813-5818, 2009.

QUEHENBERGER, O. Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Molecular mechanisms regulating monocyte recruitment in atherosclerosis. **Journal of lipid research,** v. 46, n. 8, p. 1582-1590, 2005.

QUINTANILHA, B. J. et al. Nutrimiromics: Role of microRNAs and Nutrition in Modulating Inflammation and Chronic Diseases. **Nutrients,** v. 9, n. 11, p. 1168, 2017.

RAITAKARI, O. T. et al. Cardiovascular risk factors in childhood and carotid artery intima-media thickness in adulthood: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. **Jama**, v. 290, n. 17, p. 2277-2283, 2003.

RAITOHARJU, E. et al. Blood microRNA profile associates with the levels of serum lipids and metabolites associated with glucose metabolism and insulin resistance and pinpoints pathways underlying metabolic syndrome: the cardiovascular risk in Young Finns Study. **Mol Cell Endocrinol,** v. 391, n. 1-2, p. 41-9, 2014.

RAUCCI, R. et al. Functional and structural features of adipokine familiy. **Cytokine**, v. 61, n. 1, p. 1-14, 2013.

RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. **The lancet**. v. 9225, p. 233-241, 2000.

RAYNER, K. J. et al. Inhibition of miR-33a/b in non-human primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides. **Nature,** v. 478, n. 7369, p. 404, 2011.

RAYNER, K. J. et al. MiR-33 Contributes to the Regulation of Cholesterol Homeostasis. **Science,** v. 328, n. 5985, p. 1570-1573, 2010.

ROS, E.; MATAIX, J. Fatty acid composition of nuts – implications for cardiovascular health. **British Journal of Nutrition**, v. 96, p. S29-S35, 2006.

SBD (Sociedade Brasileira de Diabetes). **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD): 2013-2014**. São Paulo: AC Farmacêutica, 2014.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101, 2008.

SCHNABEL, R. et al. Selenium supplementation improves antioxidant capacity in vitro and in vivo in patients with coronary artery disease: The SElenium Therapy in Coronary Artery disease Patients (SETCAP) Study. **American heart journal**, v. 156, n. 6, p. 1201. e1-1201. e11, 2008.

SCHUCHU, N. J.; GARCIA, V. C.; MARTINI, L. A. Vitamina D e doenças endocrinometabólicas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia,** v. 53, p. 625-633, 2009.

SGARBI, J. A. et al. Consenso brasileiro para a abordagem clínica e tratamento do hipotireoidismo subclínico em adultos: recomendações do Departamento de Tireoide da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 2013.

SHAH, R. et al. Extracellular RNAs Are Associated With Insulin Resistance and Metabolic Phenotypes. **Diabetes Care,** v. 40, n. 4, p. 546, 2017.

SIASOS, G. et al. MicroRNAs: novel diagnostic and prognostic biomarkers in atherosclerosis. **Current topics in medicinal chemistry**. v. 13, p. 1503-1517, 2013.

SILVA, E. G. D.; MATAVELI, L. R. V.; ARRUDA, M. A. Z. Speciation analysis of selenium in plankton, Brazil nut and human urine samples by HPLC–ICP-MS. **Talanta,** v. 110, p. 53–57, 2013.

SMALL, E. M.; OLSON, E. N. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. **Nature**. v. 469, n. 7330, p. 336, 2011.

STERN, S. E. et al. Identification of individuals with insulin resistance using routine clinical measurements. **Diabetes,** v. 54, n. 2, p. 333-339, 2005.

STOCKER, R.; KEANEY, J. F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiological reviews**, v. 84, p. 1381-1478, 2004.

STRANGES, S. et al. Higher selenium status is associated with adverse blood lipid profile in British adults. **The Journal of nutrition,** v. 140, n. 1, p. 81-87, 2010.

STRANGES, S. et al. Effects of long-term selenium supplementation on the incidence of type 2 diabetes: a randomized trial. **Annals of internal medicine,** v. 147, n. 4, p. 217-223, 2007.

STRANGES, S. et al. A prospective study of dietary selenium intake and risk of type 2 diabetes. **BMC Public Health,** v. 10, n. 1, p. 564, 2010.

STRUNZ, C. C. et al. Brazil nut ingestion increased plasma selenium but had minimal effects on lipids, apolipoproteins, and high-density lipoprotein function in human subjects. **Nutrition Research,** v. 28, n. 3, p. 151-5, 2008.

SUN, J.; SUN, Q.; LU, S. From selenoprotein to endochondral ossification: A novel mechanism with microRNAs potential in bone related diseases? **Medical hypotheses,** v. 77, n. 5, p. 807-811, 2011.

THOMSON, C. D. et al. Brazil nuts: an effective way to improve selenium status. **The American journal of clinical nutrition**, v. 87, n. 2, p. 379-384, 2008.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 10, p. 772, 2006.

TOMÉ-CARNEIRO, J. et al. One-year supplementation with a grape extract containing resveratrol modulates inflammatory-related microRNAs and cytokines expression in peripheral blood mononuclear cells of type 2 diabetes and hypertensive patients with coronary artery disease. **Pharmacological research,** v. 72, p. 69-82, 2013.

VALADI, H. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature cell biology**, v. 9, n. 6, p. 654, 2007.

VIMALESWARAN, K. S. et al. Causal relationship between obesity and vitamin D status: bi-directional Mendelian randomization analysis of multiple cohorts. **PLoS medicine,** v. 10, n. 2, p. e1001383, 2013.

WANG, Y. T. et al. Circulating microRNAs have a sex-specific association with metabolic syndrome. **Journal of biomedical science,** v. 20, p. 72, 2013.

WEI, R. et al. Dynamic expression of microRNAs during the differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing cells. **Gene,** v. 518, n. 2, p. 246-255, 2013.

WHO. **Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity.** World Health Organization. Geneva. 1998

XU, J. et al. Circulating microRNAs: novel biomarkers for cardiovascular diseases. **Journal of molecular medicine**, v. 90, n. 8, p. 865-875, 2012.

XUN, P. et al. Longitudinal association between toenail selenium levels and measures of subclinical atherosclerosis: The CARDIA trace element study. **Atherosclerosis**, v. 210, p. 662–667, 2010.

YE, Q. et al. Polymorphisms in lipid metabolism related miRNA binding sites and risk of metabolic syndrome. **Gene,** v. 528, n. 2, p. 132-138, 2013.

ZENG, H.; CAO, J. J.; COMBS, G. F., JR. Selenium in bone health: roles in antioxidant protection and cell proliferation. **Nutrients,** v. 5, n. 1, p. 97-110, 2013.

ZHANG, X. et al. Selenium status and cardiovascular diseases: meta-analysis of prospective observational studies and randomized controlled trials. **European journal of clinical nutrition**, v. 70, p. 162-169, 2015.

ZHANG, Y. et al. Cellular microRNAs up-regulate transcription via interaction with promoter TATA-box motifs. **RNA**. v. 20, n. 12, p. 1878-1889, 2014.

ÖZCAN, U. et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. **Science,** v. 306, n. 5695, p. 457-461, 2004.

Anexos

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ANEXO C – FORMULÁRIO DE DADOS SOCIOECONÔMICOS E SAÚDE

ANEXO D – FICHA DO ALUNO

ANEXO E – CURRÍCULO LATTES

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Efeito da suplementação de selênio com castanha-do-brasil (Bertholettia excelsa H.B.K.) sobre a inflamação, o estresse oxidativo e a expressão de selenoproteina P e microRNAs em mulheres obesas.

Pesquisador: Silvia Maria Franciscato Cozzolino

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 4

CAAE: 40506215.5.0000.0067

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.421.929

Apresentação do Projeto:

A inflamação e o estresse oxidativo são processos que ocorrem simultaneamente na obesidade e contribuem para o aumento da síntese de mediadores inflamatórios e de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. O mineral selênio (Se), cuja principal fonte alimentar é a castanha-do-brasil (Bertholettia excelsa H.B.K.), possui propriedades antioxidantes e antiinflamatórias. Neste contexto, ainda pouco explorado, alguns estudos sugerem que a selenoproteina P (SePP) no tecido adiposo possa estar envolvida com mecanismos celulares de estresse oxidativo ligados à inflamação e à resistência à ação da insulina. Esta selenoproteina possui grandes quantidades de Se e é a maior contribuinte do conteúdo do mineral no plasma. Considerando a importância do processo inflamatório na obesidade e o potencial papel do Se como antiinflamatório por meio de selenoproteinas, o estudo da influência deste micronutriente neste contexto por meio de um protocolo de suplementação é de grande relevância. Além disso, a investigação de possíveis mecanismos moleculares, como os microRNAs (miRNA), poderão fornecer respostas mais especificas sobre o envolvimento do Se nestas vias. Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da suplementaçãode Se com castanha-do-brasil sobre a inflamação, o estresse oxidativo e a

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br

expressão de selenoproteina P e de microRNAs em mulheres obesas. Este será um estudo longitudinal prospectivo randomizado. Serão selecionadas 72 mulheres obesas alocadas randomicamente no grupo que receberá a castanha-do-Brasil durante 60 dias ou no grupo que não consumirá este alimento durante o mesmo período. Antes do início do protocolo serão realizadas as análises da composição centesimal e da concentração de Se das castanhas a serem oferecidas às participantes. Serão avaliados, nos dois grupos, antes e após a intervenção, os parâmetros bioquímicos relacionados ao estado nutricional relativo ao Se, estresse oxidativo, perfil lipídico, glicemia, marcadores inflamatórios, adipocinas e expressão gênica de selenoproteinas e de microRNAs. O consumo alimentar de Se e macronutrientes será avaliado por meio de três recordatórios alimentares de 24 horas, realizados durante a intervenção. A análise estatística será feita a partir de testes específicos com auxilio do Centro de Estatística Aplicada (CEA/IME), a fim de responder aos objetivos propostos neste trabalho.

Objetivo da Pesquisa:

Mencionado no item anterior.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A pesquisa possui um risco mínimo em virtude da coleta de sangue que pode causar um desconforto ou o surgimento de uma mancha arroxeada no local onde a agulha for inserida, desaparecendo em poucos dias. O consumo da castanha-do-brasil utilizada neste estudo não oferece qualquer risco à saúde dos participantes.

Benefícios:

As participantes realizarão avaliação nutricional, com medidas de composição corporal, avaliação do consumo alimentar e exames bioquímicos. Dessa forma, receberão orientação nutricional individualizada ao final do estudo. Além disso, as participantes receberão gratuitamente um lote contendo 60 castanhas-do-brasil para serem consumidas durante os dois meses de duração da pesquisa, sendo este um alimento de alto custo e cujo consumo apresenta diversos benefícios já descritos na literatura. Aquelas participantes alocadas para o grupo controle receberão, ao final do estudo, a mesma quantidade de castanha fornecida ao outro grupo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa bem elaborada, metodologia clara e bom embasamento científico na justificativa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Na emenda anterior a pesquisadora havia informado a intenção de realizar análises no exterior,

sem mencionar especificamente qual instituição estrangeira seria colaboradora. O CEP então solicitou completar esta informação. Como resposta, a pesquisadora declara que não foi possível firmar a parceira e informa a retirada do envio de amostras biológicas para o exterior do projeto.

Recomendações:

Recomenda-se a aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências ou inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este CEP entende que a emenda ao projeto de pesquisa pode ser considerada aprovada.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_546621_E1.pdf	08/01/2016 12:51:06		Aceito
Outros	Retifica_Adendo.pdf	08/01/2016 12:48:19	Silvia Maria Franciscato Cozzolino	Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto (ADENDO).pdf	17/08/2015 16:28:09		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE modificado (Adendo).pdf	17/08/2015 16:27:56		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto MODIFICADO para ADENDO.pdf	03/08/2015 15:10:34		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaração Anuência do Departamento (FCF).pdf	08/01/2015 11:56:20		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaração Anuência do HC.pdf	08/01/2015 11:54:36		Aceito
Outros	Declarações Participantes.pdf	08/01/2015 11:54:12		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br

SAO PAULO, 24 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
Mauricio Yonamine
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

1. Informações do Participante da Pesquisa

Nome:		
Documento de Identidade (tipo):	Nº.:	Sexo: ( ) M ( ) F
Local de Nascimento:	Data de Nascimento: / /	
Endereço:	Nº.:	
Complementos:	Bairro:	
Cidade:	Estado:	
CEP:	Telefones:	

2. Título do Projeto de Pesquisa

Efeito da suplementação de selênio com castanha-do-brasil (*Bertholettia excelsa H.B.K.*) sobre a inflamação, o estresse oxidativo e a expressão de selenoproteina P e microRNAs em mulheres obesas.

4. Duração da Pesquisa

3 meses

5. Nome do Pesquisador Responsável

Silvia Maria Franciscato Cozzolino	
Cargo/ Função: Professor Titular	Nº de registro do Conselho Regional: CRN 0621

6. Instituições

Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) /
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP)

Convidamos a senhora para participar da pesquisa conduzida pela Profa. Dra. Silvia Cozzolino, nutricionista e pesquisadora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, com colaboração da Dra. Cintia Cercato, endocrinologista do Hospital das Clínicas (HC-FMUSP), e das nutricionistas e alunas de doutorado Graziela Biude Silva e Bruna Zavarize Reis.

A obesidade é uma doença que ocorre devido ao acúmulo de gordura no corpo, levando ao aumento do peso corporal, que pode ocasionar outros problemas de saúde. O selênio é um nutriente importante para o nosso organismo e pode ser encontrado em alimentos como as castanhas. Nesta pesquisa, serão avaliados os efeitos do consumo de selênio na saúde de mulheres com excesso de peso.

Este estudo contará com a participação dois grupos. Um deles receberá castanha-do-brasil e o outro uma cápsula, cuja composição não poderá ser informada ao participante. A senhora fará um sorteio para saber em qual grupo participará na pesquisa. Ambos os grupos serão suplementados durante 2 meses (60 dias) e orientados durante todo este tempo. Antes e depois do estudo, serão realizados exames clínicos e laboratoriais (coleta de sangue, avaliação da alimentação e da composição corporal). Inicialmente, será aplicado um questionário a fim de obter dados socioeconômicos, verificar a presença de doenças e o uso de medicamentos ou suplementos vitamínicos. Será avaliada também a sua alimentação durante três dias alternados, por meio do questionário de recordatório alimentar. Após estas etapas, será feita uma avaliação da composição corporal, com medidas de peso, estatura e porcentagem de gordura corporal. Estas avaliações serão feitas no início e ao final do estudo. Além disso, serão feitas duas coletas de sangue com 25mL cada, sendo uma no início e outra ao final do estudo, ou seja, após os 2 meses de suplementação.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

A coleta de sangue será feita em jejum de 12 horas, no Hospital das Clínicas da USP (HC-FMUSP) por um técnico habilitado e todo o material utilizado será estéril e descartável. A pesquisa possui um risco mínimo, em virtude da coleta de sangue que pode causar desconforto ou o surgimento de uma mancha arroxeada no local onde a agulha for inserida, desaparecendo em poucos dias. Ao final do exame, a senhora receberá um lanche como café da manhã.

O sangue será coletado para avaliar o selênio, parâmetros de inflamação (citocinas inflamatórias), estresse oxidativo (malondialdeído, capacidade antioxidante total – ORAC, atividade das enzimas glutationa peroxidase e superóxido dismutase), perfil lipídico e a influência da genética no estado nutricional relativo ao selênio (expressão de proteínas que dependem de selênio e microRNAs).

A senhora poderá desistir do estudo a qualquer momento, sem nenhum constrangimento ou prejuízo do seu atendimento no hospital. A sua participação no estudo não acarretará custos ou compensação financeira, porém eventuais despesas poderão ser ressarcidas, bem como a indenização relacionada a eventuais problemas durante a pesquisa. Durante todas as etapas do estudo, a senhora poderá entrar em contato com os responsáveis pela pesquisa para ter informações sobre a mesma. Os resultados serão divulgados apenas em revistas e congressos científicos e seu nome **não** será divulgado.

As amostras de sangue serão armazenadas em bancos de materiais biológicos no Laboratório de Nutrição e Minerais da FCF/USP, sob responsabilidade da Prof. Silvia Maria Franciscato Cozzolino.

Assim, caso também consinta (favor assinalar abaixo), as amostras poderão ser utilizadas para pesquisas futuras relacionadas ao tema estudado. Caso concorde, um novo projeto será submetido ao CEP. Caso não concorde, a amostra será descartada no final do presente estudo.

A senhora autoriza o armazenamento do seu sangue para pesquisas futuras?

( ) Sim ( ) Não

Declaro que, após convenientemente esclarecida pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa e recebo uma via do presente documento.

São Paulo,_____ de_____ de _____.

_____
Assinatura do participante de pesquisa

_____
Assinatura do pesquisador responsável
Silvia M.F. Cozzolino

Em caso de dúvidas, entrar em contato com:

Graziela Biude Silva e **Bruna Zavarize Reis**
Telefone: (11) 3091-3625
E-mail: selenio.obesidade2014@gmail.com
Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 580 – Bloco 14
CEP: 05508-900 São Paulo-SP.

Dra. Silvia Maria Franciscato Cozzolino
Telefone: (11) 3091-3509
E-mail: smfcozzo@usp.br
Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 580 – Bloco 14
CEP: 05508-900 São Paulo-SP.

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos dessa pesquisa, favor entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13A – Butantã – São Paulo – CEP 05508-900. Fone: 3091-3622, fone-fax: 3091-3677 – e-mail: cepfcf@usp.br

ANEXO C – FORMULÁRIO DE DADOS SOCIOECONÔMICOS E SAÚDE

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

FICHA CADASTRAL

ID:_____

Nome:_____

Idade: _____ Data de Nascimento: _____/_____/_____ Naturalidade:_____

Endereço:_____

CEP:_____-_____ Telefone:_____ Celular: _____

Doenças: ( ) Diabetes tipo _____ ( ) HAS ( ) DCV ( ) Câncer ( ) Doenças reumáticas

( ) Outras: _____

Estado Civil: _____ **Renda Familiar (SM)**: ( ) < 1 ( ) 1-2 ( ) 2-3 ( ) 3-5 ( ) > 5 ( ) ≥10

Grau de Instrução: ( ) Nenhum ( ) Fund. Incompleto ( ) Fund. Completo ( ) Médio Incompleto

( ) Médio Completo ( ) Superior Incompleto ( ) Superior Completo

Profissão:_____

Filhos: ( ) sim ( ) não **Data da última menstruação**:___/___/___ **Menopausa**: ( ) sim ( ) não

Ingestão de bebidas alcoólicas: ( ) sim * ( ) não

** Frequência* = ( ) até 2 vezes/mês ( ) 1x/semana ( ) ≥ 2 a 3 vezes/semana

Medicamentos: ( ) sim* ( ) não

**Quais*:_____

_____

_____

Prática de Exercício Físico: ( ) sim* ( ) não

**Quais? Frequência?*:_____

Alergia a oleaginosas: ( ) sim ( ) não

ANEXO D – FICHA DO ALUNO

Universidade de São Paulo
Brasil

Login

Aluno(a)
Bruna Zavarize Reis
NUSP : 7908717
Sair

Apresentação

- Apresentação
- Vídeos tutoriais

+ Acesso público

+ Senha

- Pessoa

- Dados pessoais

+ Informações pessoais

- Aluno regular

- Ficha do aluno
- Bolsas
- Emissão de documentos
- Programa USP iFriends
- Validação de dados

+ PAE

+ Matrícula

+ Cartões USP

- Avisos
- Mapa do *site*
- E-mails automáticos
- Quem São

- Portal Alumni

NUSP: 7908717 Nome: Bruna Zavarize Reis

Ficha do Aluno

	Curso	Área	Nº Sequencial	Situação	Visualizar
	Mestrado	Nutrição Humana Aplicada (89131)	1	Titulado	
➔	Doutorado	Nutrição Experimental (9132)	1	Matrícula de Acompanhamento	

Preparar para imprimir

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9132 - 7908717/1 - Bruna Zavarize Reis

Email:	brunareis@usp.br
Data de Nascimento:	24/01/1989
Cédula de Identidade:	RG - 1.546.292 - SE
Local de Nascimento:	Estado de Sergipe
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Nutrição - Universidade Federal de Sergipe - Sergipe - Brasil - 2011
Mestrado:	Mestra em Ciências - Área: Nutrição Humana Aplicada - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2014

Curso:	Doutorado
Programa:	Ciência dos Alimentos
Área:	Nutrição Experimental
Data de Matrícula:	07/11/2014
Início da Contagem de Prazo:	07/11/2014
Data Limite para o Depósito:	07/11/2018
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Silvia Maria Franciscato Cozzolino - 07/11/2014 até o presente. Email: smfcozzo@usp.br
Co-orientador:	Prof(a). Dr(a). Marcelo Macedo Rogero - 09/11/2016 até o presente. Email: mmrogero@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 07/11/2014
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 30/11/2016
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 07/11/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 16/07/2018
Impresso em: 26/08/2018 11:30:22

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9132 - 7908717/1 - Bruna Zavarize Reis

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BMH5760-3/3	Biologia das Mucosas Gástrica e Intestinal (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo) (1)	08/04/2014	13/05/2014	60	4	100	A	N	Concluída
HNT5759-2/2	Nutrigenômica no Contexto das Doenças Crônicas não Transmissíveis (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	03/03/2015	06/04/2015	60	4	94	A	N	Concluída
FBA5900-2/2	Biomodelos Experimentais Aplicados na Avaliação de Alimentos	28/04/2015	18/05/2015	30	2	100	A	N	Concluída
MCP5871-1/1	Tratamento de Dados em Estudo Científico (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	11/05/2015	17/05/2015	30	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
MCM5797-5/3	Obesidade (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	09/06/2015	29/06/2015	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5780-2/3	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	10/08/2015	21/09/2015	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBC5700-6/2	Aterosclerose: Fisiopatologia, Diagnóstico e Terapêutica	03/11/2015	30/11/2015	60	4	100	A	N	Concluída
BMH5770-2/1	MicroRNA e Câncer (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	19/09/2016	17/10/2016	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5874-6/2	Química e Análise dos Alimentos Lipídicos	01/11/2016	12/12/2016	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBA5905-1/1	Planejamento Experimental e Análise Multivariada	13/02/2017	26/02/2017	60	0	-	-	S	Pré-matrícula indeferida
FBC5780-2/4	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	07/08/2017	17/09/2017	90	6	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	28
Estágios:			
Total:	0	20	28

Créditos Atribuídos à Tese: 172

Observações:
1) Disciplina(s) cursada(s) isoladamente e aceita(s) pelo(a) orientador(a) do(a) candidato(a).

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 16/07/2018
Impresso em: 26/08/2018 11:30:22

ANEXO E – CURRÍCULO LATTES

Bruna Zavarize Reis

Endereço profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Avenida Professor Lineu Prestes, 580. Bloco 14.
Butantã - São Paulo
05508000, SP - Brasil
Telefone: 11 30913625

Endereço eletrônico E-mail para contato: brunazreis@yahoo.com.br
E-mail alternativo: brunareis@usp.br

Formação acadêmica/titulação

2014 - 2018 **Doutorado em Ciências dos Alimentos.**
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Expressão de microRNA circulantes em mulheres com excesso de peso suplementadas com castanha-do-brasil.
Orientador: Silvia Maria Franciscato Cozzolino
Coorientador: Marcelo Macedo Rogero
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2012 - 2014 **Mestrado em Nutrição Humana Aplicada.**
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Estado nutricional relativo ao zinco de crianças e sua relação com a expressão gênica das proteínas transportadoras de zinco ZnT1 (SLC30A1) e ZIP4 (SLC39A4)
Ano de obtenção: 2014
Orientador: Silvia Maria Franciscato Cozzolino
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2007 - 2010 **Graduação em Nutrição.**
Universidade Federal de Sergipe, UFS, São Cristóvao, Brasil
Título: Composição de nutrientes da dieta está associada à obesidade em mulheres ativas
Orientador: Raquel Simões Mendes Netto

Atuação profissional

1. Fundação Municipal de Ensino Superior de Bragança Paulista - FESB

Vínculo institucional

2017 - Atual Vínculo: Professor Visitante, Enquadramento funcional: Professora de Pós-Graduação em Nutrição Clínica, Carga horária: 10, Regime: Parcial.
Responsável pelas disciplinas:
"Necessidades e recomendações nutricionais"
“Nutrigenômica e Biodisponibilidade"
“Alimentos funcionais e Suplementação”

2. Conselho Regional de Nutricionistas da 3ª região - CRN3

Vínculo institucional

2018 - Atual Vínculo: Membro da Câmara Técnica de Consultoria Científica, Enquadramento funcional: Consultora Científica , Carga horária: 4, Regime: Parcial

3. Universidade Guarulhos - UNG

Vínculo institucional

2018 - Atual Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Professora , Carga horária: 10, Regime: Parcial
Responsável pelas disciplinas:
"Educação Nutricional"
"Tópicos Integradores em Nutrição"
"Trabalho de Conclusão de Curso II"

4. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2017 - 2018 Vínculo: Voluntário, Enquadramento funcional: Representante discente na Comissão Coordenadora do Programa de Ciência dos Alimentos – CCP (FCF/USP)

2017 - 2017 Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Monitora da disciplina de Bromatologia Básica, Carga horária: 6

2014 - 2018 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Pós Graduação - Doutorado, Carga horária: 20

2012 - 2014 Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Pós Graduação - Mestrado, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

5. Universidade Federal de Sergipe - UFS

Vínculo institucional

2009 - 2010 Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20

Projetos

Projetos de pesquisa

2014 - 2018 Expressão de microRNA circulantes em mulheres com excesso de peso suplementadas com castanha-do-brasil

Situação: Concluído
Alunos envolvidos: Graduação (2); Doutorado (2);
Integrantes: Bruna Zavarize Reis; Graziela Biude Silva; Silvia Maria Franciscato Cozzolino (Responsável); Marcelo Macedo Rogero; Cintia Cercato
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

2014 - 2018 **Efeito da suplementação de castanha-do-brasil (Bertholettia excelsa H.B.K.) sobre a inflamação, o estresse oxidativo e a expressão de selenoproteína P e microRNAs em mulheres obesas**

Situação: Concluído
Alunos envolvidos: Graduação (1); Doutorado (2);
Integrantes: Bruna Zavarize Reis; Graziela Biude Silva; Silvia Maria Franciscato Cozzolino (Responsável); Marcelo Macedo Rogero
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

2012 - 2014 **Avaliação do estado nutricional relativo ao zinco em crianças e sua relação com a expressão gênica das proteínas transportadoras de zinco ZnT1 (SLC30A1) e ZIP4 (SLC39A4).**

Situação: Concluído
Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1);
Integrantes: Bruna Zavarize Reis; Silvia Maria Franciscato Cozzolino (Responsável)
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES

2011 – Atual **Avaliação do potencial de utilização de alimentos biofortificados na alimentação escolar.**

Situação: Em andamento
Alunos envolvidos: Graduação (2); Mestrado acadêmico (2); Doutorado (2);
Integrantes: Bruna Zavarize Reis; Diva Aliete dos Santos Vieira; Raquel Simões Mendes-Netto (Responsável); Danielle Goes da Silva; Silvia Maria Franciscato Cozzolino
Financiador(es): Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA, Fundação Arthur Bernardes-FUNARBE

2009 - 2010 **Práticas Alimentares, Perfil Dietético e Antropométrico de Usuários de Um Programa de Atividade Física Regular (Academia da Cidade)**

Situação: Concluído
Alunos envolvidos: Graduação (6);
Integrantes: Bruna Zavarize Reis; Pryscila Dryele; Diva Aliete dos Santos Vieira; Dayanne da Costa; Jamille Oliveira Costa; Raquel Simões Mendes Netto (Responsável); Maria Edivânia Alves dos Santos

2009 - 2010 **Efeito da orientação nutricional em indivíduos engajados no programa de atividade física regular**

Situação: Concluído
Alunos envolvidos: Graduação (5);
Integrantes: Bruna Zavarize Reis; Diva Aliete dos Santos Vieira; Dayanne da Costa; Jamille O. Costa; Pryscila Dryelle Sousa Teixeira; Elma Regina Andrade-Wartha; Raquel Simões Mendes-Netto (Responsável)
Financiador(es): Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe-FAPITEC/SE

PROJETOS DE EXTENSÃO

2009 - 2009 **Educação alimentar como ferramenta para adoção de hábitos alimentares saudáveis entre usuários de um programa de atividade física regular 'Academia da Cidade'**

Situação: Concluído
Alunos envolvidos: Graduação (5);
Integrantes: Bruna Zavarize Reis; Pryscila Dryele; Diva Aliete dos Santos Vieira; Dayanne da Costa; Jamille Oliveira Costa; Raquel Simões Mendes Netto (Responsável)
Financiador(es): Universidade Federal de Sergipe-UFS

Revisor de periódico

1. Contextos da Alimentação (ISSN 2238-4200)

2015 - 2015 Regime: Parcial

Áreas de atuação

1. Análise Nutricional de População
2. Genômica Nutricional
3. Bioquímica da Nutrição
4. Biodisponibilidade de Nutrientes

Idiomas

Inglês Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

Espanhol Compreende Razoavelmente , Fala Pouco , Lê Bem

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. COSTA, NARA ALINE; CUNHA, NATÁLIA BARALDI; GUT, ANA LUCIA; AZEVEDO, PAULA SCHMIDT; POLEGATO, BERTHA FURLAN; ZORNOFF, LEONARDO ANTONIO MAMEDE; RUPP DE PAIVA, SERGIO ALBERTO; REIS, **BRUNA ZAVARIZE**; FERNANDES, ANA ANGELICA HENRIQUE; ROGERO, MARCELO MACEDO; NORDE, MARINA MAINTINGUER; MINICUCCI, MARCOS FERREIRA. Erythrocyte SOD1 activity, but not SOD1 polymorphisms, is associated with ICU mortality in patients with septic shock. **Free Radical Biology and Medicine**, v.124, p.199 - 204, 2018.

2. QUINTANILHA, B. J.; **REIS, BRUNA Z.**; DUARTE, G. B. S.; COZZOLINO, SILVIA M.F.; ROGERO, M. M. Nutrimiromics: Role of microRNAs and Nutrition in Modulating Inflammation and Chronic Diseases. **Nutrients**, v.9, p. 1168, 2017.

3. CARDOSO, BÁRBARA R.; SILVA DUARTE, GRAZIELA B.; **REIS, BRUNA Z.**; COZZOLINO, SILVIA M.F. Brazil nuts: Nutritional composition, health benefits and safety aspects. **Food Research International**, v.100, p.9 - 18, 2017.

4. ROCHA, ARIANA V.; RITA CARDOSO, BÁRBARA; **ZAVARIZE, BRUNA**; ALMONDES, KALUCE; BORDON, ISABELLA; HARE, DOMINIC J.; TEIXEIRA FAVARO, DÉBORAH INÊS; FRANCISCATO COZZOLINO, SILVIA MARIA. GPX1 Pro198Leu polymorphism and GSTM1 deletion do not affect selenium and mercury status in mildly exposed Amazonian women in an urban population. **Science of the Total Environment**, v.571, p.801 - 808, 2016.

5. SILVA, G. B.; **REIS, B. Z.**; COZZOLINO, S. M. F. Micronutrients Deficiencies in Rheumatoid Arthritis Patients. **International Journal of Pathology and Clinical Research**, v.2, p.1 - 5, 2016.

6. TEIXEIRA, P. D. S.; **REIS, B. Z.**; VIEIRA, D. A. S.; COSTA, D.; COSTA, J. O.; RAPOSO, O.F.F.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; MENDES-NETTO, R. S. Intervenção nutricional educativa como ferramenta eficaz para mudança de hábitos alimentares e peso corporal entre praticantes de atividade física. **Ciencia & Saude Coletiva**, v.18, p.347, 2013.

7. **ZAVARIZE REIS, BRUNA**; COSTA, DAYANNE DA; SANTOS VIEIRA, DIVA ALIETE DOS; OLIVEIRA COSTA, JAMILLE; SOUSA TEIXEIRA, PRYSCILA DRYELLE; FALCÃO RAPOSO, OSCAR FELIPE; MENDES-NETTO, RAQUEL SIMÕES. Diet composition is associated with obesity in active women. **Revista Chilena de Nutrición** (Impresa), v.39, p.126 - 135, 2012.

8. COSTA, D.; **REIS, B. Z.**; VIEIRA, D. A. S.; COSTA, J. O.; TEIXEIRA, P. D. S.; RAPOSO, O.F.F.; LIMA, F. E. L.; MENDES-NETTO, R. S. Índice de qualidade da dieta de mulheres usuárias de um programa de atividade física regular 'Academia da Cidade', Aracajú, SE. **Revista de Nutricao** (*Brazilian Journal of Nutrition*), v.25, p.731 - 741, 2012.

9. COSTA, J. O.; **REIS, B. Z.**; COSTA, D.; VIEIRA, D. A. S.; TEIXEIRA, P. D. S.; RAPOSO, O.F.F.; MENDES-NETTO, R. S. Perfil de saúde, estado nutricional e nível de conhecimento em nutrição de usuárias do Programa Academia da Cidade - Aracaju, SE. **Revista Brasileira de Atividade Física e Saúde**, v.17, p.93 - 99, 2012.

10. **REIS, B. Z.**; TEIXEIRA, P. D. S.; VIEIRA, D. A. S.; COSTA, J. O.; COSTA, D.; RAPOSO, O.F.F.; MENDES-NETTO, R. S. Associação de medidas antropométricas para diagnosticar a obesidade em mulheres usuárias de um Programa de atividade física regular "Academia da Cidade", Aracaju, SE. **Scientia Plena**, v.7, p.1 - 8, 2011.

11. MENDES-NETTO, R. S.; TEIXEIRA, P. D. S.; **REIS, BRUNA ZAVARIZE**; VIEIRA, D. A. S.; COSTA, D.; COSTA, J. O. Ações Educativas para Promoção de Hábitos Alimentares Saudáveis: relato de uma experiência. **Revista de Extensão da UFS**, v.1, p.191, 2013.

Livros publicados

1. MENDES-NETTO, R. S.; **REIS, B. Z.**; VIEIRA, D. A. S.; BRAGA, W. C.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S. **Receitas Biofortificadas**. Brasília: EMBRAPA, 2013, v.1. p.54.

Capítulos de livros publicados

1. DUARTE, G. B. S.; **REIS, BRUNA ZAVARIZE**; COZZOLINO, SILVIA M.F. **Recomendações de minerais e vitaminas.** In: Recomendações nutricionais: nos estágios de vida e nas doenças crônicas não transmissíveis. 1 ed. Barueri, SP: Manole, 2017, v.1, p. 54-83.

2. COMINETTI, C.; **REIS, BRUNA ZAVARIZE**; COZZOLINO, S. M. F. **Zinco.** In: Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes. 2 ed. São Paulo: ILSI Brasil, 2017, v.7, p. 9-32.

3. **REIS, B. Z.**; PIRES, L. V.; COZZOLINO, S. M. F. **Vitamina K.** In: Biodisponibilidade de Nutrientes. 5 ed. Barueri: Manole, 2016, v.1, p. 393.

4. SILVA, G. B.; **REIS, B. Z.**; COZZOLINO, S. M. F. **Zinco.** In: Biodisponibilidade de Nutrientes. 5 ed. Barueri: Manole, 2016, p. 729.

5. **REIS, BRUNA ZAVARIZE**; SILVA, G. B.; COZZOLINO, S. M. F. **Zinco.** In: Genômica Nutricional: dos fundamentos à nutrição molecular. 1 ed. Barueri, SP: Manole, 2016, v.1, p. 1-528.

6. GUERREIRO, L. M. G.; **REIS, B. Z.**; MENDES-NETTO, RAQUEL SIMÕES. **Estratégias Nutricionais para Prevenção de Lesões Musculares e Articulares**. In: Tratado de Nutrição Esportiva Funcional. 1 ed. São Paulo: Roca, 2014, v.1, p. 353-363.

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. TEIXEIRA, P. D. S.; **REIS, B. Z.**; COSTA, D.; VIEIRA, D. A. S.; COSTA, J. O.; MENDES-NETTO, R. S. Ação educativa para promoção de Hábitos Alimentares Saudáveis. In: VII Semana de Extensão da UFS, 2010, São Cristóvão. Anais Eletrônicos, 2010. v.7.

2. **REIS, B. Z.**; TEIXEIRA, P. D. S.; CAROSO, J.; COSTA, D.; VIEIRA, D. A. S.; COSTA, J. O.; MENDES-NETTO, R. S. Promovendo hábitos alimentares saudáveis: Elaboração de material educativo In: VI Semana de Extensão, 2009, Aracaju. Anais Eletrônicos. São Cristóvão, 2009.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. DUARTE, G. B. S.; **ZAVARIZE REIS, BRUNA**; CERCATO, C.; ROGERO, M. M.; COZZOLINO, SILVIA M.F. Brazilian nut intake has no influence on body composition in obese women. In: IUNS - 21st International Congress of Nutrition, 2017, Buenos Aires. Annals of Nutrition & Metabolism. Basel (Switzerland): S. Karger, 2017. v.71. p.1142.

2. DUARTE, G. B. S.; **REIS, B. Z.**; VARGAS-MENDEZ, E.; CERCATO, C.; ROGERO, M. M.; COZZOLINO, SILVIA M.F. Efeito do consumo da castanha-do-brasil nas concentrações plasmáticas de selenoproteina P em mulheres obesas. In: 14º CONGRESSO NACIONAL DA SBAN, 2017, São Paulo. Resumo dos Trabalhos Científicos, 2017. p.259.

3. **REIS, BRUNA ZAVARIZE**; DUARTE, G. B. S.; VARGAS-MENDEZ, E.; CERCATO, C.; ROGERO, M. M.; COZZOLINO, SILVIA M.F. Influência do consumo regular de castanha-do-brasil na expressão plasmática do miR-584-5p em mulheres obesas. In: 14º CONGRESSO NACIONAL DA SBAN, 2017, São Paulo. Resumo dos trabalhos científicos, 2017. p.69.

4. **ZAVARIZE REIS, BRUNA**; DUARTE, G. B. S.; VARGAS-MENDEZ, E.; PEREIRA, N. B. F.; CERCATO, C.; ROGERO, M. M.; COZZOLINO, SILVIA M.F. Micronutrients intake, body composition, and lipoprotein-lipid concentrations in obese women. In: IUNS - 21st International Congress of Nutrition, 2017, Buenos Aires. Annals of Nutrition & Metabolism. Basel (Switzerland): S. Karger, 2017. v.71. p.1104 – 1105.

5. COZZOLINO, S. M. F.; DUARTE, G. B. S.; **REIS, BRUNA ZAVARIZE**; PIMENTEL, A. C.; ALBUQUERQUE, L. G. R.; OLIVEIRA, P. V. Selenium concentration in Brazil nuts: Are there differences according to country regions? In: 16th International Symposium on Trace Elements in Man and Animals, 2017, Saint-Petersburg, Russia. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. Minuch, Germany: Elsevier, 2017. v.41S1. p.27.

6. SILVA, G. B.; **REIS, B. Z.**; MIFUNE, J.; VARGAS-MENDEZ, E.; CERCATO, C.; ROGERO, M. M.; COZZOLINO, S. M. F. Brazilian nut intake improves glutatione peroxidase 1 activity in obese women. In: 6th International Symposium of the Federation of European Societies on Trace Elements and Minerals (FESTEM), 2016, Catania, Italy. New Horizons On Trace Elements And Minerals Role In Human And Animal Health. FESTEM, 2016. v.6. p.130.

7. **REIS, B. Z.**; SILVA, G. B.; MIFUNE, J.; VARGAS-MENDEZ, E.; CERCATO, C.; ROGERO, M. M.; COZZOLINO, S. M. F. Brazilian nut intake influence the lipid profile of obese women. In: 6th International Symposium of the Federation of European Societies on Trace Elements and Minerals (FESTEM), 2016, Catania, Italy. New Horizons On Trace Elements And Minerals Role In Human And Animal Health. FESTEM, 2016. v.6. p.131.

8. **REIS, BRUNA ZAVARIZE**; VIEIRA, D. A. S.; COSTA, D.; MENDES-NETTO, R. S.; COZZOLINO, S. M. F. Expressão gênica de transportadores de zinco e sua relação com o estado nutricional em crianças pré-escolares. In: GANEPÃO 2016, São Paulo. Revista Brasileira de Nutrição Clínica. São Paulo, SP: Sociedade Brasileira de

Nutrição Parenteral e Enteral (SBNPE), 2016. v.31. p.51.

9. **REIS, B. Z.**; VIEIRA, D. A. S.; COSTA, D.; SILVA, D. G.; MENDES-NETTO, R. S.; COZZOLINO, S. M. F. Biodisponibilidade de zinco na dieta de crianças pré-escolares e sua relação com biomarcadores sanguíneos. In: 13º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - S, 2015, São Paulo. Nutrire. São Paulo: SBAN, 2015. v.40. p.360.

10. **REIS, B. Z.;** VIEIRA, D. A. S.; COSTA, D.; SILVA, D. G.; MENDES-NETTO, R. S.; COZZOLINO, S. M. F. Prevalence of zinc deficiency and stunting among preschool children. In: Bioavailability 2014, Foz do Iguaçu. Nutrire. São Paulo: SBAN, 2014. v.39. p.17.

11. ROCHA, A. V.; ALMONDES, K. G. S.; ALMEIDA, I. S.; **REIS, B. Z.;** COZZOLINO, S. M. F.; FAVARO, D. I. T. Selenium nutritional status of women living in risk area of mercury contamination. In: Bioavailability 2014, Foz do Iguaçu. Nutrire. São Paulo: SBAN, 2014. v.39. p.41.

12. VIEIRA, D. A. S.; **REIS, B. Z.;** TEIXEIRA, P. D. S.; COSTA, D.; MENDES-NETTO, R. S.; FISBERG, R. M. Agreement between methods of body composition evaluation in women practitioners of regular physical activity. In: XVI Congreso Latinoamericano de Nutrición, 2012, Havana, Cuba. Anais do XVI Congreso Latinoamericano de Nutrición, 2012.

13. **REIS, B. Z.;** SILVA, G. B.; ALMEIDA, I. S.; COZZOLINO, S. M. F. ARG213GLY polymorphism in EC-SOD gene and its relationship with cardiovascular disease. In: 6th Congress of the International Society of Nutrigenetics/Nutrigenomics, 2012, São Paulo. Annals of the 6th Congress of the International Society of Nutrigenetics/Nutrigenomics, 2012.

14. **REIS, B. Z.;** TEIXEIRA, P. D. S.; VIEIRA, D. A. S.; COSTA, J. O.; COSTA, D.; RAPOSO, O.F.F.; MENDES-NETTO, R. S. Índice de conicidade associado a variáveis antropométricas para predizer o risco associado à obesidade em mulheres adultas. In: World Nutrition Rio2012, Rio de Janeiro, 2012.

15. VIEIRA, D. A. S.; COSTA, D.; **REIS, B. Z.;** COSTA, J. O.; TEIXEIRA, P. D. S.; MENDES-NETTO, R. S. Ângulo de fase como indicador de saúde em mulheres participantes de um programa regular de atividade física. In: 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, 2011, Fortaleza. Nutrire. São Paulo: SBAN, 2011. v.36.

16. TEIXEIRA, P. D. S.; **REIS, B. Z.;** VIEIRA, D. A. S.; COSTA, D.; COSTA, J. O.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; RAPOSO, O.F.F.; MENDES-NETTO, R. S. Conhecimento em nutrição após participação em um programa de intervenção nutricional In: 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, 2011, Fortaleza. Nutrire. São Paulo: SBAN, 2011. v.36.

17. MENDES-NETTO, R. S.; COSTA, J. O.; **REIS, B. Z.;** COSTA, D.; VIEIRA, D. A. S.; TEIXEIRA, P. D. S.; RAPOSO, O.F.F. Índice de massa corporal e circunferência da cintura como preditores da hipertensão arterial em mulheres praticantes de atividade física. In: 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, 2011, Fortaleza. Nutrire. São Paulo: SBAN, 2011. v.36.

18. MENDES-NETTO, R. S.; COSTA, D.; **REIS, B. Z.;** VIEIRA, D. A. S.; COSTA, J. O.; TEIXEIRA, P. D. S.; RAPOSO, O.F.F.; LIMA, F. E. L. Índice de qualidade da dieta de usuárias de um programa de atividade física regular In: 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, 2011, Fortaleza. Nutrire. São Paulo: SBAN, 2011. v.36.

19. **REIS, B. Z.;** TEIXEIRA, P. D. S.; COSTA, D.; VIEIRA, D. A. S.; COSTA, J. O.; MENDES-NETTO, R. S. Prevalência de ingestão inadequada de micronutrientes de mulheres participantes de um programa de atividade física regular. In: 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, 2011, Fortaleza. Nutrire. São Paulo: SBAN, 2011. v.36.

20. LOURENÇO, R.P.; **REIS, B. Z.;** TEIXEIRA, P. D. S.; COSTA, D.; VIEIRA, D. A. S.; COSTA, J. O.; RAPOSO, O.F.F.; MENDES-NETTO, R. S. Análise dos indicadores antropométricos para diagnosticar a obesidade em mulheres usuárias de um programa de atividade física regular “Academia da Cidade”, Aracaju, SE. In: 20º Encontro

de Iniciação Científica da UFS, 2010, São Cristóvão. Livro de resumos. São Cristóvão: 2010. v.20. p.551.

21. **REIS, B. Z.;** TEIXEIRA, P. D. S.; COSTA, D.; VIEIRA, D. A. S.; COSTA, J. O.; MENDES-NETTO, R. S. Avaliação dietética e antropométrica de mulheres usuárias de um programa de atividade física regular "Academia da Cidade". Aracaju, SE. In: 20º Encontro de Iniciação Científica da UFS, 2010, São Cristóvão. Livro de resumos. São Cristóvão: 2010. v.20. p.106.

22. SANTOS, M. E. A.; TEIXEIRA, P. D. S.; **REIS, B. Z.;** COSTA, D.; VIEIRA, D. A. S.; COSTA, J. O.; MENDES-NETTO, R. S. Análise do balanço energético em mulheres adultas do programa Academia da Cidade. In: 19º encontro de Iniciação Científica, 2009, Aracaju. Livro de resumos. São Cristóvão: 2009. v.19. p.555.

23. MENDES-NETTO, R. S.; **REIS, B. Z.;** COSTA, D.; VIEIRA, D. A. S.; COSTA, J. O.; TEIXEIRA, P. D. S. Comparação da gordura corporal predita por Índice de Massa Corporal, espessuras de dobras cutâneas e Bioimpedância. In: XV Congreso Latinoamericano de Nutrición, 2009, Santiago. Revista Chilena de Nutrición (Impresa). Santiago, Chile: 2009. v.36. p.745.

24. TEIXEIRA, P. D. S.; **REIS, B. Z.;** CAROSO, J.; COSTA, D.; VIEIRA, D. A. S.; COSTA, J. O.; MENDES-NETTO, R. S. Comparação entre dois indicadores de obesidade centralizada em mulheres usuárias de um programa de atividade física regular. In: 19º encontro de Iniciação Científica, 2009, Aracaju. Livro de resumos. São Cristóvão: 2009. v.19. p.556.

25. **REIS, B. Z.;** COSTA, D.; VIEIRA, D. A. S.; COSTA, J. O.; TEIXEIRA, P. D. S.; MENDES-NETTO, R. S. Nível de conhecimento nutricional de integrantes do Programa Academia da Cidade. In: 10º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, 2009, São Paulo. Nutrire. São Paulo: 2009. v.34. p.437.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. GOIS, I. C. M.; VIEIRA, D. A. S.; **REIS, B. Z.;** MENDES-NETTO, R. S.; SILVA, D. G. Aceitabilidade de alimentos regionais em grupos de escolares. In: XXII Congresso Nacional de Nutrição, 2012, Olinda/PE. Anais do XXII Congresso Nacional de Nutrição, 2012. v.4.

2. NASCIMENTO, V. T.; **REIS, B. Z.;** VIEIRA, D. A. S.; MENDES-NETTO, R. S.; SILVA, D. G. Educação nutricional com pré-escolares de instituições filantrópicas de Aracaju-SE. In: XXII Congresso Nacional de Nutrição, 2012, Olinda/PE. Anais do XXII Congresso Nacional de Nutrição, 2012. v.4.

3. MATOS, R. C.; BRAGA, W. C.; **REIS, B. Z.;** RAPOSO, O.F.F.; MENDES-NETTO, R. S. Perfil antropométrico de judocas adolescentes de alto nível participantes do campeonato brasileiro de judô. In: XXII Congresso Brasileiro de Nutrição, 2012, Recife. Anais do XXII Congresso Brasileiro de Nutrição. São Paulo: ASBRAN, 2012. v.4.

4. MACHADO, A. C. S. B.; LEITE, M. M. R.; **REIS, B. Z.;** MENDES-NETTO, R. S. Elaboração de material educativo para promoção da alimentação saudável entre adolescentes praticantes de atividade física In: VIII Semana de Extensão da UFS, 2011, São Cristóvão. Anais Eletrônicos da VIII Semex. São Cristóvão: UFS, 2011. v.8.

Artigos em jornal de notícias

1. **REIS, BRUNA ZAVARIZE**; DUARTE, G. B. S.; COZZOLINO, S. M. F. Castanha-do-brasil como suplementação natural de selênio. Notícias - ILSI Brasil. p.5, 2017.

Artigos em revistas (Magazine)

1. **REIS, BRUNA ZAVARIZE**. Horário certo para fechar a boca. Mente Cérebro. São Paulo, p.22, 2017.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **REIS, BRUNA Z.** Biodisponibilidade de micronutrientes em Nutrição. 2018. (Palestrante)

2. **REIS, BRUNA Z.** Zinco e Risco Cardiovascular. 2018. (Conferencista)

3. **REIS, BRUNA ZAVARIZE.** Glúten engorda? 2017. (Palestrante)

4. **REIS, BRUNA ZAVARIZE.** Óleo de Coco: faz bem ou não? 2017. (Palestrante)

5. SILVA, G. B.; **REIS, B. Z.;** MIFUNE, J.; VARGAS-MENDEZ, E.; CERCATO, C.; ROGERO, M. M.; COZZOLINO, S. M. F. Brazilian nut intake improves glutatione peroxidase 1 activity in obese women, 2016. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)

6. **REIS, B. Z.;** SILVA, G. B.; MIFUNE, J.; VARGAS-MENDEZ, E.; CERCATO, C.; ROGERO, M. M.; COZZOLINO, S. M. F. Brazilian nut intake influence the lipid profile of obese women, 2016. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)

2. **REIS, BRUNA ZAVARIZE.** Biodisponibilidade de Micronutrientes e Doença Cardiovascular. 2015. (Conferencista)

7. MARINS, M. L. C. L.; COSTA, D.; VIEIRA, D. A. S.; **REIS, B. Z.;** MENDES-NETTO, R. S.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S. Aceitabilidade de variedade de arroz biofortificado cozido, 2012. (Comunicação, Apresentação de Trabalho)

8. **REIS, B. Z.;** TEIXEIRA, P. D. S.; VIEIRA, D. A. S.; COSTA, J. O.; COSTA, D.; RAPOSO, O.F.F.; MENDES-NETTO, R. S. Índice de conicidade associado a variáveis antropométricas para predizer o risco associado à obesidade em mulheres adultas, 2012. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

3. **REIS, BRUNA ZAVARIZE.** Apresentação de trabalho científico, 2011. (Comunicação, Apresentação de Trabalho)

9. MACHADO, A. C. S. B.; LEITE, M. M. R.; **REIS, B. Z.;** MENDES-NETTO, R. S. Elaboração de material educativo para promoção da alimentação saudável entre adolescentes praticantes de atividade física, 2011. (Comunicação, Apresentação de Trabalho)

10. NETTO, R. S. M.; COSTA, J. O.; **REIS, B. Z.;** COSTA, D.; VIEIRA, D. A. S.; TEIXEIRA, P. D. S.; RAPOSO, O.F.F. Índice de massa corporal e circunferência da cintura como preditores da hipertensão arterial em mulheres praticantes de atividade física, 2011. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

11. **REIS, BRUNA ZAVARIZE**. Interfaces da Nutrição na Odontologia, 2011. (Palestrante)

12. TEIXEIRA, P. D. S.; **REIS, B. Z.;** VIEIRA, D. A. S.; COSTA, D.; COSTA, J. O.; MENDES-NETTO, R. S. Ação educativa para promoção de Hábitos Alimentares Saudáveis, 2010. (Comunicação, Apresentação de Trabalho)

13. **REIS, B. Z.;** CAROSO, J.; COSTA, D.; TEIXEIRA, P. D. S.; COSTA, J. O.; MENDES-NETTO, R. S.; VIEIRA, D. A. S. Promovendo hábitos alimentares saudáveis: elaboração de material educativo., 2009. (Comunicação, Apresentação de Trabalho)

Produção técnica

Entrevistas, mesas redondas, programas e comentários na mídia

1. **REIS, BRUNA ZAVARIZE**. Dieta Low Carb: Farsa ou Solução? 2018.

2. **REIS, B. Z.** Quais são as diferenças nutricionais entre as fontes de proteína vermelha e vegetal? 2017.

3. **REIS, BRUNA ZAVARIZE**. Riscos e Benefícios do Jejum, 2017.

4. **REIS, BRUNA ZAVARIZE**. Tudo o que você queria saber sobre jejum intermitente, 2017.

5. **REIS, BRUNA Z**. Veja dicas para fazer parte dos 10% que mantêm o peso após dieta, 2017.

Demais produções técnicas

1. MENDES-NETTO, R. S.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; **REIS, B. Z.;** VIEIRA, D. A. S. Oficina de Capacitação de Merendeiras, 2011. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

2. **REIS, B. Z.;** DRYELE, P.; OLIVEIRA, J.; VIEIRA, D. A. S.; COSTA, D.; NETTO, R. S. M. Alimentação Saudável: Pratique este hábito, 2009. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional)

Educação e Popularização de C&T

Artigos em revistas (Magazine)

1. **REIS, BRUNA ZAVARIZE**. Horário certo para fechar a boca. Mente Cérebro. São Paulo, p.22, 2017.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **REIS, BRUNA ZAVARIZE**. Glúten engorda? 2017. (Palestra)

2. **REIS, BRUNA ZAVARIZE**. Óleo de coco: faz bem ou não? 2017. (Palestra)

Entrevistas, mesas redondas, programas e comentários na mídia

1. **REIS, BRUNA ZAVARIZE**. Dieta Low Carb: Farsa ou Solução? 2018. (Entrevista, Programa de Rádio ou TV)

2. **REIS, B. Z.** Quais são as diferenças nutricionais entre as fontes de proteína vermelha e vegetal? 2017. (Programa, Programa de Rádio ou TV)

3. **REIS, BRUNA ZAVARIZE**. Riscos e Benefícios do Jejum. 2017. (Entrevista, Programa de Rádio ou TV)

4. **REIS, BRUNA ZAVARIZE**. Tudo o que você queria saber sobre jejum intermitente. 2017. (Entrevista, Programa de Rádio ou TV)

5. **REIS, BRUNA Z.** Veja dicas para fazer parte dos 10% que mantêm o peso após dieta. 2017. (Comentário, Programa de Rádio ou TV)

Participação em eventos, congressos, exposições, feiras e olimpíadas

1. Simposista no(a) Mitos e Verdades sobre Alimentos, 2018. (Oficina): Óleo de Coco.

2. Simposista no(a) Mitos e Verdades sobre Alimentos, 2018. (Oficina): Glúten.

3. Simposista no(a) Mitos e Verdades sobre Alimentos, 2017. (Oficina): Óleo de coco: faz bem ou não?

4. Simposista no(a) Mitos e Verdades sobre Alimentos, 2017. (Oficina): Glúten engorda?

Eventos

Participação em eventos

1. Ganepão 2018: 8º ICNO/CBNC - International Conference of Nutritional Oncology / Congresso Brasileiro de Nutrição em Câncer e 2º NEXSA - Congresso Internacional de Nutrição, Exercício e Saúde, 2018. (Congresso)

2. I International Symposium on Citrus Bioactive compounds and health benefits, 2018. (Simpósio)

3. Simposista no(a) Mitos e Verdades sobre Alimentos, 2018. (Oficina): Glúten.

4. Simposista no(a) Mitos e Verdades sobre Alimentos, 2018. (Oficina): Óleo de Coco.

5. Conferencista no(a) XXXIX CONGRESSO DA SOCIEDADE DE CARDIOLOGIA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2018. (Congresso): Zinco e Risco Cardiovascular.

6. Simposista no(a) XXXVII Jornada de Estudos em Nutrição, 2018. (Encontro): Biodisponibilidade de Micronutrientes em Nutrição.

7. Simposista no(a) Mitos e Verdades sobre Alimentos, 2017. (Oficina): Glúten engorda?

8. Simposista no(a) Mitos e Verdades sobre Alimentos, 2017. (Oficina): ÓLEO DE COCO: faz bem ou não?.

9. Conferencista no(a) XXI Congresso Brasileiro de Nutrologia, 2017. (Congresso): Micronutrientes e Bioativos dos Cereais Integrais.

10. Conferencista no(a) XXXVI JORNADA DE ESTUDOS EM NUTRIÇÃO, 2017. (Encontro): Biodisponibilidade de Nutrientes.

11. Conferencista no(a) Fórum Regional do CRN-3 – Bauru e Região, 2016. (Encontro): Biodisponibilidade de Micronutrientes.

12. Conferencista no(a) Fórum Regional do CRN-3 – Campinas e Região, 2016. (Encontro): Biodisponibilidade de Micronutrientes.

13. Conferencista no(a) Fórum Regional do CRN-3 – Ribeirão Preto, 2016. (Encontro): Biodisponibilidade de Micronutrientes.

14. Apresentação de Poster no(a) GANEPÃO 2016, 2016. (Congresso): Expressão gênica de transportadores de zinco e sua relação com o estado nutricional em crianças pré-escolares.

15. Apresentação de Poster no(a) 13º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - S, 2015. (Congresso): Biodisponibilidade de zinco na dieta de crianças pré-escolares e sua relação com biomarcadores sanguíneos.

16. 2º Fórum Nacional de Nutrição - LIDE, 2015. (Simpósio)

17. 4th International Conference on Selenium in the Environment and Human Health, 2015. (Congresso)

18. Conferencista no(a) Curso Plantas Medicinais e Fitoterapia, 2015 - A contribuição dos alimentos na manutenção da saúde.

19. XXII SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO NO CONGRESSO DA SOCESP, 2015. (Simpósio)

20. Conferencista no(a) XXXVI CONGRESSO DA SOCIEDADE DE CARDIOLOGIA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2015. (Congresso): Biodisponibilidade de Micronutrientes e Doença Cardiovascular.

21. Apresentação de Poster no(a) Bioavailability 2014, 2014. (Congresso): Prevalence of zinc deficiency and stunting among preschool children.

22. Debate ILSI Brasil: Edulcorantes, 2014. (Encontro)

23. III Meeting Brasileiro de Nutrição Esportiva, 2014. (Encontro)

24. XVIII Congresso Brasileiro de Nutrologia, 2014. (Congresso)

25. Quantificação da Expressão Gênica: Métodos e Ferramentas de Análises Avançados, 2013. (Oficina)

26. Understanding food intake and food choice, 2013. (Simpósio)

27. Apresentação de Poster no(a) 6th Congress of the International Society of Nutrigenetics/Nutrigenomics, 2012. (Congresso): ARG213GLY polymorphism in EC-SOD gene and its relationship with cardiovascular disease.

28. Encontro SBAN: Nutrição Clínica, 2012. (Encontro)

29. Espectrometria de Absorção Atômica: Fundamentos e Aplicações, 2012. (Seminário)

30. Estatísitica Aplicada a Nutrição, 2012. (Oficina)

31. NUTRITIONAL GENOMICS INTRODUCTORY WORKSHOP, 2012. (Oficina)

32. Semana de Inovações Biológicas e Biotecnológicas Aplicadas à Saúde, 2012. (Seminário).

33. Seminário sobre Segurança Alimentar e Nutricional, 2012. (Seminário).

34. World Nutrition Rio 2012. (Congresso): Índice de conicidade associado a variáveis antropométricas para predizer o risco associado à obesidade em mulheres adultas.

35. Apresentação de Poster no(a) XVI Congreso Latinoamericano de Nutrición, 2012. (Congresso): Agreement between methods of body composition evaluation in women practitioners of regular physical activity.

36. XVI Congresso Brasileiro de Nutrologia, 2012. (Congresso).

37. Apresentação de Poster no(a) XXII Congresso Nacional de Nutrição, 2012. (Congresso): Educação nutricional com pré-escolares de instituições filantrópicas de Aracaju-SE.

38. Apresentação de Poster no(a) 11º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, 2011. (Congresso). Conhecimento em nutrição após participação em um programa de intervenção nutricional.

39. Contagem de Carboidratos na Prática Clínica, 2011. (Oficina).

40. Conferencista no(a) I Semana Interdisciplinar da Faculdade Estácio de Sergipe/Fase, 2011. (Outra): Composição da dieta e obesidade.

41. II Curso de extensão: Elaboração de trabalhos acadêmicos, 2011. (Outra).

42. Conferencista no(a) IX Curso de Atualização em Clínica Odontológica, 2011. (Seminário): Interfaces da

Nutrição na Odontologia.

43. VIII Semana de Extensão da UFS, 2011. (Encontro): Elaboração de material educativo para promoção da alimentação saudável entre adolescentes praticantes de atividade física.

44. Workshop: Micronutrientes, 2011. (Oficina).

45. 20º Encontro de Iniciação Científica da UFS, 2010. (Encontro): Avaliação dietética e atropométrica de mulheres usuárias de um programa de atividade física regular.

46. Curso de elaboração de Manual de Boas Práticas e Procedimentos Operacionais Padronizados (POPs) para Unidades Produtoras de Refeições, 2010. (Outra).

47. I Encontro Científico do Centro Especializado de Nutrição, 2010. (Encontro).

48. II Jornada de Terapia Nutricional do Hospital São Lucas, 2010. (Simpósio).

49. II Simpósio Sergipano de Terapia Intensiva, 2010. (Simpósio).

50. Perspectivas da Nutrição na era Pós-Genoma, 2010. (Simpósio).

51. VII Semana de Extensão da UFS, 2010. (Encontro): Ação educativa para promoção de Hábitos Alimentares Saudáveis.

52. Apresentação de Poster no(a) 10º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, 2009. (Congresso): Nível de conhecimento nutricional de integrantes do programa Academia da Cidade.

53. Apresentação de Poster no(a) 19º Encontro de Iniciação Científica, 2009. (Encontro): Comparação entre dois indicadores antropométricos de obesidade centralizada em mulheres usuárias de um programa de atividade física regular.

54. Aplicações de análises de regressão múltipla, 2009. (Oficina).

55. III Encontro Sergipano de Nutrição: "Faces da Nutrição", 2009. (Encontro).

56. VI Semana de Extensão, 2009. (Encontro): Promovendo hábitos alimentares saudáveis: Elaboração de material educativo.

57. Apresentação de Poster no(a) XV Congreso Latinoamericano de Nutrición, 2009. (Congresso): Comparação da gordura corporal predita por índice de massa corporal, espessuras de dobras cutâneas e bioimpedância.

58. Aplicações Práticas Avançadas da Nutrição Funcional no Tratamento e Prevenção da Obesidade, 2008. (Seminário).

59. II Encontro Sergipano de Nutrição, 2008. (Encontro).

60. IV Congresso Nacional de Nutrição, 2008. (Congresso).

61. Seminário de Capacitação dos Conselhos Municipais de Segurança Alimentar, 2008. (Seminário).

62. 1º Ciclo de Palestras do Dia do Nutricionista, 2007. (Encontro).

63. 2ª Conferência Estadual de Segurança Alimentar e Nutricional, 2007. (Seminário).

64. Curso de Culinária Trivial, 2007. (Outra).

65. Evento comemorativo ao Dia do Nutricionista, 2007. (Encontro).

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico..... 11
Livros publicados..... 1
Capítulos de livros publicados..... 6
Jornais de Notícias..... 1
Revistas (Magazines)..... 1
Trabalhos publicados em anais de eventos..... 31
Apresentações de trabalhos (Comunicação)..... 5
Apresentações de trabalhos (Conferência ou palestra)..... 4
Apresentações de trabalhos (Congresso)..... 2
Apresentações de trabalhos (Simpósio)..... 4

Produção técnica

Curso de curta duração ministrado (extensão)..... 1
Desenvolvimento de material didático ou instrucional..... 1
Programa de Rádio ou TV (entrevista)..... 3
Programa de Rádio ou TV (comentário)..... 1

Eventos

Participações em eventos (congresso)..... 18
Participações em eventos (seminário)..... 7
Participações em eventos (simpósio)..... 7
Participações em eventos (oficina)..... 10
Participações em eventos (encontro)..... 18
Participações em eventos (outra)..... 5