UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

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

Liliane Viana Pires

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Tit. Silvia Maria Franciscato Cozzolino

São Paulo
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

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

Liliane Viana Pires

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Tit. Silvia Maria Franciscato Cozzolino

São Paulo
2012

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Pires, Liliane Viana

P667ef 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 / Liliane Viana Pires. -- São Paulo, 2012.
130p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental

Orientador : Cozzolino, Silvia Maria Franciscato

1. Nutrição experimental : Ciência dos alimentos 2. Bioquímica
nutricional 3. Expressão gênica I. T. II. Cozzolino, Silvia Maria
Franciscato, orientador.

641.1 CDD

Janus

Universidade de São Paulo

RELATÓRIO DE DEFESA

Aluno: 9132 - 5507230 - 2 / Página 1 de 1

Relatório de defesa pública de Tese do(a) Senhor(a) Lilliane Viana Pires no Programa: Ciência dos Alimentos, do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 23 dias do mês de agosto de 2012, no(a) FCF/USP - Sala de aula bl 14 realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Lilliane Viana Pires, apresentada para a obtenção do título de Doutora intitulada:

"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"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Silvia Maria Franciscato Cozzolino	Presidente	FCF - USP	<u>Aprovada</u>
Nágila Raquel Teixeira Damasceno	Titular	FSP - USP	<u>Aprovada</u>
Thomas Prates Ong	Titular	FCF - USP	<u>Aprovada</u>
Jolison de Oliveira Martins	Titular	FCF - USP	<u>APROVADA</u>
Carla Soraya Costa Maia	Suplente	UFC - Externo	<u>APROVADA</u>

Resultado Final: Aprovada

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Edilson Feltosa dos Santos, lavrei a presente ata; que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 23 dias do mês de agosto de 2012.

Nágila Raquel Teixeira Damasceno

Thomas Prates Ong

Jolison de Oliveira Martins

Carla Soraya Costa Maia

Silvia Maria Franciscato Cozzolino
Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em 23/08/2012, portanto, o(a) aluno(a) faz jus ao título de Doutora em Ciências obtido no Programa Ciência dos Alimentos - Área de concentração: Nutrição Experimental.

Presidente da Comissão de Pós-Graduação

DEDICATÓRIA

*A **DEUS**, Meu Maior Colaborador, por segurar na minha mão e
por ser a luz dos meus caminhos...*

("Tudo posso Naquele que me fortalece!"- Filipenses: 4. 13)

*Aos amores da minha vida, **Francisco Pires e Antônia Viana** (minha razão de existir), por serem o meu tudo... pelos valores ensinados, por estarem ao meu lado em todas as decisões que tomei, e por fazer do meu sonho o deles. Mãe, com carinho para você que sempre foi o centro da nossa família!*

De forma bem especial, DEDICO ao meu pai, por ter sido sempre o meu PONTO forte. Você é o meu exemplo de superação e dedicação!

*Aos meus irmãos, **Lidiany e Júnior**, por sempre estarem juntos a mim em todos os momentos, e da mesma forma como o nosso pai, vocês são meus exemplos de superação. Com vocês tudo faz sentido!*

Aos ***participantes*** deste estudo pela colaboração e envolvimento
com a pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço com o coração repleto de carinho, à orientadora e amiga Professora **Silvia Maria Franciscato Cozzolino**, pelas orientações, pelos conselhos, pela força para continuar essa caminhada e por ser inspiração de ser humano e profissional. E dizer que vou levar muito de você, do seu jeito carinhoso de ensinar e tratar as pessoas que passam pelo seu caminho. Digo mais, obrigada por me ensinar através do seu exemplo que na pós-graduação precisamos ser mais do que pesquisadores, precisamos ser humanos. Porque os sonhos das pessoas muitas vezes atravessam o nosso caminho, e não podemos ser o despertar desse sonho, e sim a força capaz de ajudá-lo a se realizar. Muito obrigada pelo estímulo, amizade, e pela forma carinhosa de ensinar. Sempre lembrarei do seu sorriso doce ao abrir a porta da sua sala!

À Professora **Ângela Maria Spinola-Castro**, pela confiança e pela continuidade de realizar mais esse trabalho junto ao grupo de Endocrinologia Pediátrica - UNIFESP.

Ao Professor **Marcelo Macedo Rogero**, pelas grandes contribuições na elaboração deste estudo, por ser esse profissional brilhante. Obrigada pelos ensinamentos e pela inspiração de fazer da ciência da Nutrição um caminho certo a ser percorrido!

Aos Professores **Júlio Orlando Tirapegui**, **Antonio Carlos Lerário** e **Cristiane Cominetti** pelas contribuições e sugestões no exame de qualificação.

De forma bem mais que especial, quero agradecer a minha amiga **Ana Mara de Oliveira e Silva**, por ser minha referência de amiga, irmã, família e pesquisadora... Aqui em São Paulo você foi e é a pessoa em quem eu mais acredito e confio. Quero te dizer que suas palavras tem o poder de acalmar o meu coração. Em palavras não conseguirei expressar minha gratidão, carinho e amor pelo que você representa para minha vida. Quero imensamente agradecer pelas discussões sobre estresse oxidativo, diabetes, inflamação... Por você ter pipetado as minhas placas para análises de expressão gênica quando eu não conseguia mais pipetar por causa da tendinite. Muito obrigada pelo apoio em tudo, desde o começo! Realmente Deus me presenteou com essa linda amizade, que nasceu no primeiro período da graduação do curso de Nutrição na UFPI. Sempre juntinhas na concretização dos sonhos...

Às minhas florzinhas:

Luciane Luca de Alencar, muito obrigada por ter aparecido na minha vida, por ter sido mãos, pés e coração que me ajudaram a concluir este trabalho. Quero te agradecer imensamente por ter feito deste trabalho o seu, por ter compartilhado comigo os sábados, domingos e madrugadas no laboratório trabalhando... Tenho a plena certeza que sem a sua ajuda tudo teria sido muito mais difícil, mas além do seu trabalho, a sua

alegria, seu entusiasmo me deram força para não deixar a peteca cair. Minha florzinha, muito obrigada pela confiança, apoio, amizade e por você ser assim tão perfeita. Tenho orgulho de ter tido a sua colaboração na minha tese!

Leila Leiko Hashimoto, minha pequena florzinha, lembre-me de uma frase dita após comentarem que nós éramos parecidas, “luz atrai luz” e é com muita emoção que eu te agradeço por tudo, por ser também minhas mãos, pés e coração nessa caminhada. Com toda certeza, as pessoas não atravessam nossos caminhos por acaso... e nós atravessamos o caminho uma da outra! Tenho muito orgulho de ter você como minha parceira de bancada, viagens, risadas, segredinhos, mas o maior de todos é ter você como grande amiga! Muito obrigada por tudo pequena de grande coração!

Verônica da Silva Bandeira, quanto bem querer tenho por você. Muito obrigada pela sua disposição em ajudar tanto a mim quanto a Luciane e a Leila quando estávamos fazendo alguma análise. Muito obrigada pelo carinho e amizade que você demonstra todos os dias através do abraço acolhedor, mensagens no celular e confiança na nossa amizade. Sua disposição em aprender e crescer profissionalmente faz com que eu te admire mais e mais. De coração, muito obrigada por tudo Vê!

Ao técnico e amigo **José Alexandre Coelho Pimentel**, agradeço profundamente a sua dedicação, apoio em me ajudar tanto nas coletas das amostras quanto das análises. Sua colaboração foi além de uma ajuda técnica, muitas vezes você me fez enxergar que existiam outros caminhos a serem percorridos. Obrigada pela confiança, amizade e por falar de Deus para mim!

À amiga **Maria de Lourdes Pedroza**, na verdade **mãe Lu**, por ter se tornado uma pessoa muito especial na minha vida, pelo carinho e amor de mãe. Obrigada pelas bençãos de todas as manhãs, por ser minha amiga e confidente! Muito obrigada pela mais que valiosa ajuda após as análises de selênio. Quero te dizer que o seu abraço me acalma!

À **Ana Carolina da Silva Pereira (UFC-CE)**, uma pessoa que chegou no finalzinho da execução da tese, mas chegou trazendo alegria, amizade, companheirismo... Você, Carol, é a bondade materializada. A vida me surpreende a cada vez que me apresenta a pessoas como você! Muito obrigada pela oportunidade de conviver e aprender com você mais sobre bondade... Obrigada pela ajuda com as referências da tese, tabulação de dados e principalmente pela companhia no laboratório nos finais de semana, em casa e por fazer com eu me mantivesse alegre... Você é mais uma benção na forma de amiga!

À Professora **Ana Paula Loureiro de Melo**, pela colaboração nas análises de MDA, e também a todos os seus orientados pela ajuda durante as análises, em especial, ao **Tiago Franco de Oliveira** pela paciência, disponibilidade em colaborar nas análises e pelas discussões dos resultados. Muito obrigada ao seu grupo de pesquisa!

À Professora **Dulcinéia Saes Parra Abdalla**, pela colaboração nas análises de LDL⁽⁻⁾, em especial a sua técnica **Elaine Augusto**.

Ao Professor **Jorge Mancini-Filho**, por ter permitido que realizássemos a parte do estudo da capacidade antioxidante das castanhas-do-brasil em seu laboratório, em especial, a aluna **Ana Mara de Oliveira e Silva** pela grandiosa colaboração com as análises. Agradeço a todo o seu grupo de pesquisa por terem me acolhido como uma “lipídica”.

Ao Professor **Enrico Lippi Ortolani** do Hospital Veterinário HMV-USP por ter permitido que realizássemos as análises das enzimas em seu laboratório. De forma especial, agradeço a querida técnica **Clara Satsuki Mori** pela colaboração nas análises e por sempre estar disponível para ajudar. Muito obrigada em nome de todo o Laboratório de Nutrição-Minerais.

As Associações de Diabetes do ABC (**AdiABC**) e de Sorocaba (**ADS**) pela colaboração e apoio na execução desta pesquisa. O meu carinhoso obrigada para as secretárias Eliete (**ADS**), Jô e Eliete (**AdiABC**).

A toda a **minha família** pela torcida e pelo amor de sempre. Obrigada a todos!

À amiga e irmã japa **Luciana Sigueta Nishimura**, agradeço de forma bem especial e carinhosa, por tudo que você representa para minha vida! Como sempre falo você é um presente de Deus! Obrigada pelo companheirismo, confiança e por esse amor fraterno que nos une! Amigos são a família que Deus nos permite escolher, e nós nos escolhemos. Estendo esse agradecimento aos seus pais **Takao e Palmira Nishimura**, pelo carinho de sempre e por me tratarem com filha! Vocês são mais que especiais!

À amiga **Dilina Marreiro**, por ser inspiração na minha vida acadêmica, por ter me apresentado de forma empolgante o caminho da pesquisa científica. Agradeço pela confiança no trabalho que desenvolvo desde a iniciação científica, quando fui sua orientada. Acredito na sua ética, na maneira como conduz as suas pesquisas, e tenho certeza que sua vitória é garantida. Você é mais que um exemplo de profissional! Mas, o meu agradecimento mais especial é pelo carinho de amizade que construímos em paralelo a ciência. Obrigada por tudo! Compartilho essa alegria com você!

À amiga **Carla Soraya Costa Maia**, pela oportunidade de ter aprendido muito sobre ciência. Agradecimento a você por ser a amiga “mais certa das horas incertas”. Obrigada por esta amizade que me traz tantas alegrias, que me deixa emocionada em lembrar de tantas coisas que compartilhamos. Amizade assim, verdadeira, é pra vida toda, apesar da distância! Obrigada por tocar o meu coração com as suas palavras de carinho, incentivo e de ensinamentos! Aos seus filhos, por me fazer sentir o gostinho de ser criança em todas as vezes que nos encontramos.

Aos **amigos do Laboratório Nutrição-Minerais**, o meu melhor abraço de agradecimento pela boa convivência, pelo carinho, apoio e respeito de sempre: **Alexandre Pimentel, Ariana Rocha, Bárbara Cardoso, Bruna Zavarize, Graziela Biude** (um bem especial pra você, filhinha), **Isabela Saraiva, Janaína Lombello, Kaluce Almondes, Kátia Callou, Larissa Beserra, Leila Leiko, Luciane Alencar, Rafael Bueno e Verônica Bandeira**. E aos que passaram por lá: **Carla Soraya, Camila Mattos, Cristiane Cominetti, Fernanda Guilherme, Luciana Nishimura, Maritsa de Bortoli e Suzana Bressan**. O MEU OBRIGADA MAIS QUE ESPECIAL!

Às amigas que se fizeram especiais durante esses anos:

Andréia Marreiro, por ser esse ser de luz! Obrigada pela torcida, pelo incentivo e pela bela amizade construída. “...tão perto e tão longe...” define nossa amizade! Pois, mesmo longe você foi tão presente na minha vida!

Ariana Rocha, minha amiga medalhinha, quero imensamente agradecer por esses anos de construção de uma amizade que vou levar pra vida toda... Ser especial é fazer da felicidade do outro a sua! E é assim que sinto nossa amizade... Hoje eu que te agradeço por ter me ajudado a ser uma pessoa melhor! Esse agradecimento se estende a **Tia Nair** por ser essa linda pessoa que te acompanha!

Camila Mattos, essa amiga amadinha tem todo o meu carinho e respeito. Obrigada por ter se preocupado comigo e mesmo com a distância foi tão presente na minha vida nesses últimos anos. Obrigada também por ter-me como uma pessoa da sua família. Certeza que somos amigas-irmãs... O seu carinho e atenção fizeram a diferença para os meus dias!

Fernanda Guilherme, obrigada por muitas vezes ter sido luz e alegria, pelo carinho de irmã que temos uma pela outra. Confiança é o nome dado a nossa amizade! Muito, muito obrigada pelo respeito e por esse grande amor fraterno que é o elo da nossa amizade! Você é ESPECIAL demais... Obrigada por TUDO!

Raquel Campos, minha amiga siamesa, por acreditar nos meus sonhos e ficar feliz com a minha felicidade! Você é prova que a amizade continua a crescer mesmo a longas distâncias! Obrigada pela confiança e respeito... Agora temos um elo muito especial entre nós: O **Guilherme**! Desde sempre *my best friend*!

Suzana Bressan, minha amiga mais que querida, obrigada pela torcida, confiança e respeito de sempre. Conhecer você foi uma benção... o seu sorriso acolhedor, o abraço de todas as manhã me fizeram sentir a força de uma grande amizade! O bloco 14 te espera...

Às amigas **Lucília Rabelo e Michelle Garcêz**, pela perfeita convivência e por nos tornarmos irmãs. Vocês são muito importantes para mim.

À **Cristiane Cominetti**, pela oportunidade de aprender sobre ciência, pela amizade e carinho de sempre.

À amiga **Chris Barroso**, por sempre se fazer especial! Você é uma pessoa linda!

Às médicas **Adriana Miachon e Deise Canteiro**, pela atenção e por estarem sempre dispostas a colaborar.

Aos amigos do Laboratório de Lípidos pela amizade construída nesses anos de pós-graduação, em especial, **Ana Mara, Ilana Louise, Eliane Bonifácio, Fernanda Santana, Fernanda Shinagawa** e a técnica **Rosângela Pavan**.

À técnica **Ivanir Pires**, por sempre estar disposta em ajudar e em aprender! E ao **João Alfredo** pela amizade e conversas sobre a pós-graduação!

À **Fábia Andrade** por ter tirado dúvidas sobre a metodologia para análise de expressão gênica. MUITO OBRIGADA!

Ao Professor **Thomas Ong**, pela atenção, trocas de idéias e ensinamentos científicos e de vida. Um exemplo a seguir!

À querida **Majô** do Comitê de Ética em Pesquisa – FCF, pela simpatia e atenção sempre ilimitada. E pela amizade nascida das visitas a sua sala. Obrigada pelo carinho, você se tornou uma amiga muito especial!

Ao amigo **João Félix** pela amizade e pelo bom dia sempre carinhoso.

Ao amigo **Paulo Roberto**, pelo carinho e por me adotar como sua irmãzinha. Obrigada pelos cuidados para comigo.

Aos amigos piauienses que compartilham do mesmo sonho, obrigada pelos nossos encontros sempre de alegria: **Ana Mara, Ana Lina, Artemir Coelho, Emídio Marques, Flaviane Alves, Janice Costa, Kaluce Almondes, Lucillia Oliveira, Leonardo Torres, Michelle Garcêz, Nilmara Oliveira e Vivianne Rocha**.

Aos Docentes do Departamento de Alimentos e Nutrição experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Aos secretários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental pela constante paciência e pelo carinho compartilhado diariamente. Obrigada **Cleonice, Mônica, Edílson e Roberta**.

Aos secretários da Pós-Graduação, **Elaine Midori Ychico** e **Jorge de Lima** pela maneira amiga, atenciosa e divertida que nos recebe. Admiro muito vocês!

Às funcionárias **Joana** e **Lurdinha** do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental/FBA/USP, pela paciência e auxílios prestados. Ao funcionário **Luís** do setor de cópias do Bloco 13A pela presteza de sempre.

Às funcionárias do Departamento de Endocrinologia Pediátrica da UNIFESP, **Darlene**, **Joana e Maria**, pela colaboração nas coletas desta pesquisa.

Aos colegas de Pós-graduação pelas conversas, pelos abraços sempre carinhosos e pela torcida, em especial, do Laboratório de Lípidos, Nutrição e Atividade Física, e Nutrição e Câncer.

Às participantes deste estudo, não quero só agradecer e sim dedicá-las esse esforço e a contribuição desta pesquisa para o meio científico.

Ao **CNPq** pela concessão da bolsa de estudos.

À **FAPESP**, pelo apoio financeiro para a execução deste trabalho (FAPESP 2010/15197-6).

Enfim, agradecer a todos que participaram de forma direta e indiretamente para o desenvolvimento desse trabalho e dizer *“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado com certeza chegará mais longe e terá a indescritível alegria de compartilhar, alegria esta que a solidão nega a todos que a possuem”*.

"...O importante é semear, produzir milhões de sorrisos de solidariedade e amizade.
Procuro semear otimismo e plantar sementes de paz e justiça.

Digo o que penso, com esperança. Penso no que faço, com fé. Faço o que devo
fazer, com amor. Eu me esforço para ser cada dia melhor, pois bondade também
se aprende.

Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou
ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais
importante é o decidir..."

(Cora Coralina)

SÚMARIO

	Página
Lista de Abreviações	xi
Lista de Figuras	xii
Lista de Tabelas	xiii
Lista de Quadro	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Diabetes <i>mellitus</i>	3
2.1.1 Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1	4
2.1.2 Aspectos fisiológicos e metabólicos	6
2.1.2.1 Insulina e seu mecanismo de ação	7
2.1.2.2 Glucagon e seu mecanismo de ação	12
2.2 Estresse oxidativo no diabetes <i>mellitus</i>	15
2.3 Inflamação e sua relação com diabetes <i>mellitus</i>	22
2.4 Selênio	24
2.5 Selênio e diabetes	27
2.6 Relação entre selênio, estresse oxidativo e inflamação	28
2.7 Castanha-do-brasil (<i>Bertholletia Excelsa</i> H.B.K.)	33
3 OBJETIVOS	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Caracterização da castanha-do-brasil (<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K.)	36
4.1.1 Determinação da concentração de selênio e da composição centesimal	36
4.1.2 Determinação do perfil de ácidos graxos	37
4.1.3 Estudo da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	38
4.2 Estudo da suplementação com a castanha-do-brasil	43
4.2.1 Protocolo experimental	44
4.2.2 Avaliação antropométrica	46
4.2.3 Avaliação do consumo alimentar	47
4.2.4 Coleta dos materiais biológicos	47

4.2.5 Parâmetros bioquímicos de avaliação de selênio	48
4.2.6 Determinações dos parâmetros glicêmicos e lipídicos	49
4.2.7 Determinação da atividade enzimática	49
4.2.8 Determinação da concentração de malonaldeído no plasma	50
4.2.9 Determinação da LDL ⁽⁻⁾ no plasma	52
4.2.10 Concentração de isoprostanos (8-iso PGF2α)	53
4.2.11 Determinação dos marcadores inflamatórios	53
4.2.12 Expressão gênica de TNF-α, IL-6, COX-2, MCP-1, ICAM-1 e GPX-1	53
4.3 Avaliação estatística	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1 Caracterização da castanha-do-brasil	58
5.2 Estudo da suplementação com castanha-do-brasil em pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1	68
5.2.1 Participantes	68
5.2.2 Avaliação antropométrica	69
5.2.3 Avaliação do consumo alimentar	71
5.2.4 Avaliação do <i>status</i> de selênio	74
5.2.5 Efeitos da suplementação com castanha-do-brasil sobre os marcadores glicêmicos	78
5.2.6 Efeitos da suplementação com castanha-do-brasil sobre os lipídios circulantes	80
5.2.7 Efeitos da suplementação com castanha-do-brasil sobre os marcadores de estresse oxidativo	84
5.2.8 Efeitos da suplementação com castanha-do-brasil sobre os marcadores inflamatórios	88
5.2.9 Classificação dos pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 após o período de intervenção, de acordo com parâmetros bioquímicos e moleculares avaliados	97
6 CONCLUSÕES	104
7 REFERÊNCIAS	105
ANEXOS	130

LISTA DE ABREVIações

¹ O ₂	Oxigênio <i>singlet</i>
8-iso PGF2-α	8-iso-prostaglandina F2 alfa
Abs	Absorbância
ADA	Associação America de Diabetes
ADP	Adenosina difosfato
AFI	Ácidos fenólicos insolúveis
AFL	Ácidos fenólicos livres
AFS	Ácidos fenólicos solúveis
AGEs	<i>Advanced Glycation Endproducts</i> (produtos de glicação avançada)
AHA	Análise hierárquica de agrupamento
Akt	Quinase de serina/treonina
ANOVA	Análise de Variância
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ARE	Elemento de resposta antioxidante
ATP	Adenosina trifosfato
BHT	Hidroxitolueno butilato
Ca ²⁺	Cálcio
CAT	Catalase
CC	Circunferência da cintura
CDM	Controle-diabetes <i>mellitus</i>
CHO	Carboidrato
COX-2	Ciclooxigenase 2
CPH	Exoprotease carboxipeptidase H
CT	Colesterol total
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	Radical 2,2 difenil-1-picril-hidrazil
DQA	Genes do complexo principal de histocompatibilidade, classe II, DQ alfa 1
DQB	Genes do complexo principal de histocompatibilidade, classe II, DQ beta 1
DRB	Genes do complexo principal de histocompatibilidade, classe II, DR beta
DRIs	Recomendação de ingestão de nutrientes
EA	Extrato aquoso
EAAGH	Espectrometria de absorção atômica por geração de hidretos
EAR	<i>Estimated Average Requirement</i> (Necessidade Média Estimada)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ErK	Quinase regulada pelo sinal extracelular
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ET-1	Endotelina
FNB	<i>Food and Nutrition Board</i>
GAD 65	Antidescarboxilase do ácido glutâmico
GAPDH	Gliceraldeído fosfato desidrogenase
GC	Gordura corporal
GlcNAc	N-acetilglicosamina
GLUT	Transportador de glicose
GPx	Glutathione peroxidase
Grb2	Proteína 2 ligada ao receptor de fator de crescimento
GS	Glicogênio sintase
GSH	Glutathione reduzida
GSK-3	Glicogênio sintase quinase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HbA _{1c}	Hemoglobina glicada
HCl	Ácido clorídrico
HDL-c	<i>High Density Lipoprotein</i> (lipoproteína de alta densidade)
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> (Antígeno leucocitário humano)
HNO ₂	Ácido nítrico
HOCl	Ácido hipocloroso

HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatographic</i> (Cromatografia líquida de alta eficiência)
HUVECS	Células endoteliais da veia do cordão umbilical humanas
IA 2	Antitirosina Fosfatase
ICAM	Molécula de adesão celular intercelular
IF-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corporal
INT	2-(4-iodofenil)-3-(4nitrofenol)-5-cloreto de feniltiazol
IOM	<i>Institute of Medicine</i>
IR	<i>Insulin receptor</i> (Receptor de insulina)
IRS-1	Substrato do receptor de insulina 1
IκB	Proteína inibidora do kappa B
JNK	Jun N-terminal quinase
K⁺	Potássio
K_{ATP}	Canais de potássio sensíveis ao ATP
L•	Radical alquila
LDL⁽⁻⁾	<i>Electronegative LDL</i>
LDL-c	<i>Low Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de baixa densidade)
LIP	Lipídios
LO•	Radical alcóxila
LOO•	Radical peróxila
LOX	Lipoxigenases
LPS	Lipossacarídeo de bactéria <i>Gram</i> -negativa
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos
MDA	Malonaldeído
MnZn-SOD	Mangânes-zinco superóxido dismutase
mRNA	RNA mensageiro
mTORC	Complexo proteína alvo da rapamicina em mamíferos
N₂O₃	Óxido nítrico
Na⁺	Sódio
Na₂CO₃	Carbonato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida-Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NaOH	Hidróxido de sódio
NFκB	Fator nuclear- <i>κ</i> appa B
NIST	<i>National Institute of Standard & Technology</i>
NO	Óxido nítrico
NO₂⁻	Nitrito
NO₃⁻	Nitrato
NOS	Óxido nítrico sintase
O₂	Oxigênio
O₂•-	Ânion superóxido
OGT	O-GlcNac transferase
OH	Hidroxila
ONOO	Peroxinitrito
OPD	orto-fenilenediamina
PAI-1	Inibidor de plasminogênio ativado 1
PAPR	Poli-ADP-ribose polimerase
PC 1 – 2	Pró-hormônio convertase
PCR	Proteína C reativa
PDK	Quinase dependente de fosfatidilinositol
PH	<i>Pleckstrin homology</i>
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5- trifosfato
PKB	proteína quinase B
PKC	Proteína quinase C
PMSF	Fenil-metil sulfonil fluoreto
PROT	Proteína
qRT-PCR	PCR em tempo real

RAGE	Receptor de AGE
RDA	<i>Recommended Dietary Allowance</i> (Ingestão Dietética Recomendada)
RNA	Ácido ribonucleic
SAA	Proteína amiloide sérica A
SDM	Suplementado-diabetes <i>mellitus</i>
Sec	Selenocisteína
SECIS	Sequência de inserção Sec
SeMet	Selenometionina
SHC	Proteína semelhante ao colágeno com homologia src
SLC2A1	Transportador de glicose – 1
SOD	Superóxido dismutase
SOS	<i>Son-of-sevenless</i>
T₃	Triiodotironina
T₄	Tiroxina
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGF-β	Fator de transformação de crescimento – beta
THF	Tetraidrofurano
TNF-α	Fator de necrose tumoral – alfa
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
TrxR	Tioredoxina redutase
UCP- 1	Proteína desacopladora 1
UDP	Uridina difosfato
UGA	Códon de finalização
VCAM	Molécula de adesão celular vascular
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VET	Valor Energético Total
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de muito baixa densidade)

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema representativo da secreção de insulina via atividade elétrica da célula β induzida pela glicose.	9
Figura 2. Mecanismo de ação da insulina.	11
Figura 3. Modelo de regulação da secreção de glucagon dependente de glicose proposto por Quesada <i>et al.</i> (2008) em células α do pâncreas de ratos.	14
Figura 4. Acionamento da via do poliol pelo aumento da atividade da aldose redutase causado pela hiperglicemia (Adaptado de Brownlee, 2001).	18
Figura 5. Consequências da ativação da proteína quinase C (PKC) pela hiperglicemia (Adaptado de Brownlee, 2001).	20
Figura 6. Unificação dos mecanismos envolvidos no estresse oxidativo provocado pela hiperglicemia (Adaptado de Brownlee, 2005).	21
Figura 7. Via metabólica da ingestão de selênio em humanos, proposto por Rayman, Infante e Sargent (2008).	25
Figura 8. Mecanismo proposto para ação do selênio na redução da expressão de genes pró-inflamatórios (Adaptado de Duntas, 2009).	32
Figura 9. Fluxograma de obtenção das frações de ácidos fenólicos.	39
Figura 10. Esquema da suplementação com castanha-do-brasil em pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1.	44
Figura 11. Fluxograma de atividades desenvolvidas.	45
Figura 12. Quantidade de fenólicos totais das frações de ácidos fenólicos obtidas da castanha-do-brasil expressa por mg de equivalente de ácido gálico/g de amostra desengordurada. São Paulo, 2012.	62
Figura 13. Atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos em sistema de varredura do radical DPPH• das amostras de castanha-do-brasil. São Paulo, 2012.	64
Figura 14. Capacidade redutora das frações de ácidos fenólicos em sistema com ferrocianeto de potássio das amostras de castanha-do-brasil. São Paulo, 2012.	65
Figura 15. Atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos em sistema β -caroteno/ácido linoléico das amostras de castanha-do-brasil. São Paulo, 2012.	66
Figura 16. Inibição da peroxidação espontânea em cérebro de rato pelas frações de ácidos fenólicos presentes nas amostras de castanha-do-brasil. São Paulo, 2012.	67

Figura 17.	Distribuição percentual dos pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1, segundo a classificação do estado nutricional pelo IMC proposto pela <i>World Health Organization</i> (2007) e o grupo. São Paulo, 2012.	70
Figura 18.	Distribuição percentual de pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1, segundo os valores de referência adotados para as concentrações de selênio no plasma (A) e nos eritrócitos (B). São Paulo, 2012.	75
Figura 19.	Percentual de hemoglobina glicada (HbA _{1c}) e concentração glicose sérica (mg/dL), segundo o grupo e tempo de avaliação, de pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1. São Paulo, 2012.	78
Figura 20.	Correlação entre o percentual de hemoglobina glicada e a concentração de selênio nos eritrócitos após a suplementação com castanha-do-brasil em pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1. São Paulo, 2012.	79
Figura 21.	Perfil lipídico, segundo o grupo e tempo de avaliação, de pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1. São Paulo, 2012.	81
Figura 22.	Correlação entre as concentrações de selênio plasmático e de HDL-c de pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 na fase inicial do estudo (T0). São Paulo, 2012.	83
Figura 23.	Concentração das substâncias inflamatórias (fibrinogênio, IL-6, TNF- α e proteína C reativa), segundo o grupo e tempo de avaliação, de pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1. São Paulo, 2012.	89
Figura 24.	Concentração de moléculas de adesão (VCAM e ICAM), do inibidor de plasminogênio ativado-1 (PAI-1) e da proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), segundo o grupo e tempo de avaliação, de pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1. São Paulo, 2012.	92
Figura 25.	Expressão gênica da GPx-1, ICAM, COX-2, MCP-1, IL-6 e MCP-1, segundo o grupo e tempo de avaliação, de pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1. São Paulo, 2012.	93
Figura 26.	Análise Hierárquica de Agrupamentos (AHA) aplicada às variáveis. São Paulo, 2012.	98
Figura 25.	Classificação dos pacientes (n=70) de acordo com os parâmetros de selênio nos eritrócitos, glutathione peroxidase (GPx) no sangue total, malonaldeído (MDA) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) usando a Análise Hierárquica de Agrupamentos (AHA). São Paulo, 2012.	99

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Identificação dos genes para reação de q-RT PCR disponibilizados pela Applied Biosystems.	54
Tabela 2. Composição centesimal e concentração de selênio das castanhas-do-brasil (<i>Bertholletia excelsa</i>) utilizadas na intervenção nutricional deste estudo. São Paulo, 2012.	58
Tabela 3. Perfil de ácidos graxos das castanhas-do-brasil (<i>Bertholletia excelsa</i>) utilizadas na intervenção nutricional deste estudo. São Paulo, 2012.	60
Tabela 4. Características dos pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 no início do estudo. São Paulo, 2012.	69
Tabela 5. Dados antropométricos dos pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1, segundo o tempo de avaliação. São Paulo, 2012.	70
Tabela 6. Valores de ingestão de energia, macronutrientes, ácidos graxos saturados, mono e poliinsaturados dos pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1, segundo o grupo e o tempo de avaliação. São Paulo, 2012.	72
Tabela 7. Valores de ingestão de selênio, zinco, cobre, manganês e vitaminas C e E dos pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1, segundo o grupo e o tempo de avaliação. São Paulo, 2012.	73
Tabela 8. Parâmetros bioquímicos para avaliação do <i>status</i> de selênio, segundo o grupo e o tempo de avaliação, de pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1. São Paulo, 2012.	74
Tabela 9. Marcadores bioquímicos do estresse oxidativo, segundo o grupo e o tempo de avaliação, de pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1. São Paulo, 2012.	86
Tabela 10. Caracterização dos pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 contidos em cada grupo, conforme a classificação pela AHA pelos parâmetros de selênio nos eritrócitos, GPx no sangue total, MDA e TNF- α . São Paulo, 2012.	101

LISTA DE QUADRO

	Página
Quadro 1. Recomendações de ingestão relativas ao selênio em µg/dia, de acordo com a idade, proposto pelo <i>Institute of Medicine/Food and Nutrition Board</i> , 2000.	27

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. São Paulo, 2012. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

RESUMO

Diversas hipóteses têm sido sugeridas para atividade anti-inflamatória do mineral selênio, tais como, efeito inibitório da enzima óxido nítrico sintase induzível e inibição da via de ativação do NFκB. Associado a esse aspecto, o selênio faz parte do sistema de defesa antioxidante como parte da enzima glutathiona peroxidase (GPx), reduzindo as concentrações de espécies reativas, e consequentemente, atenuando o estresse oxidativo. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação com castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), fonte dietética de selênio, na expressão gênica de citocinas inflamatórias e sua relação com o estresse oxidativo em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1. Inicialmente foi realizada a caracterização da composição de macronutrientes, teor de selênio e de fenólicos totais presentes nas castanhas-do-brasil utilizadas neste estudo. A atividade antioxidante *in vitro* foi realizada nas frações ricas em ácidos fenólicos (ácidos fenólicos livres-AFL, ácidos fenólicos solúveis-AFS e ácidos fenólicos insolúveis-AFI) extraídas das castanhas desengorduradas pelos métodos de DPPH, capacidade redutora, β-caroteno/ácido linoléico e inibição da peroxidação espontânea. O estudo com pacientes diabéticos foi de natureza longitudinal. Foram avaliados 70 pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1, com idade média de 15 anos, atendidos no Setor de Endocrinologia Pediátrica da Universidade Federal de São Paulo. Foram constituídos dois grupos experimentais, um (35 pacientes - grupo suplementado - SDM) que recebeu a suplementação de 2,5 g de castanha-do-brasil por dia, durante sessenta dias, e o outro (35 pacientes - grupo controle - CDM) que não recebeu a suplementação. Foi realizada avaliação da composição corporal e do consumo alimentar. Além disso, foram avaliados os parâmetros bioquímicos relativos ao *status* de selênio, perfil lipídico, controle glicêmico (glicose e HbA_{1c}), atividade da GPx e SOD, MDA, LDL⁽⁻⁾, 8-isoprostanos e os níveis circulantes de IL-6, TNF-α, PCR, fibrinogênio, VCAM, ICAM, PAI-1 e MCP-1. A expressão gênica da GPx1, ICAM, COX-2, MCP-1, IL-7 e TNF- α foi determinada por PCR em tempo real. Verificou-se alta concentração de selênio na castanha *in natura* (115,53 μg/g) e alto conteúdo de lipídios. Entre as frações, a AFL apresentou a maior quantidade de compostos fenólicos, seguida da AFS e AFI. Esses compostos estão relacionados com a capacidade antioxidante observada nessas amostras por mecanismos distintos. Os pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 apresentaram baixo consumo de selênio, e após a intervenção com a castanha-do-brasil, o consumo aumentou significativamente. Em relação ao *status* de selênio, houve aumento estatisticamente significativo (p<0,05) na concentração de selênio no plasma, eritrócitos e urina após a intervenção com a castanha-do-brasil. A suplementação não foi capaz de modificar positivamente os marcadores de estresse oxidativo, com exceção da atividade da GPx no sangue total, a qual teve sua atividade aumentada em ambos os grupos após o período de intervenção. Após o consumo da castanha-do-brasil, houve redução nas concentrações de ICAM e PAI-1, no entanto, os demais marcadores inflamatórios, tanto os bioquímicos quanto os de expressão gênica, não foram alterados com a suplementação. A castanha-do-brasil, além de ser uma boa fonte de selênio, apresenta quantidades elevadas de compostos fenólicos e expressiva atividade antioxidante *in vitro*. A suplementação com a castanha-do-brasil mostrou-se efetiva em melhorar o estado nutricional relativo ao selênio dos pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1, sem no entanto, reduzir as concentrações dos marcadores de estresse oxidativo e de inflamação (com exceção da ICAM e PAI-1) nas condições estudadas.

Palavras-chave: castanha-do-brasil, selênio, diabetes, estresse oxidativo, inflamação.

PIRES, L.V. Effect of supplementation with Brazil nuts (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) on gene expression of inflammatory cytokines and its relationship to oxidative stress in patients with type 1 diabetes *mellitus*. São Paulo, 2012. PhD Thesis - Faculty of Pharmaceutical Sciences-University of Sao Paulo.

ABSTRACT

Several mechanisms have been suggested for the anti-inflammatory activity of selenium, including inhibition of inducible nitric oxide synthase and inhibition of NFkB activation. In this regard, selenium, as an integral constituent of glutathione peroxidase (GPx), a key enzyme in antioxidant defense systems, plays an important role in reducing the concentrations of reactive species, and, consequently, in attenuating oxidative stress. This work aimed to evaluate the effect of supplementation with Brazil nuts (*Bertholletia excelsa* HBK), dietary sources of selenium, over gene expression of inflammatory cytokines and its relationship to oxidative stress in patients with type 1 diabetes *mellitus*. Initially, the composition of macronutrients and the contents of selenium and phenolic compounds in the Brazil nuts used in this study were characterized. *In vitro* antioxidant activity of three phenolic acid-rich fractions from the defatted nuts (free phenolic acids - FPA, soluble phenolic acids – SPA and insoluble phenolic acids - IPA) was assessed by the following methods: DPPH, reducing power, β -carotene/linoleic acid and inhibition of spontaneous peroxidation. Seventy type 1 diabetic individuals, at an average age of 15 years old, either patients attending the Division of Pediatric Endocrinology of the Federal University of Sao Paulo or patients being assisted by local non-governmental organizations (NGOs) for diabetes, were followed longitudinally for two months. They were divided into two experimental groups: group 1 (n=35, supplemented with 2.5 g Brazil nuts a day for sixty days, SDM) and control group (n=35, non-supplemented, CDM). Body composition and dietary intake were monitored. The biochemical parameters related to selenium status, lipid profile, glycemic control (glucose and HbA_{1c}), activities of GPx and SOD, MDA, LDL⁽⁻⁾, 8-isoprostanes and circulating levels of IL-6, TNF- α , CRP, fibrinogen, VCAM-1, ICAM-1, PAI-1 and MCP-1 were also evaluated. Gene expression of GPx1, ICAM, COX-2, MCP-1, IL-6 and TNF- α was determined by real time PCR. Non-processed Brazil nuts were found to be rich in selenium (115.5 $\mu\text{g.g}^{-1}$) and to have high lipid content. Of the phenolic fractions studied, the FPA fraction showed the highest levels of phenolic compounds, followed by SPA and IPA. The phenolic content of the fractions was related to the antioxidant capacity, regardless of the method used for determination. The previously low intake of selenium by the type 1 diabetic patients studied increased significantly following supplementation with Brazil nuts. Selenium concentration in plasma, erythrocytes and urine showed a statistically significant increase ($p<0.05$) after intervention. Apart from a greater GPx activity in whole blood, observed in both groups, no other positive changes in oxidative stress markers were noted after the 2 month-supplementation. The consumption of Brazil nuts led to reductions in ICAM-1 and PAI-1 levels. However, other inflammatory markers were not affected by supplementation. As well as being rich sources of selenium, Brazil nuts also have great quantities of phenolic compounds and display significant *in vitro* antioxidant activity. Supplementation with Brazil nuts was shown to be effective in improving the nutritional status of selenium in patients with type 1 diabetes; however, it did not succeed in reducing any oxidative stress and inflammation marker levels, other than ICAM and PAI-1 levels, under the conditions studied.

Keywords: Brazil nuts, selenium, diabetes, oxidative stress, inflammation.

1 INTRODUÇÃO

A doença diabetes *mellitus* é uma alteração metabólica caracterizada por hiperglicemia e insuficiência da secreção ou ação da insulina endógena. O estresse oxidativo está diretamente associado com o desenvolvimento e progressão do diabetes, e suas complicações. Essa condição é geralmente acompanhada pelo aumento da produção de radicais livres e pelo comprometimento da defesa antioxidante. O aparecimento das complicações do diabetes está associado com a ativação de algumas vias, estas incluem: ativação de fatores de transcrição, produção intracelular dos precursores dos produtos de glicação avançada (AGEs) e ativação da proteína quinase C (PKC) (MARITIM *et al.*, 2003; CERIELLO, 2000).

O excesso da produção de radicais livres causa danos nas proteínas celulares, nos ácidos nucleicos e nos lipídios da membrana celular, comprometendo a função celular. Vários mecanismos têm sido propostos para a formação das espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo a oxidação da glicose a principal via para produção destas moléculas. A hiperglicemia estimula a formação de EROs a partir de outras fontes, incluindo: fosforilação oxidativa, NADPH oxidase, lipoxigenase, ciclooxigenase, citocromo P450 monoxigenases e óxido nítrico sintase (NOS) (MARITIM *et al.*, 2003).

Outra importante via de produção de radicais livres na diabetes é a interação da glicose com proteínas formando os produtos de Amadori e, em seguida, os AGEs. Esses AGEs, através dos seus receptores, inativam as enzimas e modificam as suas estruturas, e por conseguinte suas funções, além de produzir radicais livres. O aumento intracelular dos AGEs ativa o fator de transcrição NF κ B (Fator nuclear- κ B), promovendo um aumento da regulação de diversos genes controlados pelo NF κ B. Esse fator de transcrição aumenta a produção de óxido nítrico, o qual parece ser um mediador do dano da célula beta (BENGMARK, 2006).

Diversos estímulos ativam o fator de transcrição NF κ B e este por sua vez regula a expressão de proteínas pró-inflamatórias, como a ciclooxigenase-2 (COX-2) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Por este motivo, o NF κ B tem sido chamado de mediador central das respostas imunológica e inflamatória (ABRAHAM, 2000; HATADA *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 1999; GHOSH, 1999). Aumento na expressão de GPx tem mostrado inibir a ativação do NF κ B, via inibição da fosforilação da proteína inibitória kappa B (I κ B) (KRETZ-REMY *et al.*, 1996). Esses resultados indicam que o *status* de selênio celular pode modular a atividade do NF κ B em macrófagos, como foi

observado em alguns estudos conduzidos em modelos de murinos (VUNTA *et al.*, 2007; PRABHU *et al.*, 2002; ZAMAMIRI-DAVIS *et al.*, 2002).

A disfunção endotelial e inflamação vascular são fatores associados com a diabetes. Nestas situações, ocorre modificação da lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) devido à exposição crônica ao estresse oxidativo, promovendo menor disponibilidade de óxido nítrico (NO) pelo desacoplamento da enzima óxido nítrico sintase endotelial e/ou formação de peroxinitrito, caracterizando a inflamação crônica. Com o aumento da inflamação vascular há elevação da expressão de interleucina-6 (IL-6) e de moléculas de adesão celular vascular (VCAM), e diminuição do fator de relaxamento endotelial, principalmente o NO. Esses eventos associados à hiperglicemia e a formação de AGEs comprometem a função endotelial (HARTGE; UNGER; KINTSCHER, 2007).

O selênio por ser componente essencial de selenoenzimas antioxidantes, como a glutathiona peroxidase (GPx) e a tioredoxina redutase (TrxR), tem importante papel nos processos descritos acima, uma vez que estas enzimas protegem as células do dano oxidativo em condições inflamatórias (HUANG; ROSE; HOFFMANN, 2012; PAPP *et al.*, 2007; UTOMO *et al.*, 2004; KRYUKOV *et al.*, 2003). Este mineral reduz o risco de doenças crônicas, tais como a aterosclerose, trombose arterial e diabetes. Nesta última, a ação do selênio limita-se à prevenção das injúrias provocadas pelo estresse oxidativo, pois o papel do selênio é reconhecido pela ação antioxidante da glutathiona peroxidase, que reduz a formação de espécies reativas de oxigênio (ALARCON-NAVARRO; MARTINEZ, 2000).

Estudos mais recentes demonstraram que há depleção no mecanismo de defesa antioxidante na diabetes, com alterações na atividade das enzimas antioxidantes (AKSOY *et al.*, 2005; SINDHU *et al.*, 2004). Com isso, crescem as investigações sobre o efeito de substâncias com propriedades antioxidantes, uma vez que as defesas antioxidantes endógenas não são suficientes para manter os níveis desejáveis de espécies reativas nesta doença (COSKUN *et al.*, 2005; BALASUBASHINI *et al.*, 2004). Nesse contexto, pesquisas que buscam investigar o *status* antioxidante na diabetes *mellitus* tornam-se de grande relevância.

Portanto, a avaliação do efeito da suplementação com castanha-do-brasil sobre o estado nutricional relativo ao selênio de pacientes diabéticos e sua relação com as citocinas inflamatórias produzidas pelo aumento de radicais livres, torna-se necessária para uma possível intervenção nutricional, cujo objetivo é reduzir as complicações tardias do diabetes e, conseqüentemente melhorar a qualidade de vida desta população.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Diabetes *Mellitus*

Diabetes *mellitus* é uma das doenças crônicas mais comuns em quase todos os países. Atualmente, está ocorrendo um aumento no número de casos de diabetes com proporções epidêmicas em todo o mundo. O número de adultos com diabetes deve aumentar em 54% entre os anos de 2010-2030. Um crescimento anual de 2,2% é previsto, proporção que é quase duas vezes o crescimento total da população adulta no mundo em um ano (SHAW; SICREE; ZIMME, 2010).

No Brasil, haverá um aumento de 5,1 milhões de adultos e idosos (idade entre 20-79 anos) com diabetes em 2030. Em 2010, o número de adultos com essa doença foi de 7,6 milhões e a projeção para 2030 será de 12,7 milhões, estando o Brasil em 5º lugar, entre os países com o maior número de pessoas com diabetes. A explicação para esse aumento na incidência no Brasil e no mundo se deve ao fato de mudanças demográficas, como urbanização e envelhecimento, as quais resultam em aumento dos fatores de risco associados às mudanças no estilo de vida, que levam à atividade física reduzida e aumento da obesidade. E com essas mudanças, ocorre, simultaneamente, aumento dos encargos com diabetes, sendo expressivos principalmente nos países em desenvolvimento, onde os recursos destinados aos problemas clínicos são mais escassos (SHAW; SICREE; ZIMME, 2010).

O número de crianças e adolescentes jovens com diabetes *mellitus* tipo 2 está aumentando em todo o mundo, em particular na América do Norte, Ásia e Europa. Este fato é precedido pelo aumento do número de crianças e adolescentes com sobrepeso ou obesidade. O aumento global da obesidade está intimamente ligado ao desenvolvimento da complexa síndrome metabólica, que também inclui um conjunto de alterações, tais como a resistência à insulina, hiperlipidemia e hipertensão (IOANNIDIS, 2008).

A diabetes é caracterizada como um grupo de doenças metabólicas compostas por hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção ou ação de insulina, ou em ambos os processos (CRAIG; HATTERLEY; DONAGHUE, 2009). Diversos

processos patogênicos estão envolvidos no desenvolvimento de diabetes, entre os quais, destruição autoimune das células β do pâncreas com consequente deficiência de insulina e anormalidades que resultam em resistência à ação da insulina (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010).

Os sintomas mais comuns da hiperglicemia acentuada incluem poliúria, polidipsia, perda de peso, e algumas vezes, polifagia e visão turva. A hiperglicemia persistente no diabetes está associada com as complicações crônicas, entre elas retinopatia, nefropatia, neuropatia e disfunções macrovasculares (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010).

A base das anormalidades no metabolismo dos carboidratos, gorduras e proteínas, na presença de diabetes, é a deficiência na ação da insulina nos tecidos alvos (IOANNIDIS, 2008). Essa deficiência resulta da inadequada secreção da insulina e/ou reduzida resposta tecidual da insulina em um ou mais pontos dos complexos mecanismos de ação desse hormônio (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010).

Em geral, dependendo da etiologia do aparecimento da diabetes, quatro tipos se distinguem: diabetes tipo 1 (sinônimos: diabetes juvenil, diabetes autoimune), diabetes tipo 2 (sinônimo: tipo de diabetes em adultos), diabetes gestacional e outros tipos específicos baseados em defeitos genéticos de fatores de transcrição pancreáticos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010).

A grande maioria dos casos de diabetes faz parte das duas categorias etiopatogênicas; diabetes tipo 1, a causa é uma deficiência absoluta de secreção de insulina; e diabetes tipo 2, a causa é uma combinação da resistência à ação da insulina e uma resposta inadequada compensatória à secreção de insulina (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010).

2.1.1 Diabetes *mellitus* tipo 1

Diabetes *mellitus* tipo 1 representa 5 a 10% dos casos de diabetes, a qual resulta da destruição autoimune das células β do pâncreas. Os marcadores dessa condição são os autoanticorpos antiinsulina, antidescarboxilase do ácido glutâmico (GAD 65) e antitirosina-fosfatases (IA2 e IA2 β). Estes autoanticorpos estão

presentes em 85 a 90% dos indivíduos quando a hiperglicemia de jejum é detectada (BANGSTAD *et al.*, 2007, VERGE *et al.*, 1998).

A susceptibilidade à diabetes tipo 1 é determinada por múltiplos genes, sendo que os genes dos antígenos leucocitários humanos (HLA) são conhecidos por terem uma forte associação com essa doença, além de haver ligação com combinações específicas aos genes DQA e DQB (genes do complexo principal de histocompatibilidade, classe II, DQ alfa 1 e DQ beta 1), os quais são influenciados pelos genes DRB (genes do complexo principal de histocompatibilidade, classe II, DR beta). Esses alelos HLA-DQA;DQB/DRB podem influenciar tanto na predisposição quanto na proteção da diabetes (ERLICH *et al.*, 2008; LAMBERT *et al.*, 2004).

Alguns pacientes podem apresentar cetoacidose como primeira manifestação da doença, especialmente as crianças e os adolescentes. No entanto, outros têm uma hiperglicemia de jejum em nível moderado, o que pode mudar rapidamente para hiperglicemia grave e/ou cetoacidose na presença de infecção ou outras situações de estresse. Há ainda aqueles, particularmente os adultos, que mantêm uma função residual das células β suficiente para prevenir a cetoacidose por muitos anos. Eventualmente, esses indivíduos se tornarão dependentes de insulina e, assim, estarão em risco de cetoacidose. Neste último estágio da doença, quando há pouca ou nenhuma secreção de insulina, o nível de peptídeo-C no plasma é reduzido ou mesmo indetectável (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010).

Existem, ainda, formas de diabetes tipo 1 de etiologia desconhecida, sendo estas classificadas como diabetes idiopática. Esse tipo de diabetes foi observado primeiramente em africanos e asiáticos (AHRÉN; CORRIGAN, 1984), embora somente uma minoria de pacientes com diabetes tipo 1 se enquadra nessa categoria. Alguns desses pacientes têm insulinopenia permanente e são propensos a cetoacidose, mas sem evidência de autoimunidade contra as células β do pâncreas e de associações com o HLA, portanto, é um tipo de diabetes fortemente herdado (CRAIG; HATTERLEY; DONAGHUE, 2009; MCLARTY *et al.*, 1990).

A diabetes idiopática também está sendo observada em outras populações, e uma nova nomenclatura vem sendo empregada “diabetes com tendência à cetose”, pois estes pacientes apresentam frequentes episódios de cetoacidose com graus variados de deficiência de insulina (BALASUBRAMANYAM, 2008).

Segundo o Comitê de especialistas em diagnóstico e classificação do diabetes, pessoas com concentração de glicose de jejum acima do ponto de corte de normalidade (>99 mg/dL) e abaixo do limite inferior (<126 mg/dL) para o diagnóstico de diabetes ou com anormalidades na regulação da glicose no estado pós-sobrecarga, detectadas a partir do teste oral de tolerância à glicose (TOTG), são consideradas intolerantes à glicose ou com pré-diabetes. Esses indivíduos possuem risco para o desenvolvimento de diabetes e doenças cardiovasculares no futuro. Alterações na glicemia de jejum e na tolerância à glicose estão associadas com a obesidade, dislipidemias (concentração de triglicerídeos elevada e/ou reduzida concentração de HDL-c circulante) e hipertensão (EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2003).

A hemoglobina glicada (HbA_{1C}) é largamente usada como marcador de hiperglicemia crônica, uma vez que reflete as concentrações sanguíneas de glicose referente a um período de 2 a 3 meses anteriores a avaliação. Após uma extensa revisão das evidências epidemiológicas, o Comitê Internacional de Especialistas recomenda o teste de HbA_{1C} para diagnosticar a diabetes, considerando o ponto de corte $\geq 6,5\%$ (NATHAN, 2009).

A Sociedade Brasileira de Diabetes em suas diretrizes aponta a existência da relação entre o controle glicêmico, baseado na determinação de HbA_{1C} seriada (esse teste deve ser realizado por todos os pacientes com diabetes pelo menos duas vezes ao ano e trimestralmente para os que estão em fase de alteração do esquema terapêutico e para aqueles que não estejam atingindo os objetivos do tratamento) e o risco de desenvolvimento e progressão das complicações crônicas do diabetes *mellitus*, os quais estão aumentados quando as concentrações de HbA_{1C} se encontram acima de 7% (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009).

2.1.2 Aspectos fisiológicos e metabólicos

O controle metabólico da glicose é bem regulado, uma vez que as concentrações de glicose elevadas rapidamente retornam ao normal, mesmo depois de alta ingestão calórica, enquanto que durante longo período de privação alimentar os níveis de glicose são levemente reduzidos. Esse controle tem grande importância na homeostase da glicose, pois previne alterações metabólicas, entre as mais

significativas estão a perda da consciência devido a hipoglicemia e a toxicidade em tecidos periféricos em resposta a hiperglicemia crônica presente em pacientes com diabetes *mellitus* (HUANG; CZECH, 2007).

Em mamíferos, os carboidratos são estocados sob a forma de glicogênio, principalmente no músculo esquelético e no fígado. Embora a concentração de glicogênio seja maior no fígado do que no músculo, devido à massa ser maior no músculo, este órgão estoca mais glicogênio (SRIVASTAVA; PANDEY, 1998; COHEN, 1983). O principal mecanismo de utilização da glicose exógena é via transportador de glicose estimulado pela insulina no músculo esquelético. Esse compartimento muscular estoca tanto a glicose quanto o glicogênio, e o oxida para produzir energia (HUANG; CZECH, 2007).

A insulina, o glucagon e a amilina são hormônios produzidos pelo pâncreas e interagem com hormônios viscerais (peptídeo 1 semelhante ao glucagon, peptídeo de inibição gástrica, grelina, peptídeo YY e colecistocina) com a finalidade de regular a ingestão, deposição e utilização dos suprimentos energéticos (WOODS *et al.*, 2006). Os hormônios mais importantes na via metabólica da glicose são a insulina e o glucagon, os quais são secretados pelas células β e α do pâncreas, respectivamente. Essas células respondem às mudanças nas concentrações de glicose de forma distinta, ou seja, nos períodos de hipoglicemia, as células α são estimuladas a produzirem glucagon, e quando as concentrações de glicose estão aumentadas as células β são estimuladas a produzirem insulina, assim, esses hormônios possuem efeitos contrários sobre a glicemia e também sobre o metabolismo de nutrientes (WALKER *et al.*, 2011; FRAYN, 2003). A disfunção nestas células pode alterar o controle glicêmico e está associada com o aparecimento de diabetes.

2.1.2.1 Insulina e seu mecanismo de ação

A insulina é o regulador mais importante da homeostase dos nutrientes no organismo. Sendo este um hormônio anabólico, é essencial para a manutenção da homeostase de glicose, do crescimento e diferenciação celular. É secretada pelas células β do pâncreas e modulada por nutrientes, neurotransmissores e hormônios,

e a concentração da glicose plasmática é a principal forma de estímulo para sua secreção (PRENTKU; TORNHEIM; CORKEY, 1997).

Em humanos, a síntese de insulina ocorre a partir da transcrição e tradução do gene que codifica este hormônio, com formação da pré-pró-insulina no retículo endoplasmático rugoso, seguido pela remoção de uma sequência contendo 24-resíduos de aminoácidos para produzir a pró-insulina. Esta é transportada para o complexo de *Golgi*, onde é armazenada nos grânulos de secreção imaturos. A conversão para sua forma biologicamente ativa é catalisada pela atividade das pró-hormônio convertases 1 e 2 (PC1-2) e da exoprotease carboxipeptidase H (CPH), produzindo insulina madura e peptídeo-C. A insulina madura pode ser armazenada por vários dias até que seja liberada ou degradada (SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006; GOODGE; HUTTON, 2000; SCHNELL *et al.*, 1988).

A célula β é eletricamente excitável e mudanças no potencial de membrana causam variações na concentração de glicose plasmática, com a finalidade de estimular ou inibir a secreção de insulina (ASHCROFT; RORSMAN, 1989), sendo essa hexose uma potente reguladora do potencial de membrana nessas células. O processo de secreção de insulina segue duas fases básicas: a 1ª fase começa com componente inicial que se desenvolve rapidamente, que é o estímulo provocado pelo aumento da glicose plasmática, com duração de alguns minutos, seguida por um componente de desenvolvimento lento, mas contínuo, que é a despolarização da membrana com consequente liberação dos grânulos de insulina (2ª fase) (CURRY; BENNETT; GRODSKY, 1968).

O aumento da concentração de glicose provoca uma elevação concomitante do fluxo dessa molécula para dentro das células β . A glicose permeia a membrana plasmática das células β por meio dos seus transportadores tipo 1 e 2 (GLUT 1 e 2) e chega ao citosol, onde é fosforilada com auxílio da enzima glicoquinase, formando a glicose-6-fosfato. Esta aumenta a produção de adenosina trifosfato (ATP), resultando em aumento da razão entre ATP e adenosina difosfato (ADP), provocando o fechamento dos canais de potássio (K^+) sensíveis ao ATP (K_{ATP}) da membrana plasmática, impedindo o efluxo de K^+ , resultando na retenção de cargas positivas no interior da célula. Com o fechamento destes canais e o acúmulo de cargas positivas, eleva-se o potencial de membrana, reduzindo a polaridade da membrana plasmática (RORSMAN, 1997; ASHCROFT; HARRISON; ASHCROFT, 1984).

Então, essa despolarização da membrana altera o potencial de ação, abrindo os canais de cálcio (aumento do potencial de membrana), permitindo o fluxo de cálcio para dentro da célula β , aumentando, assim, a concentração de Ca^{2+} no citosol e provocando a exocitose dos grânulos de insulina (**Figura 1**) (TARASOV; DUSONCHET; ASHCROFT, 2004).

Quando a concentração de glicose plasmática é reduzida devido a sua captação pelos órgãos alvos insulino-dependentes, ocorre reversão do processo descrito e a cessação da secreção de insulina. Assim, a glicose plasmática está sob controle de *feedback* da insulina através das mudanças no metabolismo das células β , fechamento dos canais de K_{ATP} , abertura dos canais de Ca^{2+} , atividade elétrica e secreção (HENQUIN, 2000).

Figura 1. Esquema representativo da secreção de insulina via atividade elétrica da célula β induzida pela glicose. Sequencialmente, as etapas envolvem ações referentes ao metabolismo da glicose, a produção de ATP, o fechamento de canais K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}), despolarização da membrana e início do potencial de ação dependente de Ca^{2+} , com consequente liberação dos grânulos de insulina por exocitose (Adaptado de MEARS, 2004). Legenda: Ca_v : canal de Ca^{2+} dependente de voltagem; K_v : canal de K^+ dependente de voltagem; $\sim$: potencial de membrana.

A entrada da glicose nas células via estímulo da insulina se dá pela translocação de proteínas transportadoras de glicose (GLUT4) de locais

intracelulares para a superfície da célula (HUANG; CZECH, 2007). A insulina aumenta a entrada de glicose no tecido muscular e adiposo, em paralelo, inibe a produção de glicose pelo fígado, sendo, portanto, um regulador primário da concentração de glicose no sangue. Esse hormônio promove o estoque de substratos no tecido adiposo, fígado e músculo pela estimulação da lipogênese, síntese de glicogênio e de proteína, e inibição da lipólise, glicogenólise e degradação de proteína (SALTIEL; KAHN, 2001).

A insulina regula a síntese de glicogênio em duas etapas, primeiro, controlando a entrada e o transporte da glicose na célula (síntese de glicogênio), e segundo, regulando a fosforilação e ativação de enzimas envolvidas na síntese e degradação do glicogênio (**Figura 2**). Esse hormônio circula sistematicamente pelo organismo até o momento em que se liga às células alvo, por meio do receptor de insulina (IR – *insulin receptor*) tirosina quinase. Essa ligação recruta moléculas adaptadoras, incluindo a família dos receptores de insulina e da proteína semelhante ao colágeno com homologia src (SHC). A partir de então, esse complexo ligante/insulina-receptor promove a autofosforilação do IR, o qual recruta e fosforila o substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) (MURROW; HOEHN, 2010; WHITE, 2002).

Após a ativação do IRS-1, este estimula sua ligação com proteínas que contém domínios SH2, como PI3K (fosfatidilinositol-3-quinase) ou Grb2 (proteína 2 ligada ao receptor de fator de crescimento). Este mecanismo de sinalização permite que um receptor fosforilado ative várias moléculas de IRS-1, as quais atuam fosforilando qualquer proteína que apresente o domínio SH2. Estas proteínas recrutam Grb2, o qual se associa com o SOS (*Son-of-sevenless*) e ativa o Erk1/2 (quinase regulada pelo sinal extracelular), via proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) (OBBERGHEN, 2001).

Outra via, em paralelo, é a da PI3K (p85/p110), a qual se liga ao IRS-1 fosforilado, que por sua vez, sofre uma mudança conformacional, resultando em aumento da atividade e produção de fosfatidilinositol-3,4,5- trifosfato (PIP3) na membrana plasmática. PIP3 recruta proteínas contendo domínio PH (*Pleckstrin Homology*) (MURROW; HOEHN, 2010; ALESSI; DOWNES, 1998) tais como a quinase 1 dependente de fosfatidilinositol (PDK1) e Akt (quinase de serina/treonina) ou proteína quinase B (Akt/PKB) (MURROW; HOEHN, 2010, VANHAESEBROECK; ALESSI, 2000).

Figura 2. Mecanismo de ação da insulina. Vide explicação no texto.

A PDK1, o PKB e aPKCs, as quais possuem o domínio PH, são recrutadas para a membrana plasmática pela ligação ao PIP3. Após esse processo, a PDK1 fosforila Akt/PKB e aPKCs no resíduo treonina, localizado no ponto de ativação do domínio catalítico Thr308, causando sua ativação, e posteriormente, o complexo proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTORC) fosforila Akt/PKB na Ser473 na parte reguladora C-terminal levando à completa atividade da Akt/PKB (MURROW; HOEHN, 2010; GOOD *et al.*, 1998; PULLEN *et al.*, 1998; STEPHENS *et al.*, 1998).

Os maiores alvos da PKB ativada são a glicogênio sintase quinase (GSK-3) e o substrato da Akt de 160 kDa (AS160). Em consequência da fosforilação da Ser9 mediada pela PKB, a GSK-3 é inativada. Essa inativação, em paralelo a ativação da proteína fosfatase-1, atenua a inibição da fosforilação de glicogênio sintase (GS), que se torna ativa e promove a síntese de glicogênio (KANE *et al.*, 2002; BRADY *et al.*, 1998; CROSS *et al.*, 1995).

A Akt/PKB também regula a translocação do GLUT-4 para a membrana plasmática, resultando em aumento na entrada da glicose para dentro da célula. A Akt2/PKB β fosforila o substrato 160 kDa (conhecido como TBC1D4) da Akt/PKB e do TBC1D1 para inibir a atividade da *Rab-GTPase*. Este bloqueio facilita a atividade aumentada da *Rab* e o deslocamento das vesículas contendo GLUT4 para a membrana plasmática, onde se fundem com esta. Este processo acontece a partir de estímulos específicos. A aPKCs age em paralelo ao PKB, controlando a translocação do GLUT-4 (BEESON *et al.*, 2004; SANO *et al.*, 2003).

A C-jun quinase amino terminal (JNK) é ativada pelo estresse celular e pelas citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-1 α . A ativação dessa quinase parece ocorrer em resposta a insulina, embora o processo que promova esta ativação não tenha sido totalmente elucidado (MUSSIG *et al.*, 2005; SOMWAR *et al.*, 2000).

Atualmente, estudos tem sido desenvolvidos para avaliar alterações na ativação das enzimas de sinalização proximal da insulina (IR, IRS1/2, PI3K), e dos alvos jusantes (PDK, PKCs, PKB e seus alvos GSK-3 e AS160, e a família de proteínas quinases MAPK) em músculo e tecido adiposo de pessoas com resistência à insulina, obesidade e diabetes *mellitus* tipo 2, sendo atribuída a resistência à insulina, os defeitos em uma ou mais etapas da cascata de sinalização da insulina (FROJDO; VIDAL; PIROLA, 2009).

2.1.2.2 Glucagon e seu mecanismo de ação

A secreção aumentada de glucagon pelas células α do pâncreas tem sido associada com a deficiência de insulina desde 1969 (UNGER, 1976). A regulação parácrina das células α é facilitada pela arquitetura das ilhotas, uma vez que estas células estão em estreita proximidade com as células β (BRAUN *et al.*, 2009; CABRERA *et al.*, 2006). O glucagon age em oposição à insulina, pois sua principal função fisiológica é estimular a produção de glicose pelo fígado, via glicogenólise ou

gliconeogênese, com objetivo de auxiliar na manutenção da glicemia em níveis normais durante períodos de rápida utilização de glicose ou jejum, respectivamente. Devido a este efeito, o glucagon é conhecido como um hormônio catabólico (DUNNING; FOLEY; AHRÉN, 2005; FRAYN, 2003, JELINEK *et al.*, 1993).

As células α pancreáticas são constituídas de canais específicos, que quando estimulados pela concentração de glicose reduzida, modificam o potencial de ação da membrana pelo aumento intracelular de Na^+ e Ca^+ . Este processo elétrico, através dos sinais de Ca^{2+} , induz a secreção de glucagon pela célula. Quando as concentrações de glicose estão elevadas, todo esse processo é inibido. Os canais ATP-dependentes possuem papel fundamental nas células α , e as variações nas concentrações de glicose extracelular alteram a atividade elétrica e o potencial de membrana (QUESADA *et al.*, 2008; GROMADA *et al.*, 1997).

Diversos tipos de canais de voltagem dependentes de Ca^{2+} já foram identificados em células α pancreáticas de humanos. Os canais de Ca^{2+} tipo P/Q parecem ser mais efetivos na secreção de glucagon e suas atividades são máximas em voltagem zero. Já os canais tipo T e L dependentes de Ca^{2+} se abrem em voltagens mais negativas, no entanto, não estão ligados intimamente com a exocitose de glucagon como os canais tipo P/Q. Quando o potencial de amplitude é reduzido, espera-se que a atividade dos canais tipo P/Q seja reduzida, enquanto que o tipo L é menos afetado. Isso pode ser observado pelas concentrações de glicose ou uso de substâncias hipoglicemiantes, como a tolbutamida, as quais aumentam as concentrações de cálcio intracelular $[\text{Ca}^{2+}]_i$; nas células α do pâncreas, esse aumento é devido ao estímulo e abertura dos canais tipo L e T, e ainda inibe a secreção de glucagon, devido à redução na ativação dos canais tipo P/Q (LE MARCHAND; PISTON, 2010).

A regulação de glicose via atividade elétrica pode ser explicada pelo modelo proposto por Quesada *et al.* (2008), a partir de estudos conduzidos com animais (**Figura 3**). A glicose entra na célula α através do transportador GLUT1 (também conhecido como SLC2A1). Quando as concentrações de glicose estão reduzidas, a atividade dos canais K_{ATP} faz com que o potencial de membrana fique em aproximadamente -60 mV. Nesta voltagem, o canal tipo T se abre, fazendo com que ocorra despolarização do potencial de membrana em níveis que ativem os canais de Na^{2+} e Ca^{2+} tipo N, regenerando os potenciais de membrana (QUESADA *et al.*, 2008; MACDONALD *et al.*, 2007; GROMADA *et al.*, 2004). Em seguida, o Ca^{2+} entra na célula

através dos canais tipo N induzindo a secreção de glucagon (QUESADA *et al.*, 2008). A célula é repolarizada através da abertura do canal tipo A, assim, o fluxo de K^+ é normalizado (QUESADA *et al.*, 2008; QUESADA; NADAL; SORIA, 1999).

Em contrapartida, quando a concentração de glicose extracelular está elevada faz com que ocorra aumento da relação ATP/ADP no citosol, bloqueando os canais de K_{ATP} , e assim a célula α é despolarizada para um potencial de membrana onde os canais envolvidos nesse mecanismo são inativados. Dessa forma, a atividade elétrica, a sinalização de Ca^{2+} e a secreção de glucagon são inibidas. Entende-se, então, que a liberação do glucagon pelas células α é mantida pela atividade de um intermediário do canal K_{ATP} , que mantém o potencial de membrana em nível onde a atividade elétrica seja capaz de ser regenerada (MACDONALD *et al.*, 2007; GROMADA *et al.*, 2004).

Um modelo semelhante foi também proposto para as células α de humanos (MACDONALD *et al.*, 2007), no entanto, o que algumas pesquisas indicam é que a glicose pode ser hiperpolarizante ao invés de despolarizante. Além disso, também tem sido proposto que a glicose poderia inibir a secreção de glucagon por suprimir um despolarizante dos estoques de Ca^{2+} , agindo independente dos canais de K_{ATP} . (VIEIRA; SALEHI; GYLFE, 2007; LIU; VIEIRA; GYLFE, 2004).

Figura 3. Modelo de regulação da secreção de glucagon dependente de glicose proposto por Quesada *et al.* (2008) em células α do pâncreas de ratos. Vide explicação no texto. Legenda: K^+ : potássio; Na^{2+} : sódio; Ca^{2+} : cálcio; K_{ATP} : canais K^+ sensíveis ao ATP; SLC2A1: transportador de glicose 1 (GLUT1); G: glicose; ATP: adenosina trifosfato; ADP: adenosina difosfato.

O glucagon age nos diversos sistemas orgânicos por mecanismos distintos, sendo que sua principal ação ocorre no fígado. Neste órgão a relação insulina/glucagon controla várias etapas do metabolismo hepático, pois o glucagon estimula a gliconeogênese e a glicogenólise, aumentando a produção de glicose pelo fígado com o intuito de garantir o fornecimento adequado de glicose para o corpo e cérebro, ao mesmo tempo em que reduz a glicogênese e glicólise (HJORTH *et al.*, 1994).

2.2 Estresse oxidativo no diabetes *mellitus*

Por muitos anos, foi utilizado o conceito de que estresse oxidativo é o estado de desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) e a capacidade antioxidante endógena. Após vários estudos sobre as vias de sinalização *redox*, de intervenção com antioxidantes e sobre marcadores de estresse oxidativo, e também pelo fato de que as espécies reativas podem ser geradas nos processos fisiológicos de ligação de vários hormônios, fatores de crescimento e citocinas aos seus receptores, sendo as espécies reativas parte da cascata de sinalização intracelular, o conceito de estresse oxidativo foi redefinido para “alteração no controle e sinalização *redox*” (JONES, 2006).

Conceitualmente, os radicais livres são átomos, íons ou moléculas que contêm oxigênio com um elétron não pareado em sua órbita externa. Estas moléculas possuem alta instabilidade e reatividade, assim, tendem a se ligar com outros elétrons não pareados presentes em estruturas próximas de sua formação, comportando-se como receptores (oxidantes) ou doadores (redutores) de elétrons (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

Fazem parte da categoria de moléculas reativas que derivam do oxigênio, os radicais livres superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxila ($OH^{\bullet}$), alquila ($L^{\bullet}$), alcóxila ($LO^{\bullet}$) e peróxila ($LOO^{\bullet}$), bem como as espécies reativas não radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$) e oxigênio *singlet* (1O_2). Entre as espécies reativas que derivam do nitrogênio estão o óxido nítrico ($NO^{\bullet}$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-) e peroxinitrito ($ONOO^{\bullet-}$) (DROGE, 2002). As EROs podem ser produzidas espontaneamente ou por meio de reações enzimáticas. Fisiologicamente, o ânion superóxido é produzido na mitocôndria pela

cadeia transportadora de elétrons. Outra via de produção deste ânion é através da ação da xantina oxidase, 5-lipoxigenase ou da NADPH oxidase (HUANG; ROSE; HOFFMANN, 2012).

A relação das EROs com o aparecimento de doenças se dá pela capacidade dessas moléculas em reagir com os ácidos graxos poliinsaturados presentes na membrana celular e/ou com lipoproteínas, iniciando o processo de peroxidação lipídica, o qual gera principalmente os radicais $L\cdot$, $LO\cdot$ e $LOO\cdot$. Este processo favorece o aparecimento de alterações na estrutura das membranas, como alteração da permeabilidade e do fluxo iônico e de outras substâncias. Isto resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações do DNA, e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (proteoglicanos, colágeno e elastina), e, em condição extrema, a peroxidação lipídica pode levar à morte celular (BENZIE, 1996; BARBER, HARRIS, 1994; VACA, WILHEM, HARMS-RINGDAHL, 1988).

Na reação descrita acima ocorre produção dos hidroperóxidos lipídicos, seguida da formação de malondialdeído (MDA), produto secundário da peroxidação lipídica (DEL RIO *et al.*, 2005). Atribui-se a essa substância efeitos mutagênicos e citotóxicos. Nas doenças relacionadas com os danos provocados pelos radicais livres, têm-se observado aumento das concentrações de MDA (BAGIS *et al.*, 2005; STEGHENS *et al.*, 2001). Assim, a determinação de MDA pode ser considerado como um biomarcador confiável para avaliação do estresse oxidativo celular em pacientes com diabetes *mellitus*.

Outra substância relacionada com a peroxidação lipídica é a 8-iso-prostaglandina F2 alfa (8-iso PGF2), a qual se encontra elevada em várias doenças devido, provavelmente, a lesão oxidativa. Em processos patológicos, a peroxidação lipídica encontra-se aumentada mais do que no processo de oxidação de outras biomoléculas, como o DNA, proteínas e carboidratos, uma vez que a reação de peroxidação ocorre mais rapidamente. A determinação de 8-iso PGF2 em fluido ou tecido é considerada um bom biomarcador da peroxidação lipídica (HALLIWELL; LEE, 2010).

A estabilidade das EROs é dependente dos níveis de atividade das enzimas responsáveis pela neutralização de tais espécies, estando entre estas enzimas as selenoproteínas. Entre estas, destaca-se a família das glutathionas peroxidases, que age na proteção celular contra os danos provocados pelos radicais livres, juntamente

com um sistema antioxidante complexo que envolve outras substâncias (HUANG; ROSE; HOFFMANN, 2012).

As enzimas que fazem parte do sistema de defesa antioxidante primário são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e tioredoxina, e estas são responsáveis pela remoção do excesso principalmente do ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HALLIWELL, 1994). A SOD, por sua vez, catalisa a dismutação de $\text{O}_2^\cdot$ em H_2O_2 e O_2 , através da seguinte reação: ($\text{O}_2^\cdot + \text{O}_2^\cdot + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$). De forma contrária ao ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio pode se difundir pelas membranas celulares e gerar o radical hidroxila. Como o peróxido de hidrogênio é um agente oxidante, as células aumentam a expressão das enzimas catalase, GPx e tioredoxina com o objetivo de transformá-lo em água e oxigênio ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). A GPx, uma selenoenzima que contém uma molécula de selenocisteína no seu centro catalítico, reduz o H_2O_2 , lipoperóxidos e outros hidroperóxidos orgânicos a compostos hidroxilados, sendo a glutathione reduzida (GSH) o doador de hidrogênio ($\text{ROOH} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{ROH} + \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O}$) (HUANG; ROSE; HOFFMANN, 2012).

Os antioxidantes não enzimáticos são representados pela glutathione, moléculas endógenas quelantes de metais, além dos antioxidantes obtidos a partir da dieta (ácido ascórbico, α -tocoferol, carotenóides, minerais, compostos fenólicos, entre outros) (VALKO *et al.*, 2007).

Na patogênese da diabetes (tipo 1 e 2), o estresse oxidativo não ocorre somente pelo aumento das espécies reativas produzidas pela cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, mas também por outros mecanismos induzidos pela hiperglicemia, dentre os quais estão incluídos: a via do poliol, produção intracelular dos precursores dos AGEs, ativação da PKC, ativação da hexosamina, e pelas vias relacionadas com ativação da NADPH oxidase (BROWNLEE, 2005; BROWNLEE, 2001).

A ativação da via do poliol pelo aumento da concentração de glicose circulante tem a enzima aldose redutase como agente central (**Figura 4**). A função desta enzima é reduzir aldeídos tóxicos presentes na célula em alcoóis inativos, e quando a concentração de glicose na célula torna-se muito elevada, a aldose redutase também age na redução da molécula de glicose para sorbitol com utilização de NADPH como cofator, posteriormente o sorbitol é oxidado a frutose. Um dos mecanismos propostos para explicar o efeito da hiperglicemia sobre a via do poliol é a indução do

estresse osmótico causado pelo sorbitol, uma vez que há redução da ATPase (Na^+ e K^+) e aumento da taxa de $\text{NADPH}/\text{NAD}^+$ no citosol, com consequente redução de NADPH . Como o sorbitol não se difunde facilmente através das membranas celulares, sugere-se que esta substância causa danos osmóticos nas células microvasculares (GIACCO; BROWNLEE, 2010; BROWNLEE, 2005; BROWNLEE, 2001).

Ainda em relação à via do poliol, o aumento do estresse oxidativo pode ser causado pela utilização do NADPH na redução da glicose em sorbitol, uma vez que este cofator é essencial para regenerar a glutatona reduzida (GSH), e com menos GSH disponível, o estado antioxidante da célula pode ser comprometido (BROWNLEE, 2005; BROWNLEE, 2001).

Figura 4. Acionamento da via do poliol pelo aumento da atividade da aldose redutase causado pela hiperglicemia (Adaptado de Brownlee, 2001). Legenda: EROs: espécies reativas de oxigênio; NADPH : nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato reduzido; NADP^+ : nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato oxidado; SDH: Sorbitol desidrogenase; NAD^+ : nicotinamida-adenina dinucleotídeo oxidado; NADH : nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzido.

Outra via de produção de EROs na diabetes causada pela hiperglicemia é a via de formação dos AGEs, os quais são formados endogenamente pela glicação não enzimática de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Tanto a hiperglicemia quanto o estresse oxidativo são fatores promotores para formação dos AGEs, ou seja, proteínas intracelulares e extracelulares podem ser glicadas ou oxidadas. Sabe-se que a proporção de formação dos AGEs é maior através dos precursores dicarbonil derivados do metabolismo da glicose, do que propriamente desta

hexose. Em geral, os AGEs são formados por meio de vias oxidativas e não oxidativas, como a reação de Maillard, bases de Schiff, aductos de Amadori, e outros intermediários do metabolismo. Como mencionado acima, os AGEs formados a partir de intermediários do dicarbonil são mais reativos, sendo eles o glioxal, metilglioxal e 3-deoxiglicossoma. Estes intermediários são gerados em meio intracelular, a partir da autooxidação da glicose em glioxal, pela decomposição de produtos de Amadori (aductos 1-amino-1-deoxifrutose lisina) para 3-deoxiglicossoma, e pela fragmentação da gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato para formar o metilglioxal. Em seguida, estes produtos reagem com o grupo amino de proteínas intra e extracelulares para formar os AGEs (GIACCO; BROWNLEE, 2010; WAUTIER; SCHMIDT, 2004).

As consequências desta produção elevada de AGEs são: alteração da função de proteínas intracelulares, principalmente em células que não necessitam de insulina para entrada de glicose, tais como as células endoteliais microvasculares e as neuronais; difusão dos seus precursores para fora das células, causando alterações nas moléculas da matriz extracelular e, assim, modificando a interação e/ou sinalização entre matriz-matriz, matriz-célula e célula-célula, podendo causar disfunção celular; possível ligação das proteínas modificadas pelos AGEs aos seus receptores (RAGE) em células endoteliais, mesangiais e macrófagos, induzindo a produção de EROs, e esta ligação com RAGE ativa o fator de transcrição NF κ B, o qual aumenta a expressão de genes que codificam citocinas e fatores de crescimento (IL-1, IGF-1, TNF- α , TGF- β , fator estimulador de colônias de macrófagos e fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos) pelos macrófagos e células mesangiais, e de moléculas pró-inflamatórias e pró-coagulantes pelas células endoteliais (moléculas de adesão celular vascular – VCAM; trombosmodulina e fator tecidual) (GIACCO; BROWNLEE, 2010; GOLDIN *et al.*, 2006).

O aumento da gliceraldeído-3-fosfato ativa duas vias principais, por ser o precursor na formação do metilglioxal, aumentando os níveis de AGEs intracelular, e do diacilglicerol, que é o ativador da via da PKC. Esse aumento é devido a redução da atividade da gliceraldeído desidrogenase (GAPDH), causada principalmente pela produção aumentada de ânion superóxido na mitocôndria (**Figura 6**). A inibição dessa enzima pelas EROs produzidas pela hiperglicemia pode ser resultante da ativação da poli-ADP-ribose polimerase do tipo 1 (PAPR) e da redução de NAD⁺, mais do que pela inativação oxidativa direta da enzima (GIACCO; BROWNLEE, 2010; DU *et al.*,

2003). A expressão aumentada da superóxido dismutase (MnZn-SOD) na mitocôndria, reduz os efeitos causados pelas EROs produzidas pela hiperglicemia, e o mesmo é observado com o aumento da expressão da proteína desacopladora - 1 (UCP-1) (SHEN *et al.*, 2006).

A síntese aumentada de diacilglicerol ativa principalmente as isoformas β e δ da PKC. Com a PKC ativada, a expressão gênica da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), endotelina (ET-1), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de transformação do crescimento β (TGF- β) e do inibidor de plasminogênio ativado-1 (PAI-1), fator de transcrição NF κ B e NAPH oxidase são afetadas (**Figura 5**). A hiperglicemia também pode ativar as isoformas da PKC por meio da ligação aos receptores de AGEs. Estudos com animais diabéticos têm observado o aumento da síntese “de novo” de diacilglicerol do intermediário glicolítico dihidroxiacetona fosfato, através da redução deste para glicerol-3-fosfato (BROWNLEE, 2001).

Figura 5. Consequências da ativação da proteína quinase C (PKC) pela hiperglicemia (Adaptado de Brownlee, 2001). Legenda: PKC: proteína quinase C; eNOS: óxido nítrico sintase endotelial; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; TGF- β : fator de transformação de crescimento beta; PAI-1: inibidor de plasminogênio ativado – 1; NF κ B: fator de transcrição nuclear *kappa* beta; NAD(P)H: nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato reduzido; EROs: espécies reativas de oxigênio.

Em paralelo, o aumento destes intermediários, como por exemplo, a frutose-6-fosfato, faz com que ocorra desvio da via glicolítica para outras rotas metabólicas, e assim fornece substratos para as reações que necessitam de UDP (uridina

difosfato)-N-acetilglicosamina como a síntese de proteoglicanos e formação das glicoproteínas O-ligadas. A enzima chamada de glutamina frutose-6-fosfato aminotransferase converte a frutose-6-fosfato em glicosamina-6-fosfato e finalmente a UDP-N-acetilglicosamina. A adição de N-acetilglicosamina (GlcNAc) aos resíduos de serina e treonina é catalisada pela enzima O-GlcNAc transferase (OGT). O aumento da adição de moléculas de GlcNAc a esses resíduos em fatores de transcrição, como SP1, assim como a fosforilação, resulta em mudanças patológicas na expressão gênica, como aumento na expressão de PAI-1 e TGF- β (**Figura 6**). Assim a hiperglicemia aumenta a transcrição de genes que codificam TGF- α , TGF- β e PAI-1. Esta via também possui uma participação importante na hiperglicemia e resistência à insulina (GIACCO; BROWNLEE, 2010; BROWNLEE, 2005; DU *et al.*, 2000).

Figura 6. Unificação dos mecanismos envolvidos no estresse oxidativo provocado pela hiperglicemia (Adaptado de Brownlee, 2005). Legenda: EROs: espécies reativas de oxigênio; PARP: poli-ADP-ribose polimerase; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; NADPH: nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato reduzido; NADP⁺: nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato oxidado; NAD⁺: nicotinamida-adenina dinucleotídeo oxidado; NADH: nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzido; GFAT: glutamina frutose-6-fosfato amidotransferase; Gln: glicosamina; Glu: glutamina; UDP-GlcNAc: uridina difosfato N-acetil glicosamina; DHAP: diidroxiacetona fosfato; DAG: diacilglicerol; PKC: proteína quinase C; AGEs: produtos de glicação avançada; NF- κ B: fator de transcrição nuclear *kappa* beta.

O estresse oxidativo no diabetes tem sido extensivamente determinado como principal causa do início e progressão das complicações cardiovasculares associadas ao diabetes *mellitus*. Ao longo dos anos, os estudos têm mostrado que os mecanismos descritos acima são alterados pela hiperglicemia e estão relacionados entre si. Todos esses eventos acontecem simultaneamente e, assim, contribuem para os efeitos negativos da hiperglicemia.

2.3 Inflamação e sua relação com diabetes *mellitus*

A inflamação envolve, entre outros, a ação do sistema complemento, sistema de coagulação, resposta imunológica humoral e celular, citocinas, hormônios, angiogênese e processos de reparo. Um importante mecanismo na inflamação é o recrutamento de macrófagos para atuar contra microorganismos invasores ou suas toxinas (HAVSTEEN, 2002). Este processo libera citocinas, as quais promovem a propagação da resposta (MEOTTI, 2006).

Em algumas situações, como na resistência à insulina, a inflamação tem sido destacada como um importante fator etiológico. Essa conclusão é baseada em estudos que mostraram a relação entre o aumento das concentrações circulantes dos marcadores inflamatórios de fase aguda, exemplificados pela proteína C reativa (PCR), e da resistência à insulina (GREENFIELD; CAMPBELL, 2006).

A PCR é a principal mediadora da resposta de fase aguda, e é primariamente derivada da via de biossíntese hepática dependente de IL-6. Em modelos animais de metabolismo de glicose, a infusão da IL-6 recombinante de humanos induz a liponeogênese subsequente a hiperglicemia e uma hiperinsulinemia compensatória (STITH, 1994). Respostas metabólicas similares têm sido observadas em humanos depois da administração subcutânea de IL-6 recombinante (TSIGOS *et al.*, 1997). Os estudos que sustentam a hipótese da inflamação na etiologia do diabetes mostram elevação nos níveis de IL-6 e PCR entre indivíduos com alterações na resistência à insulina e naqueles com alterações clínicas do diabetes tipo 2 (FESTA *et al.*, 2000; FROHLICH, 2000; FORD, 1999; PICKUP *et al.*, 1997).

Independentemente da natureza do estímulo desencadeante, as células ativadas do sistema fagocítico mononuclear (monócitos circulantes e macrófagos

teciduais) iniciam a cascata de eventos da resposta de fase aguda, secretando, em uma etapa inicial, citocinas da família da interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF). Essas moléculas têm ação tanto em nível local como sistêmico (MORTENSEN, 2001).

Localmente, agem principalmente sobre fibroblastos e células endoteliais, causando a liberação de um segundo conjunto de citocinas que incluem, além das IL-1 e TNF- α , a IL-6 e IL-8, as proteínas inflamatórias e quimiotáticas de macrófagos. Esta última proteína, juntamente com a IL-1 e IL-8, atrai para o foco inflamatório monócitos e neutrófilos, os quais, por sua vez, secretam um terceiro conjunto de citocinas, incluindo o TNF- α e outros fatores quimiotáticos, que retroalimentam o processo inflamatório (FIOTTI *et al.*, 1999).

O endotélio vascular desempenha papel central na comunicação entre o sítio inflamatório e os leucócitos circulantes, tanto pela expressão de moléculas de adesão que facilitam a migração tecidual de monócitos e neutrófilos, como pela modificação do tônus vascular mediado por metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), pelo óxido nítrico e pelas cininas, causando vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e hipotensão arterial (FAXON *et al.*, 2004; LIBBY *et al.*, 2002; HANSSON, 2001).

Em nível sistêmico, o fígado é o alvo principal dos mediadores inflamatórios, suprindo os metabólitos essenciais para a resposta de estresse e os componentes necessários para a defesa de primeira linha no sítio de inflamação (DANESH *et al.*, 2000). Por meio de seus receptores específicos, o hepatócito responde a quatro tipos de mediadores da resposta inflamatória, são eles: as citocinas do tipo IL-1 (IL-1 e TNF- α) que estimulam a produção hepática da PCR; do componente C3 do complemento e da proteína amiloide sérica A (SAA), constituindo as proteínas de fase aguda do tipo 1; de citocinas do tipo IL-6 (IL-6, IL-11) que estimulam a maioria das proteínas de fase aguda do tipo 1; de glicocorticóides que agem sinergicamente com as citocinas dos tipos IL-1 e IL-6, estimulando a produção de algumas proteínas de fase aguda. Entretanto, a ação mais importante dos glicocorticóides na resposta da fase aguda é a de inibir a produção de citocinas pelos macrófagos e células endoteliais, impedindo que sua ativação continuada tenha conseqüências lesivas aos tecidos; e por fim, fatores de crescimento que, com os glicocorticóides, modulam a resposta hepática às citocinas (IKEDA; ITO; SHIMADA, 2001; DANESH *et al.*, 2000).

Os ativadores do processo inflamatório (radicais livres, estresse oxidativo, infecção bacteriana e viral) aumentam a ativação do NF κ B, o qual é o centro da resposta imunológica e inflamatória. A sua ativação está associada com a produção de IL-6 e TNF- α . No citoplasma das células o NF κ B encontra-se ligado ao I κ B- α , o qual é fosforilado por proteínas quinases estimuladas pelas EROs. Com a fosforilação do I κ B, o NF κ B é liberado e translocado para dentro do núcleo para iniciar a transcrição de genes pró-inflamatórios (DUNTAS, 2009; ELENKOV *et al.*, 2005).

2.4 Selênio

O selênio é um elemento não-metal, descoberto em 1817 pelo Químico sueco Jöns Jacob Berzelius. Em meados da década de 1950, o selênio foi definido como um micronutriente essencial, uma vez que os benefícios a saúde eram significativos. Em 1973, observou-se que o selênio era um componente essencial da enzima glutathiona peroxidase (GPx). Em humanos, a principal forma biológica do selênio é a selenocisteína (Sec) presente nas selenoproteínas, as quais são codificadas por 25 genes. A maioria dessas selenoproteínas participa das reações de oxido-redução (FAIRWEATHER-TAIT *et al.*, 2011; HESKETH, 2008).

A ingestão de selênio de diferentes tipos de alimentos ou suplementos alimentares apresenta diferenças quanto a sua utilização pela rota metabólica, devido principalmente às formas químicas que se apresentam, sejam elas inorgânicas ou orgânicas. A via de absorção do selênio não está completamente elucidada, mas sabe-se que as formas inorgânicas, selenato e selenito, são absorvidas mais eficientemente, no entanto, com menor retenção no organismo do que as formas orgânicas, selenocisteína e selenometionina (BURK *et al.*, 2006; THOMSON; BURTON; ROBINSON, 1978). Na **Figura 7**, está esquematizada a via metabólica de selênio, conforme a sua ingestão das diferentes formas. A maioria das formas de selênio é absorvida eficientemente, mas a sua utilização pelo organismo depende da via metabólica, a qual influenciará na forma de selênio que estará disponível no plasma para ser utilizada, e excreção dos compostos de selênio. O selenato e selenito são reduzidos pela diglutathiona formando o selenito de hidrogênio. Assim como a selenocisteína e selenometionina, esses compostos

entram no *pool* selenito (H_2Se). A partir de então, o selênio será utilizado para a síntese de selenoproteínas ou excretado pela urina na forma de selenoaçúcar (principal forma de excreção de selênio) (FAIRWEATHER-TAIT; COLLINGS; HURST, 2010; RAYMAN; INFANTE; SARGENT, 2008; ABDULAH *et al.*, 2005).

Em paralelo, a selenometionina pode ser incorporada diretamente em proteínas por meio da substituição da metionina. Uma via independente é a do composto orgânico γ -glutamil-metilselenocisteína, o qual é primeiramente convertido em metilselenocisteína (CH_3Sec) e transformado pela β -liase em metilselenol (CH_3SeH), este é excretado principalmente pela respiração, ou em menor quantidade pela urina na forma de íon trimetilselênio (RAYMAN; INFANTE; SARGENT, 2008; SUZUKI *et al.*, 2005). Ressalta-se que o metilselenol pode entrar na via do *pool* de selenito, conforme é mostrado na figura abaixo.

Figura 7. Via metabólica da ingestão de selênio em humanos, proposto por Rayman, Infante e Sargent (2008). Legenda: SeMet: selenometionina; Sec: selenocisteína; GSSeSG : selenodiglutationa; γ -glutamil- CH_3Sec : γ -glutamil-selênio-metilselenocisteína; H_2Se : Selenito de hidrogênio; HSePO_3^{2-} : selenofosfato; CH_3Sec : selênio-metilselenocisteína; CH_3SeH : metilselenol; $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$: dimetil selenito; SeO_2 : dióxido de selênio; $(\text{CH}_3)_3\text{Se}^+$: íon trimetil selênio.

A incorporação da selenocisteína na sequência de aminoácidos para formar a selenoproteína, ocorre durante a sua tradução, com início da codificação da proteína

no códon UGA na região codificadora do mRNA. Este códon é o local de finalização da tradução, no entanto, a recodificação do códon UGA para incorporação da selenocisteína necessita de uma estrutura *loop* específica chamada de sequência de inserção Sec (SECIS) na região 3' não traduzida (3'UTR) do mRNA (BELLINGER *et al.*, 2009; HESKETH, 2008).

Atualmente são conhecidos sete tipos de GPx, as quais incluem: GPx citosólica (GPx1), a GPx específica gastrintestinal (GPx2), a GPx encontrada no plasma (GPx3), a GPx fosfolípídio hidroperóxido (GPx4) e a GPx6, que foi recentemente descoberta e está localizada no epitélio olfatório e tecidos embrionários. Outras variantes da GPx que contém cisteína ao invés de selenocisteína, incluem a GPx5 com expressão restrita no epidídimo e a GPx fosfolípídio hidroperóxido sem a selenocisteína, nomeada de GPx7 (HUANG; ROSE; HOFFMANN, 2012; PAPP *et al.*, 2007; UTOMO *et al.*, 2004; KRYUKOV *et al.*, 2003).

O *status* de selênio de populações pode ser avaliado por meio de análises desse mineral nos cabelos, unhas, urina e mais diretamente através da sua concentração no sangue (sangue total, soro, plasma e eritrócitos). Análises de selenoproteínas em diferentes frações do sangue podem fornecer uma estimativa mais acurada do *status* de selênio (FAIRWEATHER-TAIT *et al.*, 2011).

Entre as selenoproteínas mais utilizadas para avaliar o *status* de selênio estão as GPx1, GPx3 e GPx4. A atividade dessas enzimas no plasma, eritrócitos ou plaquetas, em geral, responde a suplementação somente em populações deficientes em selênio, até mesmo porque a atividade da GPx3 só é aumentada com ingestão de selênio superior a 65µg por dia (FAIRWEATHER-TAIT *et al.*, 2011; OTTEN; PITZI HELLWIG; MEYERS, 2006).

O *Institute of Medicine* (IOM) através do *Food and Nutrition Board* (FNB), estimou as recomendações relativas ao selênio com o objetivo de evitar deficiência e toxicidade na população. A determinação das necessidades de selênio foi baseada na maximização da atividade da enzima glutathiona peroxidase, e os resultados foram utilizados como indicador para o cálculo da Necessidade Média Estimada (EAR) e Ingestão Dietética Recomendada (RDA). Esta última é definida como EAR mais 2 desvios padrão, resultando na seguinte equação: $RDA = 1,2 \times EAR$ (ESTADOS UNIDOS-IOM/FNB, 2000). As recomendações de ingestão de selênio estão apresentadas no **quadro 1**.

Quadro 1. Recomendações de ingestão relativas ao selênio em µg/dia, de acordo com a idade, proposto pelo *Institute of Medicine/Food and Nutrition Board*, 2000.

Recomendação de ingestão de referência DRIs	Selênio (µg/dia)				
	1-3 anos	4-8 anos	9-13 anos	14-18 anos	> 19 anos
EAR	17	23	35	45	45
RDA	20	30	40	55	55
UL	90	150	280	400	400

EAR – necessidade média estimada: valor de ingestão diária de um nutriente que, estima-se, supre a necessidade de metade dos indivíduos saudáveis de um determinado grupo do mesmo gênero e estágio de vida;

RDA – ingestão dietética recomendada: é o nível de ingestão dietética diária suficiente para atender às necessidades de um determinado nutriente de praticamente todos (97 a 98%) os indivíduos saudáveis de um determinado grupo do mesmo gênero e estágio de vida;

UL – nível máximo de ingestão tolerável: é o valor mais alto da ingestão diária continuada de um nutriente que aparentemente não oferece risco de efeito adverso à saúde para todos os indivíduos de um mesmo estágio de vida ou gênero.

Fonte: ESTADOS UNIDOS-IOM/FNB (2000).

A biodisponibilidade das diferentes formas de selênio necessita ser melhor investigada, como por exemplo, por meio da utilização de isótopos estáveis, e assim obter mais informações a cerca dos mecanismos de absorção. Além disso, estudos de curto e longo prazo precisam ser realizados para avaliar as variações dos biomarcadores funcionais, interações entre o selênio e outros micronutrientes, como por exemplo, a vitamina E, e a presença de polimorfismos em genes que codificam para selenoproteínas, os quais podem exercer influências sobre o metabolismo (FAIRWEATHER-TAIT; COLLINGS; HURST, 2010).

2.5 Selênio e diabetes

A relação que o selênio tem com as doenças crônicas se deve a sua participação na estrutura das selenoproteínas. Dentre estas selenoproteínas estão as GPx e as TrxR, as quais possuem uma molécula de selenocisteína, considerada o 21º aminoácido, nos seus centros catalítico. Como abordado anteriormente, a GPx

tem o papel de reduzir H_2O_2 em água e oxigênio. Neste contexto, o selênio pode exercer grande influência sobre o binômio saúde e doença.

O estado nutricional relativo ao selênio e o risco para o desenvolvimento de diabetes tem sido foco de grandes discussões no meio científico. Mueller *et al.* (2009) em uma revisão sobre a relação selênio e diabetes, discutiram vários estudos que apontam efeitos adversos do elevado *status* de selênio ou do seu uso permanente na forma de suplementos, no diabetes e síndrome metabólica. No entanto, poucos estudos mostraram efeito anti-diabético do selênio em humanos.

Estudos epidemiológicos têm reportado que elevadas concentrações de selênio no plasma foram associadas com aumento da prevalência de diabetes tipo 2, bem como com aumento circulante de glicose, LDL-c e triglicerídeos na população norte-americana (LACLAUSTRA *et al.*, 2010; LACLAUSTRA *et al.*, 2009; BLEYS *et al.*, 2008; BLEYS; NAVAS-ACIEN; GUALLAR, 2007).

Estudos similares aos da população americana foram conduzidos com a população europeia, com resultados conflitantes, mostrando tanto efeitos adversos quanto benéficos (AKBARALY *et al.*, 2010; STRANGES *et al.*, 2010; KORNHAUSER *et al.*, 2008).

A participação do selênio no metabolismo de carboidratos e de lipídios, tem sido investigada em estudos com animais e com células, e o efeito anti-diabético do selênio está relacionado a sua ação como um insulino-mimético, devido sua capacidade de ativar a proteína Akt e quinases envolvidas na cascata de sinalização da insulina, como a proteína quinase p70 S6 (PILLAI; SUGATHAN; INDIRA, 2012; STEINBRENNER *et al.*, 2011). No entanto, esses efeitos foram evidenciados com a utilização de concentrações elevadas de selênio, as quais são consideradas tóxicas para humanos (MUELLER *et al.*, 2009).

2.6 Relação entre selênio, estresse oxidativo e inflamação

O impacto que o selênio pode exercer sobre doenças etiológicamente causadas pela inflamação tem sido discutido na literatura. Nesse sentido, é vasta a quantidade de estudos que demonstram o papel do selênio nos processos inflamatórios induzidos pelo estresse oxidativo. Apesar da maioria desses estudos

ser *in vitro*, a indicação de que o selênio pode influenciar positivamente o processo inflamatório é muito forte. Doenças inflamatórias crônicas e agudas, com aumento da PCR, têm sido relacionadas com concentrações reduzidas de selênio sérico. Esse baixo *status* de selênio também tem sido observado em diversas síndromes de resposta inflamatória, as quais são caracterizadas pelo aumento na produção de EROs pelos macrófagos e pela indução do dano oxidativo e tecidual (DUNTAS, 2009; VUNTA *et al.*, 2008). O mecanismo exato pelo qual o selênio age como um agente protetor, atenuando as injúrias causadas pela inflamação não está claro. São várias as vias propostas para ação do selênio como substância anti-inflamatória. Essas vias estão interrelacionadas, mas atuam em níveis moleculares diferentes.

Dentre as vias em que o selênio atua na inflamação, a de varredura das EROs via selenoproteínas tem sido cada vez mais estudada. As espécies reativas são conhecidas como moduladoras chave em muitas vias de inflamação. Particularmente o H_2O_2 e $ONOO^-$ interagem com muitas moléculas, incluindo as proteínas celulares, estimulando vias que levam ao aumento da expressão de mediadores inflamatórios. O selênio por sua vez atua nessas vias por meio da capacidade das selenoproteínas em destoxificar as EROs, no entanto, as consequências desses processos sobre a expressão gênica ainda não estão totalmente esclarecidas. É sabido que mudanças no estado *redox* celular pela redução de peróxidos causam impacto na ativação de enzimas que atuam nas vias inflamatórias, como as ciclooxigenases (COX) e lipoxigenases (LOX), as quais produzem os mediadores lipídicos como prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina e ácidos graxos oxidados. A redução na produção desses mediadores pelo selênio indica seu papel como agente anti-inflamatório (KAUSHAL *et al.*, 2012; LANDS, 1984).

Ainda sobre o entendimento do papel do selênio nas vias de inflamação mediadas pelas EROs, não se pode deixar de enfatizar o efeito desse mineral na mitocôndria. Nesta organela, o sistema de transporte de elétrons também serve como uma fonte adicional de EROs, e o desequilíbrio *redox* na mitocôndria pode ter consequências graves, as quais ativam vias de transdução de sinal de inflamação e apoptose. Análises celulares da distribuição de selênio em amostras de fígado humano, indicam que este elemento é preferencialmente concentrado em mitocôndrias e núcleo (KAUSHAL *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 1999; HIRSCH *et al.*, 1998).

Na deficiência de selênio, a modulação das proteínas mitocondriais pode causar alterações na cadeia respiratória, aumentando, assim, a produção de radicais livres, e, conseqüentemente, ativando vias inflamatórias. Além disso, tem sido demonstrado que na deficiência de selênio algumas funções de células fagocíticas são negativamente alteradas. O papel do selênio como uma substância anti-inflamatória está ligado aos seus efeitos sobre as células imunológicas e na via de transdução de sinal para ativação dos macrófagos (KAUSHAL *et al.*, 2012). Ratos alimentados com dieta deficiente em selênio tiveram aumento nas concentrações de H₂O₂ de macrófagos peritoneais (BAKER; COHEN, 1984).

Muitos distúrbios causados pelas EROs são explicados, em parte, pelas concentrações reduzidas de GPx nas células, mas ainda é necessário elucidar o papel de muitas outras selenoproteínas para a compreensão do papel do selênio como agente anti-inflamatório.

O selênio também pode atuar na inflamação pela modulação das enzimas COX e LOX, via metabolismo do ácido araquidônico. Adicionado ao seu papel na desintoxicação de peróxidos durante a ativação de células fagocíticas, o selênio também está envolvido na modulação das enzimas COX e LOX pelas vias de prostaglandinas e leucotrienos do metabolismo do ácido araquidônico, um ácido graxo esterificado na posição *sn*-2 de fosfolípidios de membrana. O passo inicial na produção de eicosanoides necessita da liberação do ácido araquidônico a partir de fosfolípidos da membrana, por meio da atividade da fosfolipase A2, a qual é ativada em condições de estresse oxidativo. Nesse sentido, o acúmulo de peróxidos em condições de deficiência de selênio foi indiretamente implicado no aumento da atividade da fosfolipase A2 por meio da atividade da GPx reduzida (KUO; CHEN; BURGESS, 1995). Além disso, o selênio através da atividade da GPx1 participa de vários passos na via do metabolismo do ácido araquidônico, o que pode reduzir os intermediários lipídicos aos seus alcoóis correspondentes. Assim, a GPx1 reduz eficientemente os produtos de COX (PGG₂ a PGH₂) (KAUSHAL *et al.*, 2012).

Dentre os aspectos negativos dos hidroperóxidos lipídicos, estes exibem potencial apoptótico em diversos tipos celulares, além de ativar a via da MAPK envolvida na expressão de genes pró-inflamatórios, incluindo as enzimas COX e LOX. Assim, o estado nutricional relativo ao selênio serve como um determinante crítico dos níveis destes intermediários reativos, sendo crítico na fisiopatologia de

muitas doenças. Desse modo, o papel do selênio e das GPxs na biossíntese de prostaglandinas e leucotrienos, se dá pela capacidade em modular fatores sensíveis ao estado *redox*, entre eles o fator de transcrição NF κ B, cuja ativação tem relação direta com a produção de hidroperóxidos lipídicos e mediadores inflamatórios (KAUSHAL *et al.*, 2012).

O fator de transcrição NF κ B é denominado de "mediador central de respostas imunitárias e inflamatórias". Sua ativação é estimulada pelas citocinas, produtos bacterianos e virais, EROs e agentes mitogênicos, os quais induzem a fosforilação de dois resíduos de serina, que são reguladoras do I κ B. Esta proteína é então poliubiquitinada e degradada. Com isso o fator de transcrição NF κ B é desprendido do I κ B e se transloca para o núcleo, onde estimula a transcrição de genes pró-inflamatórios, dentre estes a COX-2, IL-6, TNF- α , entre outros (DUNTAS, 2009; VUNTA *et al.*, 2008; PRABHU *et al.*, 2002).

A partir do consenso de que a deficiência de selênio está relacionada com o aumento dos níveis intracelulares de EROs, estudos têm demonstrado ativação aumentada do NF κ B em células RAW 264.7 deficientes em selênio, quando comparadas com macrófagos suplementados com selênio em concentrações suprafisiológicas. Estes estudos enfatizam que alterações celulares do *status* de selênio podem atuar com regulador crítico das vias de ativação de macrófagos (VUNTA *et al.*, 2008; PRABHU *et al.*, 2002).

Zamamiri-Davis *et al.* (2002) mostraram que a suplementação de selênio reduziu a expressão dos genes pró-inflamatórios que codificam TNF- α e COX-2 por inibir a via da MAPK quinase induzida por lipopolissacarídeo (LPS- lipopolissacarídeo de bactéria *Gram* negativa). O aumento circulante de TNF- α pode induzir a ativação máxima do fator de transcrição NF κ B quando os níveis de selênio estão reduzidos, aumentando a secreção de PCR pelos hepatócitos. Essa citocina é um forte indutor de moléculas de adesão, como a VCAM, ICAM e E-selectina (molécula de adesão dos leucócitos no endotélio), as quais promovem a inflamação celular por recrutar leucócitos através do endotélio (VUNTA *et al.*, 2008).

O mecanismo, *in vivo*, pelo qual o selênio pode reduzir o processo inflamatório, se dá pelo aumento da expressão e atividade da GPx reduzindo os

níveis de EROs. Essa situação inibe a fosforilação do I κ B- α e a translocação do NF κ B para o núcleo (**Figura 8**) (DUNTAS, 2009).

Figura 8. Mecanismo proposto para ação do selênio na redução da expressão de genes pró-inflamatórios (Adaptado de Duntas, 2009). Legenda: EROs: espécies reativas de oxigênio; I κ B- α : proteína inibidora do NF κ B; NF κ B: fator de transcrição nuclear κ beta; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; IL: interleucina; PCR: proteína C reativa; Se: selênio; GPx: glutathione peroxidase.

Embora, existam evidências que o selênio possa modular a resposta inflamatória por mecanismos complexos, são necessários mais estudos para elucidar melhor esses mecanismos.

2.7 Castanha-do-brasil

A castanha-do-brasil é uma excelente fonte de selênio e contém considerável conteúdo de enxofre e dos aminoácidos metionina (18%) e cisteína (8%), além de alto teor de lipídios. A especiação química da castanha para avaliar a forma de selênio predominante, mostrou que o maior percentual deste mineral está sob a forma de selenometionina (FAIRWEATHER-TAIT; COLLINGS; HURST, 2010). Os estudos de especiação de selênio na castanha são limitados devido ao alto conteúdo de lipídios da mesma dificultar a análise (DUMONT *et al.*, 2006; VONDERHEIDE *et al.*, 2002).

Os estudos de biodisponibilidade mostram que o selênio ligado aos aminoácidos é absorvido mais rapidamente do que as formas inorgânicas deste elemento. 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, entre outros benefícios (FINLEY, 2005). A biodisponibilidade de selênio a partir de uma variedade de alimentos e sua eficácia em melhorar o estado nutricional relativo ao selênio tem sido investigada. A castanha-do-brasil, fonte vegetal mais rica em selênio, tem sido investigada como estratégia para melhorar o *status* de selênio (COMINETTI *et al.*, 2012; STOCKLER-PINTO *et al.*, 2010; COUTINHO, 2003; SILVA, 2002). As concentrações de selênio nas castanhas variam de 29 a 115µg Se/g. Essas diferenças no teor de selênio se devem a condições ambientais, como concentração desse mineral no solo, clima e safra (COMINETTI *et al.*, 2012; DUMONT *et al.*, 2006; COUTINHO, 2003; GONZAGA, 2002; VONDERHEIDE *et al.*, 2002).

As sementes oleaginosas, dentre elas a castanha-do-brasil, apresentam alto valor nutritivo, contendo cerca de 60-70% de ácidos graxos, incluindo os mono e poliinsaturados; 17% de proteínas e algumas com baixo conteúdo de carboidratos. Essas oleaginosas são ricas em elementos traços como o cromo, cobre, ferro, manganês, selênio, entre outros, e em vitaminas. Estudos recentes têm reportado as sementes oleaginosas como boas fontes de compostos fitoquímicos e antioxidantes naturais (ALASALVAR e SHAHIDI, 2009).

Os fitoquímicos são um conjunto de compostos bioativos que têm sido relacionados à redução do risco de doenças crônicas. Eles podem ser encontrados

em frutas, legumes, nozes, grãos integrais, produtos de vinho, chá, chocolate, cacau, bem como outros alimentos de origem vegetal. No entanto, os dados quantitativos sobre estes compostos presentes nas sementes oleaginosas são limitados (YANG; LIU; HALIM, 2009; BLOMHOFF *et al.*, 2006).

Os fitoquímicos são classificados em alcalóides, carotenóides, compostos organosulfurados, fenólicos e fitoesteróis. Os carotenóides, fenólicos (particularmente os flavonóides) e os fitoesteróis foram identificados e parcialmente caracterizados nas sementes oleaginosas (CHEN e BLUMBERG, 2008).

Uma porção significativa dos antioxidantes presentes nas sementes oleaginosas está localizada na película que recobre a semente, assim estas sementes quando armazenadas com a película tendem a conter maiores concentrações de compostos antioxidantes (BLOMHOFF *et al.*, 2006), justificando a indicação de consumo com a pele.

Os fitoquímicos das sementes oleaginosas têm sido associados com atividades antioxidante, antiviral, anti-proliferativa, hipocolesterolêmica e anti-inflamatória, sendo potencialmente capazes de alterar a iniciação e progressão de vários processos patogênicos (ALASALVAR e SHAHIDI, 2009).

Nesse sentido, hipotetizamos que o consumo da castanha-do-brasil, por ser um alimento rico em compostos com alta capacidade antioxidante (selênio e compostos fenólicos), poderia reduzir o estresse oxidativo e a inflamação. A participação do selênio por meio de suas selenoproteínas, principalmente as da família da GPx, na redução dos peróxidos de hidrogênio, poderia diminuir as concentrações de EROs. Como consequência, a ativação do fator de transcrição nuclear NFκB seria reduzida, causando a diminuição da expressão de genes pró-inflamatórios, e desta forma haveria melhora do *status* inflamatório dos pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1. Portanto, a melhora do *status* de selênio associado com a redução do estresse oxidativo e da inflamação poderia reduzir o risco das complicações do diabetes.

3 OBJETIVOS

Geral:

Avaliar o efeito da suplementação com castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) sobre a expressão gênica das citocinas inflamatórias e sua relação com o estresse oxidativo em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1.

Específicos:

- Caracterizar a castanha-do-brasil quanto à concentração de selênio, composição centesimal, perfil de ácidos graxos e atividade antioxidante *in vitro*;
- Avaliar o consumo alimentar e a composição corporal dos pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1;
- Avaliar o efeito do consumo da castanha-do-brasil sobre o *status* de selênio por meio das concentrações de selênio no plasma, eritrócitos, urina e atividade da GPx;
- Avaliar o efeito do consumo da castanha-do-brasil sobre os marcadores relativos ao estresse oxidativo, como a concentração de LDL⁽⁻⁾, MDA, 8-isoprostanos, bem como a atividade das enzimas antioxidantes GPx e SOD;
- Avaliar o efeito do consumo da castanha-do-brasil sobre as concentrações plasmáticas das citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-6), proteína C reativa (PCR), moléculas de adesão leucocitária (VCAM-1 e ICAM-1), proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), fibrinogênio e do inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1);
- Avaliar o efeito do consumo da castanha-do-brasil sobre a expressão gênica da GPx-1, IL-6, TNF- α , COX-2, MCP-1 e ICAM.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)

4.1.1 Determinação da concentração de selênio e da composição centesimal

As castanhas utilizadas neste estudo foram fornecidas pela empresa Agropecuária Aruanã S/A (Itacotiara-AM). As castanhas foram embaladas a vácuo e acondicionadas a 4°C, a fim de reduzir o processo de oxidação. Primeiramente, obteve-se uma amostra aleatória das castanhas referente ao lote fornecido, em seguida estas foram trituradas e liofilizadas, e pela diferença entre o peso obtido antes e após a liofilização, determinou-se a percentagem de umidade. A partir da amostra seca, foram realizadas as análises de selênio, cinzas, proteínas e lipídios.

A determinação da concentração de selênio nas castanhas-do-brasil foi realizada por meio do método de espectrometria de absorção atômica por geração de hidretos acoplados a cela de quartzo (HGQTAAS). Primeiramente, foi pesado 50 mg da amostra em tubos de micro *Kjeldhal* e, em seguida, adicionado 5 mL de ácido nítrico 68% P.A. (Merck®), deixando em repouso durante a noite. Em seguida, a digestão foi realizada em bloco digestor com temperatura inicial de 50°C, a qual foi aumentada gradativamente até alcançar, no máximo, 150°C, a fim de eliminar as substâncias orgânicas. Após essa etapa foi realizada a redução do selênio presente na solução, da forma VI para a forma IV, com o acréscimo de 5 mL de HCL 1,2N e aquecimento durante duas horas a temperatura de 100°C. Em seguida, esta solução foi diluída para 100 mL com água nanopura e submetida à leitura da concentração de selênio em espectrofotômetro de absorção atômica com geração de hidretos (FOSTER, SUMAR, 1996; HAO *et al.*, 1996). A análise foi realizada em triplicata e os resultados foram expressos em µg/100g de castanha *in natura*.

O material de referência certificado pelo *National Institute of Standart & Technology* (NIST), *Wheat Flour Standart Reference Material 1567^a*, foi utilizado como controle da metodologia. A análise foi por digestão úmida ácida, seguindo os mesmos padrões das amostras.

A curva de calibração utilizada na análise de selênio foi preparada com Tritisol® *selenium standart solution* (1000 mg/L) - Merck®, nas seguintes concentrações: 0,0; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 10,0; 30,0 µg/L e com 10% de HCL 1,2 N.

A composição centesimal foi realizada de acordo com as técnicas da *Association of Official Analytical Chemists* (2000) e Instituto Adolfo Lutz (2005), perfazendo umidade, proteína total, lipídios, cinzas e carboidratos totais. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.1.2 Determinação do perfil de ácidos graxos

Os lipídeos foram extraídos conforme método proposto por Folch, Lees e Stanley (1957). Para tanto, foram pesados cerca de 2 g de amostra, na qual foram adicionados 10 mL de metanol e homogeneizados por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 20 mL de clorofórmio e homogeneizados por mais 2 minutos. A mistura obtida foi filtrada a vácuo e coletada em kitassato. O resíduo contido no filtro foi então homogeneizado com 30 mL da solução clorofórmio:metanol (2:1) por 3 minutos e novamente filtrado. O tubo de extração foi lavado com 20 mL de clorofórmio e o resíduo contido no filtro foi lavado com 10 mL de metanol. O filtrado contido no kitassato foi transferido para uma proveta e o volume foi medido para acréscimo de 1/4 de cloreto de potássio (KCl 0,88%). A mistura foi agitada manualmente e a fase superior foi aspirada a vácuo. O volume residual foi aferido para adicionar 1/4 da solução metanol:água (1:1). Após agitação, a fase superior foi aspirada a vácuo e a solução restante foi filtrada em sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado em evaporador rotativo (modelo B525, Micronal, São Paulo, Brasil) sob vácuo a 35°C. O lipídeo foi ressuspenso em 2 mL de clorofórmio, transferido para tubos de vidro com tampa rosqueada e o solvente foi evaporado com nitrogênio gasoso.

Em seguida, foi preparado os ésteres metílicos de ácidos graxos, a partir da metodologia proposta pela *American Oil Chemist's Society* (AOCS) Ce 2-66 (2004). Em cada tubo contendo o lipídeo extraído foram adicionados 2 mL de NaOH metanólico (0,5 N). Em seguida, os tubos foram agitados manualmente e colocados em banho fervente por 10 minutos. Após resfriamento, foram acrescentados 2,5 mL de trifluoreto de boro (BF₃) 14% e os tubos foram novamente colocados no banho fervente por 2 minutos. A mistura foi então resfriada para posterior adição de 2 mL

de heptano e nova submissão dos tubos ao banho por 1 minuto. Os tubos foram retirados do banho, nos quais se acrescentaram 5 mL de solução saturada de cloreto de sódio (NaCl). A mistura foi agitada vigorosamente e 1 mL da fase superior foi transferida para *vial* específicos para análise de cromatografia contendo sulfato de sódio anidro. As amostras foram analisadas em cromatógrafo a gás (modelo GC 17^a, Shimadzu, Kyoto, Japão) acoplado com *software* Class GC, utilizando-se coluna de sílica fundida SP-2560 (bis-cianopropilpolisiloxana) de 100 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,2 µm de espessura da fase estacionária. A temperatura inicial de 140°C foi mantida em isotérmico por 5 minutos, seguida de aquecimento a 4°C por minuto até atingir 240°C onde permaneceu isotérmico por 20 minutos. As temperaturas do injetor e detector foram 250 e 260°C, respectivamente, o gás de arraste foi o Hélio (fluxo 1 mL/min) e a razão de divisão da amostra no injetor 1:200.

4.1.3 Estudo da atividade antioxidante *in vitro*

Obtenção das frações de ácidos fenólicos presentes na castanha-do-brasil

Os ácidos fenólicos da castanha-do-brasil foram obtidos de acordo com a metodologia de Krygier, Sosulski e Hogge (1982) que permite separar as frações de ácidos fenólicos livres, assim como os esterificados solúveis e insolúveis. Para obtenção da fração livre, 1 g de farinha da castanha previamente desengordurada foi extraído 6 vezes em Ultra-Turrax (modelo DI 25 basic, IKA®, Staufen, Alemanha) por 1 minuto com 20 mL de tetraidrofurano (THF), à temperatura ambiente, e protegido da luz (**Figura 9**). Os sobrenadantes obtidos foram combinados, desidratados com sulfato de sódio anidro e o solvente foi evaporado em evaporador rotativo (modelo B525, Micronal, São Paulo, Brasil) sob vácuo, a 30°C. O concentrado foi ressuspenso em 5 mL de metanol e transferido para frasco âmbar. Esta fração foi denominada de fração rica em ácidos fenólicos livres (AFL).

O resíduo restante foi novamente extraído 6 vezes em Ultra-Turrax com uma solução de metanol:acetona:água (6:6:7), à temperatura ambiente; e os sobrenadantes foram filtrados e evaporados em evaporador rotativo sob vácuo a 30 °C até a fase

aquosa. A suspensão aquosa e o resíduo foram hidrolisados com volume igual e 20 mL de NaOH 4N, respectivamente, por 4 horas sob fluxo de nitrogênio, à temperatura ambiente, e protegidos da luz. Posteriormente, o pH das soluções foi ajustado com HCl 6 N para pH 2,0. Após a acidificação, os sobrenadantes foram extraídos 5 vezes com hexano com a finalidade de remover ácidos graxos livres e outros contaminantes. Os ácidos fenólicos liberados da fração solúvel (fase aquosa) e insolúvel (resíduo) foram, então, re-extraídos separadamente 6 vezes com éter etílico (EE):acetato de etila (AE):THF (1:1:1). Ao final de cada extração, os sobrenadantes foram combinados, filtrados e desidratados com sulfato de sódio anidro, evaporados em evaporador rotativo sob vácuo a 30 °C e, em seguida, ressuspensos em 5 mL de metanol, as quais foram denominadas de frações ricas em ácidos fenólicos solúveis (AFS) e insolúveis (AFI). Todas as frações permaneceram em *freezer* (−20 °C) até posteriores análises.

Figura 9. Fluxograma de obtenção das frações de ácidos fenólicos. Legenda: TH: tetraidrofurano; EE: éter etílico; AC: acetato de etila; AFL: ácidos fenólicos livres; AFS: ácidos fenólicos solúveis; AFI: ácidos fenólicos insolúveis.

Determinação dos fenólicos totais

A quantificação dos fenólicos totais nas frações de ácidos fenólicos foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Swain e Hills (1959) com algumas modificações. Foram tomados 0,5 mL da solução teste, adicionados 8 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente de Folin Ciocalteu. Após 3 minutos, adicionou-se 1 mL de solução saturada de carbonato de sódio (Na_2CO_3). As misturas foram mantidas em repouso, ao abrigo da luz, por uma hora em temperatura ambiente e então, a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro (Genesys, modelo Spectronic 20, Rochester, USA) a 720 nm. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico, determinados por uma curva padrão (2,5-100 µg de ácido gálico).

Atividade antioxidante *in vitro*

Foram realizados quatro ensaios para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* das frações de ácidos fenólicos. As análises foram realizadas em triplicata e expressas em µg de resíduo seco de amostra.

Atividade antioxidante em sistema de varredura do radical 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•)

A atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos foi avaliada pelo ensaio do radical DPPH• segundo Blois (1958) e Brand-Willians *et al.* (1995), que tem como princípio a redução do radical DPPH•. Uma alíquota de 0,5 mL de amostra, em diferentes concentrações, foi adicionada a 1,5 mL de solução metanólica de DPPH• a 6×10^{-5} mol/L. As determinações foram acompanhadas de um controle sem antioxidante, contendo 0,5 mL de metanol. A redução do radical DPPH• foi medida a 517 nm em espectrofotômetro (Genesys, modelo Spectronic 20, Rochester, USA) logo após 30 minutos de repouso. O decréscimo nos valores de densidade ótica das amostras foi correlacionado com o do controle e estabelecido o percentual de varredura do radical DPPH•, expressa pela equação:

$$\% \text{ de varredura} = 100 - [(Abs_{\text{amostra}} \times 100) / Abs_{\text{controle}}]$$

Capacidade redutora

A capacidade redutora das amostras foi avaliada de acordo com Oyaizu *et al.* (1986) com pequenas modificações. As diferentes concentrações das amostras (0,2 mL) foram misturadas com 0,5 mL de tampão fosfato de sódio (0,2 M pH 6,6) e 0,5 mL de ferricianeto de potássio (1% peso/volume). A mistura foi incubada por 20 minutos a 50 °C. As amostras foram resfriadas e 0,5 mL de ácido tricloroacético (10% peso/volume) foi adicionado. A mistura foi agitada e centrifugada a 3.000 rpm por 10 minutos. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante, 0,1 mL de cloreto férrico (0,1% peso/volume) e 0,5 mL de água destilada foram misturados e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente. A absorbância foi medida a 720 nm no espectrofotômetro (Genesys, modelo Spectronic 20, Rochester, USA). O aumento na absorbância foi considerado como aumento da capacidade redutora.

Atividade antioxidante em sistema β -caroteno/ácido linoleico

Os procedimentos de análise foram realizados de acordo com o método descrito por Miller (1971) e adaptado por Moreira e Mancini-Filho (2004). Os produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico, por diferentes indutores (oxigênio, luz e calor), foram medidos indiretamente pela taxa de destruição oxidativa do β -caroteno, determinada por espectrometria a 470 nm. A queda na leitura da densidade ótica das amostras foi correlacionada com o controle (sem antioxidante), considerado como 100% de oxidação.

Para o preparo do meio emulsionado, adicionou-se 0,02 mL de solução β -caroteno (20 mg/mL, diluído em clorofórmio), 0,04 mL de ácido linoléico, 530 mg de emulsificador (*Tween* 40) e 1 mL de clorofórmio. Posteriormente, o clorofórmio foi totalmente evaporado com nitrogênio gasoso. Por fim, foram acrescentados 100 mL de água destilada previamente saturada com oxigênio durante 30 minutos. O meio de reação apresentou-se límpido com absorbância entre 0,6 e 0,7 em 470 nm.

Alíquotas de 5 mL do meio de reação foram transferidas para tubos espectrofotométricos contendo 100 μ L de amostra em diferentes concentrações. Todas as determinações foram acompanhadas de um controle sem antioxidante. Os valores da densidade ótica foram obtidos no tempo zero e 120 minutos depois,

enquanto as amostras eram mantidas em banho-maria a 50°C, em espectrofotômetro (Genesys, modelo Spectronic 20, Rochester, USA). Os resultados foram expressos em percentual de proteção da oxidação.

O decaimento da densidade ótica do controle ($Abs_{inicial} - Abs_{final}$) foi considerado como 100 % de oxidação. A partir desta relação, o decréscimo na leitura da absorbância das amostras foi correlacionado com o controle, estabelecendo desta forma, o percentual de proteção da oxidação das amostras pela equação:

$$\% \text{ de proteção da oxidação} = 100 - [(Abs_{amostra} \times 100) / Abs_{controle}]$$

Atividade antioxidante pelo método de peroxidação espontânea em homogenato de cérebro de rato

O estudo utilizando animais de laboratório foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP, Protocolo CEUA/FCF/307 (**ANEXO 1**).

Preparo do homogenato

Neste ensaio foi utilizado cérebro de rato Wistar macho. O animal foi anestesiado e após decaptação, o cérebro foi imediatamente lavado com NaCl 0,9% frio e homogeneizado em uma relação de 1g de tecido: 9 mL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,4). O homogenato foi centrifugado a 800 x g a -4°C durante 15 minutos e o sobrenadante obtido foi utilizado para o ensaio.

Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação de TBARS foi realizada pela técnica de Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979): 25 µL de homogenato de cérebro foram incubados com igual volume de diferentes frações estudadas a 37°C durante 40 minutos em banho termostatzado com oscilação. Posteriormente, foram adicionados 350 µL de ácido acético a 20% (pH 3,5) e 600 µL de TBA a 0,5%, diluído em ácido acético. Os tubos foram incubados durante uma hora a 85°C. Em seguida, foram resfriados em gelo e adicionados 50 µL de sódio dodecyl sulfato (SDS) a 10% e centrifugado a 500 x g durante 15 minutos a temperatura

ambiente. A absorvância foi lida a 532 nm. A atividade antioxidante foi expressa em porcentagem de inibição da lipoperoxidação espontânea a partir de uma amostra sem antioxidante, que foi considerada como 100% de oxidação.

4.2 Estudo da suplementação com castanha-do-brasil

Foram selecionados 70 pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 de ambos os gêneros, com idade entre 10 e 25 anos, voluntários, que fazem acompanhamento clínico no Setor de Endocrinologia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP e também de associados de entidades não governamentais voltadas para o cuidado de pacientes com diabetes (Associação de Diabetes do ABC e Associação de Diabetes de Sorocaba).

Foi aplicado um questionário, a fim de obter informações sócio-econômicas, antecedentes familiares para doenças crônicas não-transmissíveis, uso de medicamentos e presença de doenças. A seleção dos participantes foi realizada a partir dos seguintes critérios de inclusão: presença de diabetes *mellitus* tipo 1 e faixa etária acima citada, ausência de doenças que interferissem no estado nutricional relativo ao selênio (artrite reumatóide, câncer, insuficiência renal crônica, disfunções da tireoide, processo inflamatório agudo) e não utilização de suplementos vitamínico-mineral (**ANEXO 2**).

Todos os participantes e/ou responsáveis foram esclarecidos sobre os procedimentos aos quais foram submetidos e o destino do material biológico coletado, assim como, a demanda de tempo necessária para a realização do estudo. Foram informados também sobre o direito de desistir de participar da pesquisa em qualquer momento, sem constrangimentos.

Os participantes e/ou responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que descreve as informações sobre o projeto, de acordo com a Resolução CNS nº 196/96, itens III, IV e V, que tratam da proteção dos participantes e orienta procedimentos referentes às pesquisas que necessitam experiências com humanos (**ANEXO 3**).

Esta pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEPFCF/91/2009) e dado ciência ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP (**ANEXO 4**).

4.2.1 Protocolo Experimental

O estudo foi de natureza longitudinal. Foram constituídos dois grupos de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1. Um grupo recebeu suplementação de 2,5 g de castanha-do-brasil (aproximadamente 290µg de selênio) por dia durante sessenta dias (SDM) e o segundo que não recebeu suplementação (CDM), conforme ilustrado na figura a seguir:

Grupo SDM: recebeu suplementação com 2,5 g de castanha-do-brasil *in natura* por dia;
Grupo CDM: não recebeu suplementação ou qualquer tipo de intervenção nutricional.

Figura 10. Esquema da suplementação com castanha-do-brasil em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1. Legenda: SDM: grupo experimental suplementado-diabetes *mellitus*; CDM: grupo controle-diabetes *mellitus*; T0: tempo inicial de avaliação e T1: tempo final de avaliação.

Nos dois tempos de avaliação, os participantes foram submetidos à coleta de sangue, avaliação antropométrica e do consumo alimentar, e orientados a coletar urina de 24 horas.

A avaliação da composição corporal consistiu de aferições de peso, estatura, circunferência da cintura e de bioimpedância (**ANEXO 5**). As informações sobre o consumo alimentar foram obtidas por meio de registros alimentares de 3 dias, destes, um dia foi referente ao final de semana (sábado ou domingo) (**ANEXO 6**).

O material biológico coletado no início do estudo foi analisado para caracterizar os participantes quanto ao estado nutricional relativo ao selênio, perfil lipídico, grau de inflamação e de estresse oxidativo. Após o período de intervenção foi realizada a avaliação dos mesmos parâmetros com o intuito de verificar o efeito da suplementação com a castanha-do-brasil. A **Figura 11** mostra o fluxograma das atividades desenvolvidas neste estudo.

Figura 11. Fluxograma de atividades desenvolvidas. Legenda: Se: selênio; HbA_{1c}: hemoglobina glicada; TG: triglicerídeos; CT: colesterol total; HDL-c: lipoproteína de alta densidade; LDL-c: lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c: lipoproteína de muito baixa densidade; MDA: malonaldeído; LDL⁽⁻⁾ lipoproteína de baixa densidade eletronegativa; GPx: glutathione peroxidase; SOD: superóxido dismutase; IL-6: interleucina-6; TNF-α: fator de necrose tumoral-alfa; VCAM: molécula de adesão celular vascular; ICAM: molécula de adesão celular intercelular; MCP-1: proteína quimiotática de monócitos; PAI-1: inibidor de plasminogênio ativado -1.

4.2.2 Avaliação Antropométrica

Peso

Para aferição do peso foi utilizada balança antropométrica com graduação de 100g. Os participantes foram posicionados no centro da balança, sem calçados, usando a menor quantidade de roupa possível, em posição ereta e com os braços estendidos ao longo do corpo.

Estatura

A estatura foi aferida utilizando antropômetro fixo na parede, estando os participantes descalços, em pé com os pés juntos, e braços estendidos ao longo do corpo, olhando para a linha do horizonte com a cabeça formando um ângulo de 90°.

Índice de massa corpórea

O índice de massa corpórea (IMC) foi calculado dividindo-se o peso atual pela estatura ao quadrado, sendo que o peso foi aferido em quilogramas e a altura em metros, e o resultado analisado de acordo com a classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000).

Circunferências da cintura

A circunferência da cintura foi aferida com o paciente em pé, com os pés juntos e braços estendidos ao longo do corpo, utilizando uma fita métrica não-extensível. A mesma circunda o indivíduo no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca. A leitura foi feita no momento da expiração e o resultado foi analisado de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1998).

Impedância bioelétrica

Para determinação desta medida, os indivíduos ficaram deitados, em decúbito dorsal, com as pernas e os braços afastados do corpo. Após a limpeza da pele, os dois eletrodos (um distal e outro proximal) foram colocados no pé direito: o eletrodo distal na base de dedo médio e o eletrodo proximal um pouco acima da linha da articulação do tornozelo, entre os maléolos medial e lateral da tíbia; e na mão direita: o eletrodo distal na base do dedo médio e o eletrodo proximal um pouco acima da linha da articulação do punho, coincidindo com o processo estilóide.

4.2.3 Avaliação do consumo alimentar

Para avaliação do consumo alimentar foi utilizado o método do registro alimentar de três dias, com a orientação para o registro de todos os alimentos consumidos em dois dias durante a semana e mais um dia no final de semana.

A análise dos alimentos consumidos pelos participantes da pesquisa, foi feita por meio do *software* NutWin, do Departamento de Informática da Escola Paulista de Medicina/UNIFESP. A este *software* foi acrescentado a concentração de selênio de alimentos produzidos no Brasil, tanto do estudo de Ferreira *et al.* (2002) quanto de dados produzidos no Laboratório de Nutrição e Minerais/FCF/USP. A adequação das dietas foi realizada por meio das DRIs de 2000, considerando os macronutrientes e micronutrientes. Os valores da ingestão dos micronutrientes (selênio, zinco, cobre, manganês, vitaminas C e E) foram ajustados pela energia quando os resultados seguiram distribuição normal segundo o método residual proposto por Willet (1998).

4.2.4 Coleta dos materiais biológicos e avaliação bioquímica

Sangue

Amostras de 15 mL de sangue foram colhidas no período da manhã, estando os participantes em jejum de 12h. Essas amostras foram destinadas à análise de selênio, perfil lipídico e glicêmico, marcadores de estresse oxidativo e de inflamação, e de expressão gênica das citocinas e GPX1. Após a coleta, o plasma foi separado dos eritrócitos por centrifugação a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C, e

acondicionado em tubos de polipropileno, armazenados a -80°C para posterior análise.

Após este procedimento, a massa eritrocitária obtida do sangue total foi lavada três vezes com 5 mL de solução fisiológica à 0,9% de NaCl, homogeneizada lentamente por inversão e centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado. Após a última centrifugação, a solução fisiológica foi aspirada, a massa de eritrócito foi cuidadosamente extraída com micropipeta e colocada em tubos de polipropileno, armazenados à -80°C até o momento da análise.

Urina de 24 horas

As amostras de urina foram coletadas em frascos previamente desmineralizados, os quais foram entregues aos participantes para que a coleta fosse realizada em domicílio. Os participantes foram orientados quanto à forma correta de coletar e armazenar a urina, os frascos foram entregues à pesquisadora no dia da coleta de sangue. Após o recebimento das amostras de urina, estas foram armazenadas a -80°C para posterior análise.

Controle de contaminação

Todo o material utilizado (vidrarias, plásticos, ponteiros, tubos, etc.) para análises de selênio foi desmineralizado em banho de ácido nítrico a 30%, pelo período mínimo de 12 horas, e foi enxaguado pelo menos 10 vezes consecutivas com água nanopura, minimizando assim a contaminação por minerais. O material utilizado nas demais determinações foi esterilizado e *RNase free*.

4.2.5 Parâmetros bioquímicos de avaliação do selênio

Determinação de selênio no plasma, eritrócitos e urina

As amostras de plasma (350 µL), eritrócitos (300 µL) e urina (300 µL) foram primeiramente digeridas por via úmida ácida, ou seja, nos tubos de micro *Kjeldhal* contendo as amostras foram adicionados 5 mL de ácido nítrico 68% P.A. (MERCK®)

e mantidos em repouso durante a noite. Em seguida, a digestão foi realizada em bloco digestor com temperatura inicial de 50°C e foi aumentada gradativamente até alcançar, no máximo, 150°C, a fim de eliminar as substâncias orgânicas. A seguir foram acrescidos 5 mL de HCL 1,2 N para reduzir o selênio presente na forma VI para forma IV, e as amostras ficaram sob aquecimento por duas horas a temperatura de 100°C. Após este procedimento essas soluções foram diluídas para 25 mL com água deionizada e submetidas a leitura de selênio, por meio do método de espectrometria de absorção atômica por geração de hidretos acoplados a cela de quartzo (HGQTAAS) (modelo Z5000, Hitachi, Tokio, Japão) (HAO *et al.*, 1996; SABÉ; RUBIO; GARCÍA-BELTRÁN, 2000; ROMERO *et al.*, 2001). Os resultados foram expressos em µg/L.

4.2.6 Determinações dos parâmetros glicêmicos e lipídicos

A determinação das concentrações séricas de glicose foi realizada pelo método enzimático, e a determinação da hemoglobina glicada, por troca iônica, utilizando kits comerciais (Labtest, Lagoa Santa-Minas Gerais, Brasil).

As concentrações de colesterol plasmático total, HDL-colesterol, e triglicerídeos também foram realizadas por métodos enzimáticos comerciais (Labtest, Lagoa Santa-Minas Gerais, Brasil). O colesterol contido na fração HDL foi determinado após a precipitação das frações LDL e VLDL. As frações LDL e VLDL foram calculadas utilizando-se a equação de Friedwald, Levy e Fredrickson (1972), onde: $LDL-c = CTc - (VLDLc + HDLc)$ e $VLDLc = Triacilglicerol/5$.

4.2.7 Determinação da atividade enzimática

Glutathione peroxidase

A atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx) foi determinada no sangue total e nos eritrócitos. Esta análise foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Paglia & Valentine (1967), em um analisador bioquímico Labmax 240, usando kit disponível comercialmente (Ransel; Randox Laboratories, UK). Essa técnica baseia-se na oxidação da glutathione pelo peróxido de hidrogênio.

Na presença da glutatona redutase e NADH, a glutatona oxidada é imediatamente convertida a forma reduzida com concomitante oxidação de NADH (reduzindo NADPH a NADH⁺). Também foi determinada a concentração de hemoglobina, uma vez que a atividade da enzima foi expressa em U/g de hemoglobina.

Superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada nos eritrócitos, pelo método *in vitro*, em um analisador bioquímico Labmax 240, usando um kit disponível comercialmente (Ransod; Randox Laboratories, UK), conforme metodologia recomendada pelo fabricante. Este método emprega xantina oxidase para gerar radicais O₂⁻, que reagem com 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-cloreto de feniltiazol (INT) para formar vermelho formazan. A atividade da superóxido dismutase é medida por meio do grau de inibição desta reação. Os eritrócitos foram diluídos 300 vezes em tampão fosfato 0,01 mol/l (pH 7,0), de forma que o percentual de inibição ficasse entre 30% e 60%. Para tanto, foram preparados além da amostra, o substrato misto, tampão, xantina oxidase e o padrão, e os resultados foram expressos em U/g de hemoglobina.

4.2.8 Determinação da concentração de malondialdeído (MDA) no plasma

O malonaldeído (MDA) é um aldeído de cadeia curta, sendo um dos compostos medidos pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). A formação de malonaldeído ocorre pela decomposição dos hidroperóxidos lipídicos e sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos, em células e tecidos. A reação do aduto MDA-(TBA)₂ está esquematizada abaixo:

Para a análise da concentração de MDA, alíquotas de 250 μL das amostras de plasma foram hidrolisadas pela adição de 36 μL de uma solução de hidroxitolueno butilado (BHT) 0,2 % diluído em etanol, 12,5 μL de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH, 10 M) e incubação a 60 °C por 30 minutos sob agitação de 700 rpm. Ao término da hidrólise, necessária para clivar o MDA das proteínas plasmáticas, foram adicionados 1500 μL de uma solução contendo ácido tricloroacético (TCA) 7,2% e iodeto de potássio (KI) 1%, a reação foi acondicionada a 4 °C por 10 minutos. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 3300 rpm por 10 minutos para a precipitação protéica. Posteriormente, 1000 μL do sobrenadante foi transferido para tubos de rosca e a este foi adicionado 500 μL de uma solução de TBA 0,6%. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 90 °C por 45 minutos sob agitação de 200 rpm. Ao término desta incubação, 250 μL de álcool butílico (n-butanol) foi adicionado e os tubos foram vigorosamente agitados por 20 segundos no vórtex. Para a extração, as amostras foram novamente centrifugadas a 6000 rpm por 10 minutos, a fração orgânica contendo o produto cromógeno foi coletada e transferida para *vials* de HPLC.

Alíquotas de 50 μL da fase orgânica foram por fim injetadas em um sistema de HPLC-UV (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com duas bombas LC-20AT, um detector de arranjo de fotodiodos PDA-20AV, um auto injetor (Proeminence SIL– 20AC) e um forno para colunas (CTO-10AS/VP) controlado por um módulo de comunicação CBM-20A. Os dados foram processados pelo *software* LC-Solution 1.21. (Shimadzu, Japão). A seguinte condição cromatográfica foi utilizada: Coluna Luna C18 (2) (150 mm x 2 mm, ID, 5 μm , Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) foi eluída em modo isocrático, por uma fase móvel constituída de 65% de tampão fosfato de potássio (KH_2PO_4 , 50 mM, pH 7,0) e 35% de metanol, a 30 °C, com fluxo de 1mL/min. O detector de arranjo de fotodiodos foi fixado em 532 nm para a quantificação do complexo TBA-MDA-TBA, concomitantemente curvas de calibração foram feitas diariamente no intervalo de 0,5-10 μM de MDA diluída em solução tampão de fosfato (*phosphate buffered salina* - PBS). A concentração da solução estoque de MDA foi calculada através da determinação da absorbância em uma solução contendo 1% de ácido sulfúrico, utilizando o respectivo coeficiente de extinção molar (ϵ) = 13700 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ em λ = 245 nm (BASTOS *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2011).

4.2.9 Determinação da LDL⁽⁻⁾ no plasma

A avaliação de LDL⁽⁻⁾ foi realizada no plasma. Para isso foi adicionada uma solução contendo inibidores de proteases nas amostras de plasma armazenadas a -80°C, quais sejam: aprotinina, benzamidina, fenil-metil sulfonil fluoreto (PMSF) e hidroxitolueno butilato (BHT) (todos os reagentes eram da Sigma-Aldrich® Steinheim, Germany), na proporção de 5 µL para cada 1 mL de plasma. As concentrações finais de antioxidantes nas amostras foram: 2µg/mL de aprotinina, 2mM de benzamidina, 1 mM de PMSF e 20 mM de BHT.

As microplacas de poliestireno com 96 poços foram sensibilizadas com 10µg/mL/poço de anticorpo monoclonal anti LDL-1A3H2 diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M (pH 9,6) e foram aplicados 50 µL/poço, para em seguida serem incubadas por 16-18 horas a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as placas foram lavadas três vezes com 200 µL de tampão PBS-Tween 0,05%, e em seguida foi retirado o excesso de líquido. A partir de então, as placas foram bloqueadas com 150µL/poço de solução PBS-Tween 0,01% e leite desnatado a 2% (Molico®, Nestlé), previamente inativado pelo aquecimento a 100°C e filtrado em gaze. Após 90 minutos de incubação a 37°C, o sobrenadante foi desprezado e repetido o procedimento de lavagem descrito anteriormente. Foram aplicados às placas 50µL/poço da amostra diluída 2000 vezes em PBS-Tween 0,01% e leite desnatado a 1%, em triplicata. Na curva padrão foi utilizada LDL⁽⁻⁾ (concentração de 238µg/mL) obtida a partir de plasma humano após a realização de todos os procedimentos de purificação. O material foi incubado por 90 minutos a 37°C. Em seguida foi realizado novo procedimento de lavagem, e as placas foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-LDL⁽⁻⁾2C7D5F10 conjugado com biotina (10µg/mL/poço), diluído em PBS-Tween 0,01% e leite desnatado 1%, e aplicados 50µL/poço, por 60 minutos a 37°C. As placas foram lavadas 4 vezes e permaneceram imersas durante 30 segundos. Foram adicionados 50µL/poço de streptavidina conjugada com peroxidase por 60 minutos a 37°C. A reatividade da peroxidase foi medida nas placas lavadas e incubadas em orto-fenilenediamina (OPD) diluída em tampão citrato-fosfato (pH 5,3), e adicionados 5 µL de peróxido de hidrogênio (50µL/poço) durante 15 minutos a 37°C. Após a adição de ácido sulfúrico

2M (50µL/poço) a reação foi interrompida e a leitura das microplacas foi realizada em espectrofotômetro (*Spectra Counci Microplate Photometer, Packard Instruments Company, EUA*) com comprimento de onda de 492nm. Os valores foram expressos em U/L. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

4.2.10 Concentração de isoprostanos (8-iso PGF₂α)

A determinação de 8-iso PGF₂α na urina foi realizada por ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) utilizando o kit 8-isoprostane EIA[®] (Cayman Chemical Co), conforme o protocolo de análise fornecido pelo fabricante. As amostras foram diluídas 20 vezes em água nanopura. A leitura das placas foi realizada em leitor de microplacas (SpectraMax190, Molecular Devices) com comprimento de onda de 410nm, e os resultados calculados em pg/mL.

4.2.11 Determinação dos marcadores inflamatórios

A determinação das IL-6, TNF-α, MCP-1, PAI-1, VCAM-1 e ICAM-1 foi realizada no soro de acordo com o método Luminex xMAP, utilizando pares de anticorpos monoclonais comercialmente disponíveis; e a quantificação da proteína C reativa e do fibrinogênio do soro foram determinadas pelo método *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA). Os resultados de fibrinogênio, proteína C reativa, ICAM, VCAM e PAI-1 foram expressos em ng/mL e IL-6, TNF-α e MCP-1 foram expressos em pg/mL.

4.2.12 Expressão gênica de TNF-α, IL-6, COX-2, MCP-1, ICAM e GPx-1

A extração do RNA total foi realizada com o kit RiboPureTM – Blood Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. Após a extração do RNA, este foi tratado com DNase I a fim de remover eventual contaminação com DNA genômico. Em seguida foi feita a quantificação por meio de

leitura em espectrofotômetro (Nanodrop®) nos comprimentos de onda (λ) de 260nm (RNA) e 280nm (proteína). O RNA foi considerado íntegro e de boa qualidade quando a razão das absorbâncias nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm foi maior que 1,8 e menor que 2,0 (SAMBROOK; GETTING, 1989). Os resultados foram obtidos em ng/ μ L.

A transcrição reversa do RNA total para cDNA foi realizada a partir de 190 ng de RNA total utilizando a enzima transcriptase reversa Super-script II™ Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carllsbad, CA, USA).

A quantificação do mRNA dos genes de interesse e dos genes controle (β -actina e RPS13), foi realizada por meio de seus respectivos cDNAs. As reações de PCR em tempo real (qRT-PCR) foram realizadas em duplicata, em placas específicas de 48 poços no equipamento *StepOne System*, usando o sistema para detecção de produtos de amplificação “TaqMan® Gene Expression Master Mix” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Foram selecionados primers e sondas marcadas com fluoróforo FAM para todos os genes de acordo com os ensaios disponibilizados pela Applied Biosystems, conforme **Tabela 1** (www.appliedbiosystems.com.br).

Tabela 1. Identificação dos genes para reação de q-RT PCR disponibilizados pela Applied Biosystems.

Identificação	Gene
Hs01113624_g1	TNF- α
Hs00153133_m1	COX-2
Hs00234140_m1	MCP-1
Hs00985639_m1	IL-6
Hs00164932_m1	ICAM-1
Hs00829989_gH	GPX1
Hs01060665_g1	β -ACTINA
Hs01011487_g1	RPS13

A reação de PCR foi realizada nas seguintes condições: iniciada a 50°C durante 2 minutos, seguida de 95°C durante 10 minutos e a amplificação foi

realizada por 45 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturação) e 1 minuto a 60°C (hibridização e extensão).

O sinal de fluorescência captado pelo *software StepOne v2.2* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) gerou o parâmetro ciclo, denominado *threshold* (Ct), momento em que a amplificação aconteceu de maneira exponencial. Para cada amostra de cDNA, o Ct de cada gene foi registrado e comparado com o gene da β -actina e RPS13, que foram utilizados como controle endógeno.

Os valores de Ct obtidos nos ensaios foram utilizados para determinar a expressão relativa de mRNA de cada gene alvo em relação ao controles endógenos, por meio da reação Delta Ct (ΔCt):

$$\Delta Ct = (Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{controle endógeno}})$$

Para verificar se houve variação da expressão dos genes em relação ao T0 de cada grupo, os dados foram normalizados de acordo com o parâmetro Delta Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$):

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Tempo 1}} - \Delta Ct_{\text{Tempo 0}}$$

Por fim, os resultados foram transformados em escala logarítmica ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

4.3 Avaliação estatística

Os resultados foram apresentados em média e desvio-padrão.

A avaliação estatística da atividade antioxidante *in vitro* da castanha-do-brasil foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) One Way com pós-teste de Turkey com objetivo de verificar a diferença entre as três frações de ácidos fenólicos testadas, com auxílio do *software* GraphPad Prism 3.0.

Os valores da ingestão de alguns nutrientes foram ajustados pelo valor energético da dieta, segundo o método residual proposto por Willet (1998). Para isto, os valores de ingestão dos nutrientes obtidos pelo registro alimentar foram testados quanto a sua distribuição normal por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, a correlação linear de Pearson foi utilizada para verificar se havia

correlação estatisticamente significativa entre os valores de ingestão de cada nutriente com a energia. Procedeu-se com testes de regressão linear simples, considerando a energia como variável independente e cada nutriente como variável dependente. A partir desta análise foram obtidos os valores β_0 e β_1 , os quais foram utilizados para determinar os valores dos nutrientes estimados, residuais, constantes, e por fim, ajustados, respectivamente. Ao final, a média dos valores de ingestão dos nutrientes foi igual tanto em suas formas ajustadas quanto em suas formas brutas, os valores dos desvios-padrão após o ajuste é que foram reduzidos.

Para comparar a média de cada parâmetro antes e depois da suplementação com as castanhas-do-brasil, foi realizado inicialmente o teste de Shapiro-Wilk para verificar se os resultados seguiam uma distribuição normal, para aqueles que não seguiam distribuição normal, foi aplicado o teste de Mann-Whitney. Na sequência, o teste *t-Student* para amostras dependentes ou o teste pareado não-paramétrico de Wilcoxon foi aplicado levando em consideração um *p*-valor menor que 0,05 para discriminação de médias estatisticamente diferentes.

Da mesma forma, para comparar a média de cada parâmetro entre o grupo controle (CDM) e o grupo suplementado (SDM) no T1 do estudo, após 60 dias de acompanhamento, foi aplicado inicialmente o teste de Shapiro-Wilk, o qual é utilizado para verificar se os resultados seguiam uma distribuição normal. Na sequência, o teste *t-Student* para amostras independentes ou o teste não-paramétrico de Wilcoxon foi aplicado, levando em consideração um *p*-valor menor que 0,05 para discriminação de médias estatisticamente diferentes.

Para verificar associações estatísticas entre as variáveis de resposta e caracterizar as pessoas classificadas de acordo com as concentrações de selênio nos eritrócitos, glutathione peroxidase no sangue total, malondialdeído (MDA) e TNF- α , a Análise Hierárquica de Agrupamentos (AHA) foi utilizada. Para isso, os resultados foram auto-escalados com o objetivo de igualar o peso estatístico de todas as variáveis e as similaridades entre as pessoas foram calculadas de acordo com a distância Euclidiana, enquanto que o método de Ward foi utilizado para a formação dos grupos. Para caracterizar as pessoas contidas nos grupos (*clusters*) sugeridos, a hipótese de nulidade da homocedasticidade foi testada usando o teste de Levene e a ANOVA unifatorial seguida pelo teste de Tukey foram utilizados para verificação de diferenças estatísticas significativas entre os grupos. Para as variáveis

heterocedásticas ($p_{\text{Levene}} < 0,05$) o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi aplicado. Neste estudo, valores- p abaixo de 0,05 foram considerados significativos. Para todas as análises estatísticas, o sistema Action v. 2.4, incorporado ao Excel 2010 (Microsoft Corporation, EUA), foi utilizado.

Os gráficos foram elaborados utilizando o *software* GraphPad Prism 3.0 e o Excel 2007 (Microsoft Office).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da castanha-do-brasil

As castanhas-do-brasil utilizadas neste estudo foram doadas pelo Instituto Excelsa, Manaus-AM, safra de 2009. Para caracterizar as castanhas-do-brasil utilizadas neste estudo de suplementação foram realizadas as análises de composição centesimal, concentração de selênio, perfil de ácidos graxos, conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante *in vitro*. Na tabela abaixo estão apresentados os dados de composição centesimal e concentração de selênio ($\mu\text{g/g}$).

A castanha-do-brasil, assim como outras sementes oleaginosas contém elevado teor de lipídios (69,39%) seguido de proteínas (15,97%) e carboidratos (10,91%), além da alta concentração de selênio (**Tabela 2**).

Tabela 2. Composição centesimal e concentração de selênio das castanhas-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) utilizadas na intervenção nutricional deste estudo.

Nutrientes e energia	Média
Energia (kcal/100g)	732,0
Umidade (%)	0,4
Proteína (g/100g)	15,9
Lipídios (g/100g)	69,4
Carboidrato (g/100g)	10,9
Cinzas (g/100g)	3,3
Selênio ($\mu\text{g/g}$)	115,5

A média da concentração de selênio foi 115,5 $\mu\text{g/g}$ de castanha *in natura*. Este resultado mostra que a castanha-do-brasil é uma excelente fonte de selênio, como os estudos de composição têm demonstrado. O teor de selênio encontrado foi duas vezes maior do que o apresentado no estudo de Cominetti *et al.* (2011). Vonderheide *et al.* (2002) também avaliaram concentrações de selênio em castanhas-do-brasil cultivadas na região norte do Brasil (Rondônia e Acre) e observaram valores médios de 35 $\mu\text{g/g}$, similar ao encontrado por Kannamkumarath

et al. (2002) e Rocha (2009). Outro estudo que avaliou a concentração de selênio nessas castanhas, foi o do Chunhieng *et al.* (2004), que verificaram concentrações de 126 µg/g de selênio em castanhas da região amazônica.

Essas diferenças nas concentrações de selênio podem ser explicadas pelas variações ambientais e climáticas, as quais estão relacionadas com a concentração desse elemento no solo (GERLA; SHARIF; KOROM, 2011) e consequentemente com o teor de selênio nas amêndoas. Estes fatores ambientais também estão relacionados com a diferença no teor de selênio em outros alimentos, como por exemplo, nos cultivares de feijões. Martens e Cozzolino (2002) ao avaliarem diferentes cultivares de feijões produzidos em solos brasileiros observaram que o teor de selênio variou em função da região. Análises das concentrações de selênio em variedades de feijões cultivados no estado de São Paulo confirmaram que o solo desta região é naturalmente pobre em selênio, enquanto que o inverso foi observado em variedades de feijões cultivados no estado do Ceará.

Além de ser fonte de selênio, a castanha-do-brasil contém alto teor de lipídios. Como pode ser observada na **Tabela 3**, a composição em ácidos graxos das castanhas-do-brasil é representada pelos ácidos graxos saturados (25,05%), monoinsaturados (33,75%) e poliinsaturados (41,20%). O presente estudo indica que os ácidos graxos majoritários presentes na castanha-do-brasil foram os ácidos palmítico (15,87%), oleico (33,37%) e linoleico (41,20%).

Ryan *et al.* (2006) relataram resultados semelhantes para os ácidos palmítico (13,50%), oléico (29,09%) e linoléico (42,80%). Venkatachalam e Sathe (2006) também encontraram valores similares para a quantidade de saturados (25,35%) com predomínio de palmítico (15,11%), monoinsaturados (29,04%), destacando-se o oléico (28,75%) e os poliinsaturados (45,61%), representado principalmente pelo linoléico (45,43%).

Tabela 3. Perfil de ácidos graxos das castanhas-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) utilizadas na intervenção nutricional deste estudo.

Fórmula	Ácido graxo	%
14 : 0	Mirístico	0,10 ± 0,01
16 : 0	Palmítico	15,87 ± 0,09
16 : 1	Hexadecenóico	0,39 ± 0,01
17 : 0	Margárico	—
18 : 0	Esteárico	9,07 ± 0,11
18 : 1 (n-9)	Oleico	33,37 ± 0,13
18 : 2 (n-6)	Linoleico	41,20 ± 0,01
20 : 0	Eicosanoico	—
20 : 1 (n-9)	Eicosenoico	—
22 : 0	Docosanoico	—
Totais	Saturados	25,05 ± 0,13
	Monoinsaturados	33,75 ± 0,13
	Poliinsaturados	41,20 ± 0,01
% gordura		*69,77 ± 0,93

Os dados representam média ± desvio-padrão. * A determinação de gordura foi calculada a partir do ácido tridecanoico utilizado como padrão interno.

Com exceção das castanhas portuguesas que contêm pouca gordura, as sementes oleaginosas são em geral alimentos com alto teor de lipídeos. O conteúdo total de lipídeos varia de 46% na castanha de caju e pistache a 76% na macadâmia. No entanto, a composição de ácidos graxos destas é benéfica porque o conteúdo de ácidos graxos saturados é baixo (4 a 16%) e quase metade do teor total de gordura é composta pelos ácidos graxos insaturados, sendo o ácido oléico predominante na maioria destas sementes oleaginosas, com proporções semelhantes de mono e poliinsaturados na castanha-do-brasil, predominância de poliinsaturados sobre os monoinsaturados no pinhão, e principalmente poliinsaturados nas nozes (MOODLEY; KINDNESS; JONNALAGADDA, 2007; BRUFAU; BOATELLA; RAFECAS, 2006; ROS; MATAIX, 2006).

A presença dos ácidos graxos insaturados faz com que as sementes oleaginosas apresentem papel importante na alimentação e saúde humana. Como os estudos epidemiológicos têm demonstrado, os lipídeos presentes nestas contribuem para os efeitos benéficos, como prevenção de doenças coronárias e diabetes; e em estudos de curto prazo, o consumo dessas sementes está relacionado com a redução do colesterol, a resistência da LDL à oxidação e melhora da função endotelial (FREITAS; NAVES, 2010; ROS; MATAIX, 2006).

Considerando esses efeitos, o FDA (*Food and Drug Administration*) em 2004 aceitou o *claim* para as sementes oleaginosas e produtos derivados, devido os resultados de estudos que relacionavam o consumo destas com o risco reduzido para as doenças cardíacas, utilizando a seguinte alegação: "Evidências científicas sugerem, mas não provam, que a ingestão de 1,5 onças (42,5 g) por dia da maioria das sementes oleaginosas como parte de uma dieta com baixo teor de gordura saturada e colesterol pode reduzir o risco de doenças do coração" (BRUFAU; BOATELLA; RAFECAS, 2006).

Quanto à composição de compostos fenólicos das castanhas-do-brasil utilizadas neste estudo, os resultados apresentados na **Figura 12** mostram que esta apresenta quantidade expressiva de compostos fenólicos, um dado importante para avaliação da sua capacidade antioxidante. Entre as frações, a AFL apresentou maior quantidade de compostos fenólicos expressa em mg/g de amostra desengordurada (6,95), seguida da AFS (4,11) e AFI (1,76). Diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) foram observadas quanto ao teor de compostos fenólicos presentes nas frações.

A partir de 1g de amostra desengordurada foi obtido 12,82 mg de fenólicos por grama de amostra desengordurada, considerando os que estavam na forma livre (AFL) e aqueles esterificados e liberados após procedimento de hidrólise (AFS e AFI). A partir do percentual de lipídio da amostra (69%) foi feita a correção para mg de fenólicos totais por 100 g de castanha, correspondendo a 398 mg/100g de castanha ou 3,98 mg/g de castanha.

Figura 12. Quantidade de fenólicos totais das frações de ácidos fenólicos obtidas da castanha-do-brasil expressa por mg de equivalente de ácido gálico/g de amostra desengordurada. As letras diferem entre si, $p < 0,05$. Legenda: FT: fenólicos totais; AFL: ácidos fenólicos livres; AFS: ácidos fenólicos solúveis; AFI: ácidos fenólicos insolúveis. Os dados representam média e desvio-padrão.

É crescente o número de trabalhos que investigam a quantidade de compostos fenólicos em sementes oleaginosas, como: pecans, nozes, castanha portuguesa, castanha de caju, macadâmia, castanha-do-brasil, entre outras, com foco na capacidade antioxidante das mesmas por apresentarem concentrações relevantes de vitamina E, selênio e compostos fenólicos. Os carotenóides são encontrados em baixas concentrações, e não contribuem significativamente com a atividade antioxidante *in vitro*. A capacidade antioxidante *in vitro* parece ser em grande parte dependente dos compostos fenólicos presentes nas sementes oleaginosas. As nozes (frutas da noqueira) e pecans destacam-se entre as demais por conterem maior teor de compostos fenólicos, ganhando destaque o ácido elágico (ABE, LAJOLO e GENOVESE, 2010; CHEN e BLUMBERG, 2008).

Foram observadas diferenças no conteúdo destes compostos nas sementes oleaginosas, uma vez que esta determinação é dependente dos subprodutos, do tipo de extração utilizada e das condições de cultivo (SHAHIDI; ALASALVAR; LIYANA-PATHIRANA, 2007). Chen e Blumberg (2008) avaliaram o teor de fenólicos em castanhas-do-brasil e observaram que castanhas-do-brasil obtidas no comércio dos Estados Unidos apresentavam quantidades de fenólicos superiores (3,1 mg/g) quando comparadas às obtidas na Áustria (1,1 mg/g). Estes dados reforçam a

diferença que existe na composição de fenólicos assim como em outros nutrientes, inclusive o selênio, e que é dependente de fatores extrínsecos, como safra, condições de cultivo, solo, entre outros.

Kornsteiner, Wagner e Elmadfa (2006) avaliaram o conteúdo de compostos fenólicos em 10 diferentes sementes oleaginosas, incluindo a castanha-do-brasil. O teor médio de fenólicos variou entre 32 mg de equivalentes de ácido gálico/100 g para a noz do pinheiro a 1625 mg para as nozes, sendo encontrado o valor de 112 mg/100 g para a castanha-do-brasil. Resultados similares foram encontrados por Wu *et al.* (2004) quando avaliaram o teor de fenólicos nos mesmos tipos de nozes. Os resultados encontrados variaram de 0,68 mg/g para a noz do pinheiro a 20,16 mg/g para as pecans. Para a castanha-do-brasil foi encontrado o valor de 3,10 mg/g. Este valor é similar ao encontrado neste estudo, que correspondeu a 3,98 mg/g.

Como mostra a **Figura 12**, os fenólicos presentes nas castanhas-do-brasil encontraram-se principalmente na forma livre (AFL = 695 mg/100g) quando comparado às formas esterificadas (AFS = 411 mg/100g e AFI = 176 mg/100g). Estes resultados estão em concordância com os resultados obtidos por John e Shahidi (2010) que encontraram a maioria dos fenólicos da castanha-do-brasil na forma livre (406,8 mg/100g) quando avaliaram um extrato acetônico. Diferentemente destes resultados, Yang, Liu e Halim (2009) verificaram em amostras de castanha-do-brasil que a maioria dos fenólicos encontrava-se na forma ligada (123,1 mg/100g) e em menor quantidade na forma livre (46,2 mg/100g).

A presença desses compostos contribui de forma relevante para a capacidade antioxidante das nozes. A atividade antioxidante *in vitro* dos compostos fenólicos pode ser avaliada por meio de diferentes métodos, entre eles o método de varredura do radical DPPH. O radical DPPH tem sido amplamente usado para avaliar a atividade antioxidante por ser mais estável do que os radicais hidroxila e superóxido, tornando sua utilização vantajosa (SIRIWARDHANA e SHAHIDI, 2002).

Os resultados dessa determinação obtidos para as frações encontram-se na **Figura 13**. Na atividade antiradical, o comportamento concentração-resposta foi observado nas três frações (AFL: 31,93 a 93,45%; AFS: 17,50 a 48,82%; AFI: 42,68 a 91,40%). No entanto, a AFS apresentou menor capacidade antioxidante por este método. A **Figura 13** mostra claramente a diferença na capacidade de varredura entre as frações.

Figura 13. Atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos em sistema de varredura do radical DPPH• das amostras de castanha-do-brasil. Legenda: DPPH: 1,1-difenil-2-picril hidrazil; FT: fenólicos totais; AFL: ácidos fenólicos livres; AFS: ácidos fenólicos solúveis; AFI: ácidos fenólicos insolúveis.

Os compostos fenólicos presentes nas frações de ácidos fenólicos podem ter agido como sequestradores de radicais livres em virtude de sua capacidade de doar hidrogênio (SHAHIDI; ALASALVAR; LIYANA-PATHIRANA, 2007). Esta propriedade pode estar relacionada com a presença dos ácidos gálico, elágico, protocatequico e vanílico, e catequina. Estes compostos fenólicos foram recentemente identificados e quantificados em amostras de castanha-do-brasil por John e Shahidi (2010).

Ao contrário do que foi observado neste estudo, o estudo realizado por Abe, Lajolo e Genovese (2010) com o extrato metanol/água da castanha-do-brasil, não apresentou atividade anti-radical expressiva, pelo método DPPH.

A capacidade redutora das frações depende da presença de compostos fenólicos com capacidade de quebrar a cadeia de radicais livres e doar um átomo de hidrogênio. De acordo com o método empregado, quanto maior a absorbância maior a capacidade redutora. Os resultados da capacidade redutora das frações encontram-se na **Figura 14**. O comportamento das frações foi similar ao ensaio anterior, no qual a AFL apresentou maior atividade, seguida da AFI, enquanto que a AFS apresentou menor atividade quando comparada as demais.

Figura 14. Capacidade redutora das frações de ácidos fenólicos em sistema com ferrocianeto de potássio das amostras de castanha-do-brasil. Legenda: FT: fenólicos totais; AFL: fração de fenólicos livres; AFS: fração de fenólicos solúveis; AFI: fração de fenólicos insolúveis.

Os compostos fenólicos presentes nas frações mostraram capacidade redutora expressiva, principalmente devido ao seu efeito como doadores de elétrons e, assim, suprimindo as reações em cadeia pelos radicais, convertendo estes radicais a produtos mais estáveis (ALASALVAR *et al.*, 2006).

A capacidade redutora dos compostos fenólicos da castanha-do-brasil foi demonstrada por John e Shahidi (2010). Eles avaliaram esta propriedade em frações de fenólicos livres e ligados, e verificaram associação entre a quantidade de compostos fenólicos e capacidade redutora.

A capacidade das frações em inibir a oxidação no sistema β -caroteno/ácido linoléico encontra-se na **Figura 15**. A atividade antioxidante neste modelo foi similar nas três frações de ácidos fenólicos e foi observado efeito concentração-resposta. Para as três frações foram observadas atividade antioxidante expressiva em baixas concentrações, atingindo valor acima de 75% de inibição da oxidação na concentração de 6,25µg.

Figura 15. Atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos em sistema β -caroteno/ácido linoléico das amostras de castanha-do-brasil. Legenda: AFL: ácidos fenólicos livres; AFS: ácidos fenólicos solúveis; AFI: ácidos fenólicos insolúveis. As letras diferem entre si representando diferença estatística entre as concentrações ($p < 0,05$) de acordo com a ANOVA (Pós-teste de Tukey).

Diferentemente do que foi observado neste estudo, no qual as frações de ácidos fenólicos da castanha-do-brasil apresentaram atividade antioxidante expressiva, Alasalvar *et al.* (2006) avaliaram a capacidade dos extratos acetônico e etanólico da avelã em inibir a oxidação do β -caroteno/ácido linoléico e observaram reduzida atividade antioxidante, embora tenham sido identificados os ácidos gálico, p-cumárico e sinápico nas amostras. O extrato acetônico da amêndoa nesse modelo apresentou o mesmo desempenho observado nos extratos de avelã (AMAROWICZ; TROSZYNSKA; SHAHIDI, 2005).

No entanto, os extratos dos subprodutos de avelã, como os extratos da película, casca e folhas, apresentaram forte atividade antioxidante quando comparada a semente. Isto se deve a maior concentração de compostos fenólicos nesses subprodutos, que está intimamente relacionada com a capacidade antioxidante (SHAHIDI; ALASALVAR; LIYANA-PATHIRANA, 2007).

A proteção contra a oxidação pelas frações de ácidos fenólicos da castanha-do-brasil também foi avaliada pelo método de peroxidação espontânea em cérebro de rato, mensurada por meio da determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), produto final de peroxidação lipídica.

O homogenato de cérebro de rato exposto ao oxigênio apresenta peroxidação lipídica por mecanismo que é independente da produção de ânion superóxido e do radical hidroxila, cuja etapa de iniciação pode envolver a decomposição dos hidroperóxidos resultando na formação dos radicais alcoxil e peroxil que podem iniciar uma reação em cadeia, propagando a peroxidação lipídica. A **Figura 16** mostra a proteção das frações neste modelo. As frações AFL e AFI apresentaram elevada atividade antioxidante, que foi independente das concentrações testadas obtendo o percentual de inibição que variou de 71,60 a 88,61% e de 73,24 a 80,61%, respectivamente. Já os resultados obtidos para a AFS foram de 28,40% de inibição na menor concentração e de 81,18% na concentração de 30 µg.

Figura 16. Inibição da peroxidação espontânea em cérebro de rato pelas frações de ácidos fenólicos presentes nas amostras de castanha-do-brasil. Legenda: AFL: ácidos fenólicos livres; AFS: ácidos fenólicos solúveis; AFI: ácidos fenólicos insolúveis. As letras diferem entre si representando diferença estatística entre as concentrações ($p < 0,05$) de acordo com ANOVA (Pós-teste de Tukey).

Redução na concentração de TBARS que indica aumento no percentual de inibição da oxidação foi observada nos extratos aquosos de subprodutos da castanha portuguesa, demonstrando capacidade de inibir a peroxidação lipídica (BARREIRA *et al.*, 2008).

Assim como nas frações de ácidos fenólicos da castanha-do-brasil, os resultados obtidos por Kamath e Rajini (2007) demonstraram que o extrato etanólico

da pele da castanha de caju inibiu a formação de TBARS em homogenato de cérebro de rato induzida por cloreto férrico.

5.2 Estudo da suplementação com castanha-do-brasil em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1

5.2.1 Participantes

Os pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 foram selecionados no período de agosto de 2010 a janeiro de 2012. Durante a fase de seleção, 98 pacientes foram convidados para participar da pesquisa. Após a avaliação dos critérios de inclusão 78 pacientes aceitaram participar do estudo, destes 70 pacientes concluíram o protocolo experimental. Durante o período de avaliação, oito pacientes desistiram de participar da pesquisa (cinco do grupo suplementado e três do grupo controle). Como pode ser observado na **Tabela 4**, não foram observadas diferenças significativas nas características clínicas entre os grupos na fase inicial do estudo.

Tabela 4. Características dos pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 no início do estudo. São Paulo, 2012.

Características	CDM ⁽ⁿ⁼³⁵⁾	SDM ⁽ⁿ⁼³⁵⁾	<i>p</i> -valor ¹
Gênero (feminino/masculino)	60/40	66/34	0,191
Tempo de diagnóstico (anos)	6,08 ± 3,76	6,96 ± 4,20	0,185
Idade (anos)	15,17 ± 3,82	15,40 ± 3,65	0,339
Peso (kg)	52,60 ± 12,91	53,63 ± 13,34	0,373
Estatura (cm)	157,38 ± 10,35	157,85 ± 11,82	0,430
Circunferência da cintura (cm)	71,89 ± 10,14	71,89 ± 8,93	0,499
Hemoglobina glicada (%)	9,90 ± 3,06	10,05 ± 3,38	0,424
Glicose sérica (mg/dL)	165,71 ± 97,13	199,67 ± 112,34	0,090

Dados apresentados em número de pacientes (% da amostra) e em média ± desvio-padrão.

¹*p*-valor: nível de significância para a interação entre os grupos.

Legenda: IMC: índice de massa corporal

Grupo CDM: Controle diabetes *mellitus* - não recebeu suplementação;

Grupo SDM: Suplementado diabetes *mellitus* - recebeu suplementação com 2,5 g de castanha-do-brasil *in natura*.

Entre os aspectos sociais, os pacientes avaliados tinham bom nível de escolaridade e 13%, 57% e 30% tinham renda familiar < 2, entre 2 e 4 e > 4 salários mínimos, respectivamente. Quanto à prática de atividade física, 73% referiu realizar algum tipo de prática desportiva de forma regular.

5.2.2 Avaliação antropométrica

Os resultados da avaliação nutricional dos pacientes com diabetes obtidos por meio de parâmetros antropométricos como: peso, estatura, IMC, circunferência da cintura e % gordura corporal, nos tempos avaliados encontram-se na **Tabela 5**.

Tabela 5. Dados antropométricos dos pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1, segundo o tempo de avaliação. São Paulo, 2012.

Variável	CDM ⁿ⁼³⁵		SDM ⁿ⁼³⁵	
	T0	T1	T0	T1
Peso (kg)	52,60 ± 12,91	53,68 ± 12,54	53,63 ± 13,34	53,33 ± 12,98
Estatura (m)	157,38 ± 10,35	158,60 ± 9,91	157,85 ± 11,82	158,39 ± 11,49
IMC (kg/m ²)	21,00 ± 3,81	21,17 ± 3,95	21,30 ± 3,82	21,04 ± 3,73
CC (cm)	71,89 ± 10,14	71,99 ± 8,64	71,89 ± 8,93	72,33 ± 8,13
%GC	27,87 ± 6,27	29,20 ± 7,97	29,36 ± 8,02	28,81 ± 8,63
Peso de MM	37,07 ± 9,63	38,41 ± 8,93	37,24 ± 9,44	38,24 ± 9,30

Dados apresentados em média ± desvio-padrão. Legenda: IMC: Índice de Massa Corporal; CC: Circunferência da Cintura; GC: Gordura Corporal; MM: Massa magra; Grupo CDM: Controle diabetes *mellitus* - não recebeu suplementação; Grupo SDM: Suplementado diabetes *mellitus* - recebeu suplementação com 2,5 g de castanha-do-brasil *in natura*.

Existem muitos pontos de corte para classificar o estado nutricional de crianças e adolescentes por meio do IMC. Sendo que os mais utilizados são oriundos de estudos que avaliaram a população americana. Na figura abaixo, esta apresentada a distribuição percentual dos pacientes avaliados em relação aos pontos de corte para IMC, segundo a *World Health Organization* (2007).

Legenda:

Grupo CDM: Controle diabetes *mellitus* - não recebeu suplementação;

Grupo SDM: Suplementado diabetes *mellitus* - recebeu suplementação com 2,5 g de castanha-do-brasil *in natura*.

Figura 17. Distribuição percentual dos pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1, segundo a classificação do estado nutricional pelo IMC, proposto pela *World Health Organization* (2007), e o grupo. São Paulo, 2012.

Ao avaliar todos os pacientes no T0 do estudo, verificou que 17 % destes encontravam-se com sobrepeso ou obesidade conforme a classificação pelo IMC. Moraes *et al.* (2003) verificaram prevalência de 21,2% de sobrepeso e obesidade em pacientes com diabetes tipo 1. Apesar de ser característica clínica no início da doença o baixo peso e/ou peso normal, a prevalência de sobrepeso ou obesidade nesses pacientes vêm apresentando mudanças significativas nos últimos anos. Isto parece refletir a tendência mundial de aumento de peso e suas consequências clínicas, reforçando a necessidade do controle de peso nesses pacientes, uma vez que os mesmos possuem risco aumentado de desenvolver aterosclerose em relação à população não diabética (ARCANJO *et al.*, 2005).

Apesar da maioria dos pacientes com diabetes apresentarem IMC adequado para idade, a média do percentual de gordura corporal foi elevada quando se adotou valores de até 20% e 25% de gordura corporal para meninos e meninas, respectivamente (SIGULEM; VEIGA; PRIORE, 1995). Ao avaliar esta variável segundo o gênero e grupo, observou-se que 86% dos pacientes com diabetes do grupo CDM e 89% do grupo SDM encontravam-se acima dos valores de percentual de gordura adotados. No entanto, a medida da circunferência da cintura estava abaixo dos pontos de corte considerados ideais para reduzir o risco de doenças cardiometabólicas para crianças e adolescentes (TAYLOR *et al.*, 2000).

5.2.3 Avaliação do consumo alimentar

Os dados do consumo alimentar dos pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 obtidos por meio dos registros alimentares de três dias, dos grupos avaliados, estão apresentados nas **Tabelas 6 e 7**. O *Institute of Medicine* (ESTADOS UNIDOS, 2005) recomenda que os carboidratos, proteínas e lipídios contribuam de 45 a 65%, 10 a 35% e 20 a 35%, respectivamente, sobre o valor energético total (VET).

A adesão dos participantes em registrar os alimentos consumidos, conforme orientado, não foi de 100%.

A **Tabela 6** mostra os resultados referentes à ingestão de macronutrientes, energia e ácidos graxos em relação ao tempo de avaliação e ao grupo, calculados com o *software* NutWin. Os valores de ingestão de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados foram ajustados pelo valor energético total.

Tabela 6. Valores de ingestão de energia, macronutrientes, ácidos graxos saturados, mono e poliinsaturados dos pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1, segundo o grupo e o tempo de avaliação. São Paulo, 2012.

Variável	CDM		SDM	
	T0 n=32	T1 n=31	T0 n=32	T1 n=30
Energia (kcal/dia)	1525,2 ± 442,5	1397,8 ± 381,2	1407,8 ± 428,4	1512,4 ± 369,9
CHO (%)	53,29 ± 2,27	51,63 ± 2,86	52,84 ± 1,54	52,45 ± 1,02
CHO (g)	199,42 ± 27,61	182,21 ± 22,40	182,17 ± 22,51	199,67 ± 27,00
PROT (%)	19,95 ± 0,16	17,57 ± 2,44	19,13 ± 1,52	15,46 ± 1,09
PROT (g)	76,56 ± 16,41	71,22 ± 6,05	73,37 ± 15,52	74,40 ± 15,45
LIP (%)	22,20 ± 2,43	23,80 ± 3,81	18,27 ± 1,26	20,40 ± 0,32
LIP (g)	46,18 ± 18,91	52,11 ± 7,23	41,30 ± 9,77	48,83 ± 9,11
AGS (g/dia)*	13,88 ± 4,64	11,47 ± 5,93	12,85 ± 4,73	15,92 ± 4,40
AGM (g/dia)*	13,50 ± 5,08	11,79 ± 5,75	12,39 ± 4,07	14,95 ± 3,53
AGP (g/dia)*	6,22 ± 3,45	5,86 ± 4,84	5,98 ± 4,74	7,25 ± 3,72

Dados apresentados em média ± desvio-padrão. Legenda: CHO: carboidrato; PROT: proteína; LIP: lipídios; AGS: ácidos graxos saturados; AGM: ácidos graxos monoinsaturados; AGP: ácidos graxos poliinsaturados.

Grupo CDM: Controle diabetes *mellitus* - não recebeu suplementação;

Grupo SDM: Suplementado diabetes *mellitus* - recebeu suplementação com 2,5 g de castanha-do-brasil *in natura*.

* Valores ajustados pela energia;

Na **Tabela 7** estão apresentados os valores de ingestão de selênio, zinco, cobre, manganês, vitamina C e vitamina E em relação aos tempos de avaliação e aos grupos estudados. Os micronutrientes que apresentaram correlação com a ingestão de energia foram: selênio e vitamina E em todos os tempos de avaliação e nos dois grupos; zinco e manganês não tiveram correlação com a energia no T1 do grupo CDM; vitamina C não teve seus valores de ingestão correlacionados com a energia no T0 do grupo CDM; e os valores de ingestão de cobre não apresentaram correlação com a energia em nenhum dos tempos e grupos avaliados, portanto não foram ajustados.

Tabela 7. Valores de ingestão de selênio, zinco, cobre, manganês e vitaminas C e E dos pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1, segundo o grupo e o tempo de avaliação. São Paulo, 2012.

Variável	CDM		SDM	
	T0 n=32	T1 n=31	T0 n=32	T1 n=30
Selênio (μg/dia) ¹	29,79 ± 7,27*	24,14 ± 8,28*	27,65 ± 7,89*	28,04 ± 10,34*
Selênio (μg/dia) ²	-	-	-	319,93 ± 20,20*
Zinco (mg/dia)	7,53 ± 2,87*	6,03 ± 3,35	7,50 ± 2,39*	7,84 ± 1,61*
Cobre (mg/dia)	1,64 ± 4,29	0,84 ± 1,05	1,19 ± 1,39	0,86 ± 0,58
Manganês (mg/dia)	1,59 ± 0,79*	1,30 ± 0,97	1,59 ± 0,68*	1,71 ± 0,50*
Vitamina C (mg/dia)	82,86 ± 133,73	71,80 ± 72,67*	61,08 ± 52,65*	131,97 ± 124,99 [†]
Vitamina E (mg/dia)	3,97 ± 2,05*	3,13 ± 1,76*	3,60 ± 2,16*	4,00 ± 2,90*

Dados apresentados em média ± desvio-padrão. Legenda: Grupo CDM: Controle diabetes *mellitus* - não recebeu suplementação; Grupo SDM: Suplementado diabetes *mellitus* - recebeu suplementação com 2,5 g de castanha-do-brasil *in natura*. ¹ Consumo alimentar habitual; ² Consumo alimentar habitual com o acréscimo da concentração de selênio da castanha-do-brasil (288,83 μg/2,5 g);

* Valores ajustados pela energia; [†] Diferenças estatísticas significativas (p<0,05) entre os tempos (T0 e T1) e entre os grupos após o período de intervenção (T1).

Como pode ser observado na **Tabela 7**, não houve diferença em relação a ingestão alimentar habitual de selênio. No entanto, a intervenção com a castanha-do-brasil (alimento rico em selênio) proporcionou aumento na ingestão desse mineral.

O papel do selênio ligado as selenoproteínas em humanos, tanto na saúde quanto nas doenças, tem sido amplamente estudado, principalmente como biomarcadores relevantes do *status* de selênio, sendo este *status* influenciado principalmente pela ingestão dietética de selênio. A distribuição desse mineral nos alimentos é dependente da sua concentração nos solos onde os alimentos são cultivados e animais são criados. O selênio é encontrado em alimentos de origem animal, e em menores concentrações nos de origem vegetal, com exceção da castanha-do-brasil. A composição da dieta e as diferenças de selênio nos alimentos em virtude da sua concentração no solo justificam as diferenças na ingestão de selênio entre as pessoas (RESZKA *et al.*, 2012; GROMADZINSKA *et al.*, 2008).

Em países europeus, a ingestão de selênio é menor do que na população americana, essa diferença se deve principalmente pelas diferenças na concentração de selênio no solo destes países. A média de ingestão da população europeia varia de 27 a 70 μg de selênio por dia, a qual é considerada insuficiente pela EFSA (*European Food Safety Authority*) para cobrir as necessidades deste nutriente (EFSA, 2008).

A ingestão adequada dos demais nutrientes avaliados é essencial, pois além de participarem do metabolismo dos macronutrientes, possuem ações no organismo como antioxidantes. No contexto deste estudo, a quantidade ingerida dessas vitaminas e minerais poderia exercer influência sobre o *status* antioxidante dos pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1. Após o período de intervenção apenas a ingestão de vitamina C do grupo SDM foi diferente estatisticamente em relação ao T0.

5.2.4 Avaliação do *status* de selênio

Para avaliação do estado nutricional relativo ao selênio são utilizados os marcadores sanguíneos, os quais refletem a curto, médio e longo prazo o *status* corporal referente a esse mineral. Neste estudo, foram avaliados os parâmetros plasmático, eritrocitário e urinário relativos a concentração de selênio nas fases descritas no protocolo experimental (CDM e SDM; T0 e T1), bem como o consumo alimentar para verificar o *status* de selênio dos pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1. Os resultados dessa avaliação se encontram na **Tabela 8**.

Tabela 8. Parâmetros bioquímicos para avaliação do *status* de selênio, segundo o grupo e o tempo de avaliação, de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1. São Paulo, 2012.

Parâmetros	CDM ⁿ⁼³⁵		SDM ⁿ⁼³⁵		p-valor**
	T0	T1	T0	T1	
Se plasmático (µg/L)	53,82±13,95	56,47±14,34	57,88 ±13,36	122,37±33,67*	<0,001
Se eritrocitário (µg/L)	60,02±13,54	68,25±12,46	62,06±14,08	148,01±49,08*	<0,001
Se urinário (µg/L)	6,27±2,72 [∞]	8,07±8,19 [∞]	6,64±3,07 [∞]	30,37±28,92 ^{∞*}	0,001

Dados apresentados em média ± desvio-padrão; Legenda: Se: selênio; [∞] n=28; Grupo CDM: Controle diabetes *mellitus* - não recebeu suplementação; Grupo SDM: Suplementado diabetes *mellitus* - recebeu suplementação com 2,5 g de castanha-do-brasil *in natura*.

*p-valor <0,05: diferenças significativas em relação ao T0 do respectivo grupo; **p-valor <0,05: diferenças significativas entre os grupos CDM e SDM após o período de intervenção (T1).

Valores de referência: Se plasmático: 60 a 120µg/L; Se eritrocitário: 90 a 190µg/L (VANDAEL E DEELSTRA, 1993); Se urinário: dados não disponíveis.

Conforme pode ser observado, houve aumento na concentração de selênio no plasma, nos eritrocitos e na urina após o consumo da castanha-do-brasil por

sessenta dias (SDM T1) quando comparado ao T0 (SDM). Quando se avaliou o efeito do período de intervenção entre grupos, o SDM T1 foi diferente do CDM T1.

A **Figura 18** mostra a distribuição dos pacientes quanto ao *status* de selênio, conforme os valores de referência adotados.

Legenda: Grupo CDM: Controle diabetes *mellitus* - não recebeu suplementação; Grupo SDM: Suplementado diabetes *mellitus* - recebeu suplementação com 2,5 g de castanha-do-brasil *in natura*. Valores de referência: Se plasmático: 60 a 120µg/L; Se eritrocitário: 90 a 190µg/L (VANDAEL E DEELSTRA, 1993).

Figura 18. Distribuição percentual de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1, segundo os valores de referência adotados para as concentrações de selênio no plasma (A) e nos eritrócitos (B). São Paulo, 2012.

Estudos que avaliassem a suplementação com castanha-do-brasil, como fonte de selênio, em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 ou 2 não foram encontrados na literatura. No entanto, estudos conduzidos com obesos mórbidos (COMINETTI *et al.*, 2012) e pacientes renais crônicos (STOCKLER-PINTO *et al.*, 2010), ambos recebendo suplementação com castanha-do-brasil (290µg/Se/dia), mostraram que esta suplementação foi efetiva em melhorar os marcadores do *status* de selênio, como as concentrações plasmáticas e eritrocitárias deste mineral, além de ter aumentado a atividade da GPx nos eritrócitos. Visto que esta enzima é dependente do *status* corporal de selênio, variações no consumo alimentar podem influenciar a sua atividade. Os resultados deste estudo com pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 corroboram com os estudos apresentados acima, mostrando que o selênio presente na castanha-do-brasil possui alta biodisponibilidade, conforme observado pelo aumento das concentrações de selênio nos diferentes compartimentos corpóreos.

Poucos estudos populacionais avaliaram a associação entre *status* de selênio e diabetes, principalmente do tipo 1. Rajpathak *et al.* (2005) a partir da análise dos resultados do *Health Professionals Study*, mostraram associação inversa entre as concentrações de selênio nas unhas e a prevalência de diabetes. Estudos dessa natureza não foram realizados na população brasileira.

Alguns estudos que avaliaram o *status* de selênio em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1, mostraram que a concentração de selênio no plasma/soro foi maior quando comparada com a de grupos controle saudáveis (BLEYS, NAVAS-ACIEN, GUALLAR, 2007; GEBRE-MEDHIN *et al.*, 1984). No entanto, Ruíz *et al.* (1998) ao avaliarem o *status* de selênio de pacientes com diabetes tipo 1, verificaram concentrações plasmáticas reduzidas de selênio nestes pacientes quando comparados ao grupo controle. Esta redução foi mais acentuada nos pacientes que não tinham controle glicêmico rígido.

Kornhauser *et al.* (2008) avaliaram a concentração de selênio no soro de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 e verificaram que os níveis de selênio nestes pacientes encontravam-se reduzidos quando comparados ao grupo controle.

Similarmente, os resultados deste estudo mostraram que os pacientes com diabetes tipo 1 encontravam-se deficientes em selênio na fase inicial do estudo (T0),

conforme os valores de referência adotados neste estudo e propostos por Vandael e Deelstra (1993) (**Figura 18**).

Um dos fatores que pode alterar o *status* de selênio em pacientes com diabetes é o tempo de doença (diagnóstico). Conforme demonstrado por Whiting *et al.* (2008), pacientes com a doença entre 4 e 6 anos tiveram concentrações de selênio no plasma reduzidas (38,7 µg/L) quando comparados com o grupo de pacientes com duração de doença menor do que 2 anos (132 µg/L).

Poucos estudos de suplementação com selênio foram encontrados na literatura, mesmo utilizando suplementos na forma inorgânica. Faure *et al.* (2004) suplementaram pacientes com diabetes tipo 2 com 960 µg de selênio por dia (Granions de *Selenium*®) durante três meses, e como esperado pelos autores, observaram aumento significativo nas concentrações de selênio no plasma e na atividade da GPx nos eritrócitos. Ressalta-se que essa concentração administrada é superior ao limite máximo tolerável de ingestão para esse nutriente (400 µg/dia).

Estudos com animais diabéticos, induzidos tanto por estreptozotocina quanto por aloxana, que avaliaram o efeito da suplementação com selênio sob diferentes formas químicas, mostraram aumento significativo das concentrações plasmáticas desse mineral (ERBAYRAKTAR *et al.*, 2007; SHENG, HUANG; XU, 2004).

Erbayraktar *et al.* (2007) verificaram que ratos suplementados com selenato e seleniometionina durante 12 semanas tiveram suas concentrações de selênio no plasma aumentadas quando comparados aos grupos controle-saudável e controle-diabético, sendo que no grupo que recebeu selenometionina foi observado maior aumento das concentrações de selênio no final do estudo.

Os resultados deste estudo corroboram aqueles que mostraram aumento nas concentrações de selênio no plasma após a suplementação. Não foram encontrados estudos que avaliaram a concentração de selênio nos eritrócitos e urina de pacientes com diabetes tipo 1 e 2. Salienta-se que estes marcadores auxiliam na interpretação do *status* de selênio da população estudada, uma vez que a avaliação do mineral nos eritrócitos representa o *status* a médio prazo e na urina a curto prazo. Conforme observado na Tabela 8, nas concentrações urinárias de selênio houve diferença estatística significativa após a suplementação com a castanha, porém essas concentrações apresentaram variações individuais, como pode ser observado pelos valores de desvio-padrão.

A importância do *status* de selênio em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 se deve a sua participação no complexo sistema de defesa antioxidante contra o estresse oxidativo, por meio da enzima GPx (selenodependente) e outras selenoproteínas. Neste contexto, esta propriedade antioxidante é relevante para reduzir o risco de desenvolvimento das complicações diabéticas (BURK, 2002; RAYMAN, 2000).

5.2.5 Efeitos da suplementação com castanha-do-brasil sobre os marcadores glicêmicos

A suplementação com castanha-do-brasil não foi capaz de alterar o percentual de HbA_{1c} (**Figura 19**). Este marcador é utilizado para verificar as variações de glicose das últimas 4 a 8 semanas, sendo um importante índice de avaliação do controle glicêmico a longo prazo. Sendo essa castanha rica em selênio, ácidos graxos insaturados e em compostos fenólicos, foi hipotetizado que a quantidade e o tempo de suplementação fosse capaz de reduzir o percentual de glicação da hemoglobina.

Dados apresentados em média $\pm$ desvio-padrão. Legenda: Grupo CDM: Controle diabetes *mellitus* - não recebeu suplementação; Grupo SDM: Suplementado diabetes *mellitus* - recebeu suplementação com 2,5 g de castanha-do-brasil *in natura*. * p-valor <0,05: diferenças significativas em relação ao T0 do respectivo grupo.

Valores de referência: percentual de HbA_{1c}: <6,5% (American Diabetes Association, 2009); glicemia de jejum (≤ 99 mg/dL) (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003).

Figura 19. Percentual de hemoglobina glicada (HbA_{1c}) e concentração glicose sérica (mg/dL), segundo o grupo e tempo de avaliação, de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1. São Paulo, 2012.

A glicose sérica não foi alterada após a suplementação com castanha-do-brasil. No entanto, os pacientes que compuseram o grupo controle, tiveram elevação tanto do percentual de HbA_{1c} quanto das concentrações de glicose circulante após o período de acompanhamento.

Foram realizadas correlações entre o % HbA_{1c} e os marcadores do *status* de selênio no tempo T1 do estudo, tanto para o grupo controle quanto para o grupo suplementado. Observou-se correlação inversamente proporcional somente entre o % HbA_{1c} e a concentração de selênio nos eritrócitos no grupo que recebeu a suplementação com castanha-do-brasil ($r=-0,404$; $p=0,02$), conforme mostrado na **Figura 20**. No grupo controle não houve correlação estatisticamente significativa entre esses parâmetros. Sendo assim, apesar do % HbA_{1c} não ter reduzido após a suplementação, existe relação desse parâmetro glicêmico com a concentração de selênio nos eritrócitos destes pacientes.

Figura 20. Correlação entre o percentual de hemoglobina glicada e a concentração de selênio nos eritrócitos após a suplementação com castanha-do-brasil em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1. São Paulo, 2012.

Muitos estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo* avaliaram o efeito anti-diabético do selênio, como redução da HbA_{1c} e da glicose. No entanto, este efeito só foi observado com a administração de altas concentrações de selênio, sendo estas

consideradas tóxicas para humanos, conforme enfatizado pelos autores desses estudos (STEINBRENNER *et al.*, 2011; MUELLER *et al.*, 2009; HEI *et al.*, 1998; EZAKI, 1990).

No estudo SU.VI.MAX (*Supplementation with Antioxidant Vitamins and Minerals*) realizado com a população francesa (n=3146), a suplementação com 100µg de selênio associado com outros antioxidantes (vitamina C – 120 mg; vitamina E – 30 mg; β-caroteno – 6 mg; e zinco – 20 mg) não foi capaz de alterar a concentração de glicose plasmática após os 7,5 anos de intervenção (CZERNICHO *et al.*, 2006).

Erbayraktar *et al.* (2007) avaliaram o efeito da suplementação com selenato e selenometiona sobre a concentração de glicose no sangue total de ratos com diabetes induzidos por estreptozotocina, e verificaram aumento da glicose nos grupos diabético-controle e diabético-suplementado com selenato, enquanto que o grupo diabético-selenometionina apresentou tendência em reduzir a concentração circulante dessa hexose.

Os efeitos da suplementação com selenato de sódio sobre a glicose plasmática em ratos diabéticos tem sido muito estudada. Esses efeitos tem-se mostrado similares entre os estudos, pois a suplementação reduziu a concentração de glicose dos animais diabéticos quando comparado ao grupo controle (BATTELL, DELGATTY, MCNEILL, 1998; BERG *et al.*, 1995; MCNEILL; DELGATTY; BATTELL; 1991).

O mecanismo envolvido nessa atividade anti-diabética está relacionado com a capacidade do selênio, em altas concentrações, atuar como composto insulino-mimético ativando a proteína Akt e quinases envolvidas na cascata de sinalização da insulina, como a proteína quinase p70 S6; nestes eventos, o selênio aparece participando de reações oxidativas (STEINBRENNER *et al.*, 2011).

5.2.6 Efeitos da suplementação com castanha-do-brasil sobre os lipídios circulantes

Neste estudo também foi avaliado o efeito do consumo das castanhas-do-brasil por sessenta dias sobre os marcadores do perfil lipídico. Não foi observado efeito significativo nos grupos estudados, conforme pode ser observado na **Figura 21**.

Dados apresentados em média $\pm$ desvio-padrão. Legenda: HDL-c: lipoproteína de alta densidade - colesterol; LDL-c: lipoproteína de baixa densidade - colesterol; VLDL-c: lipoproteína de muita baixa densidade - colesterol. Grupo CDM: Controle diabetes *mellitus* - não recebeu suplementação; Grupo SDM: Suplementado diabetes *mellitus* - recebeu suplementação com 2,5 g de castanha-do-brasil *in natura*.

Valores de referência: triglicerídeos (≤ 130 mg/dL); colesterol total (≤ 170 mg/dL); HDL-c (≥ 35 mg/dL); LDL-c (≤ 110 mg/dL); e VLDL-c (≤ 30 mg/dL) (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007).

Figura 21. Perfil lipídico, segundo o grupo e tempo de avaliação, de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1. São Paulo, 2012.

Estudos propõem que o selênio pode exercer papel importante no metabolismo das lipoproteínas (LACLAUSTRA *et al.*, 2010; BLEYS *et al.*, 2008;

SENGUPTA *et al.*, 2008; HERCBERG *et al.*, 2005). Essa relação ainda não está bem estabelecida, uma vez que os estudos não são conclusivos.

O mecanismo que pode explicar a associação da concentração de selênio no plasma com as concentrações de lipídios séricos não está claro. As evidências disponíveis dessa relação derivam de experimentos em modelos animais. Ratos com comprometimento na síntese de selenoproteínas (modelo experimental de ratos *knock-out*) apresentaram alterações na concentração da proteína ApoE no fígado, colesterol total e expressão de genes envolvidos na biossíntese, metabolismo e transporte de colesterol, sugerindo que as selenoproteínas possuem papel na regulação da biossíntese de lipoproteínas (SENGUPTA *et al.*, 2008).

Diversos estudos sugerem que a triiodotironina (T_3) está diretamente envolvida na regulação do receptor de LDL e expressão de apoB (NAVAB *et al.*, 1996; AVIRAM *et al.*, 1998). A maior quantidade de T_3 é produzida a partir de T_4 , esta reação é catalisada pela enzima 5'-iodotironina deiodinase tipo 1. Essa enzima tem sua atividade diminuída durante a deficiência de selênio, assim a produção de T_3 pode não ser suficiente (BECKETT *et al.*, 1989; DHINGRA *et al.*, 2004). Nesse sentido, o selênio pode exercer papel importante no metabolismo lipídico, uma vez que o T_3 é conhecido por regular os níveis de LDL-c, o qual é responsável para manutenção dos níveis plasmáticos de colesterol.

A discussão sobre a relação entre o *status* de selênio e a redução do risco de doenças crônicas, fez com que muitos estudos buscassem o entendimento dessa relação. Em se tratando de perfil lipídico e *status* de selênio, Bleys *et al.* (2008) avaliaram uma amostra representativa de americanos adultos (5452 pessoas) e mostraram que concentrações séricas de selênio elevadas estavam associadas com altas concentrações de colesterol total, LDL-c, HDL-c e triglicerídeos. Similarmente, Laclaustra *et al.* (2010) avaliaram 1159 adultos do NHANES 2003-2004 e observaram que altas concentrações de selênio sérico estavam associadas com aumento das concentrações de colesterol total e LDL-c. Associações com HDL-c só foram observadas nas pessoas que apresentaram concentrações séricas de selênio reduzidas.

Recentemente, um estudo brasileiro avaliou o efeito do consumo de 45g de castanha-do-brasil durante 15 dias em quinze pessoas normolipídicas. Não foram

observadas alterações no perfil lipídico das pessoas avaliadas, apesar da castanha conter elevado teor de ácidos graxos mono e polinsaturados (STRUNZ *et al.*, 2008).

Lee, Moon e Chung (2003) e Spagnolo *et al.* (1991) verificaram correlação positiva entre os níveis de selênio no plasma e a fração HDL-c em mulheres adultas e em adolescentes, respectivamente. Neste estudo, ao avaliarmos os 70 pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 na fase inicial do estudo (T0), observamos a existência da correlação positiva entre a concentração de selênio no plasma e a concentração sérica de HDL-c, apesar de não ter sido uma correlação forte, esta foi significativa ($r=0,205$; $p\text{-valor}=0,04$) (**Figura 22**). No entanto, após a suplementação (T1) essa correlação não foi significativa.

Correlação de Pearson ($r=0,205$; $p\text{-valor}=0,04$)

Legenda: HDL-c: lipoproteína de alta densidade -colesterol; Se: selênio.

Figura 22. Correlação entre as concentrações de selênio plasmático e de HDL-c de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 na fase inicial do estudo (T0). São Paulo, 2012.

O efeito da suplementação com selênio e outras substâncias antioxidantes sobre os marcadores do perfil lipídico também foi avaliada no estudo SU.VI.MAX com a população francesa ($n=12.741$). Após os 7,5 anos de intervenção, observou-se maior prevalência de hipercolesterolemia nas mulheres que receberam a suplementação quando comparadas com o grupo placebo. As concentrações de triglicerídeos também foram maiores no grupo suplementado do que no placebo em ambos os sexos (HERCBERG *et al.*, 2005).

5.2.7 Efeitos da suplementação com castanha-do-brasil sobre os marcadores de estresse oxidativo

O aumento das concentrações de glicose circulante está associado com o aumento da produção de EROs *in vivo* e em culturas de células, como já descrito pelos estudos citados anteriormente. Essa produção aumentada de espécies reativas pode provocar um desbalanço no sistema oxidante/antioxidante. No sistema de defesa antioxidante, as enzimas GPx, SOD e catalase reduzem as concentrações de espécies reativas presentes no organismo. Neste estudo foi determinada a atividade das enzimas GPx e SOD, como marcadores antioxidantes enzimáticos, e as concentrações de MDA e LDL⁽⁻⁾ no plasma, e 8-isoprostanos na urina como marcadores de estresse oxidativo.

Após o período de intervenção, não foram observadas alterações significativas nas concentrações de GPx e SOD nos eritrócitos, 8-isoprostanos na urina e LDL⁽⁻⁾ no plasma do grupo SDM estudado. As concentrações de MDA no plasma foram maiores após o período de acompanhamento no grupo CDM (T1), com diferenças significativas (p -valor=0,007). No entanto, após o consumo da castanha-do-brasil as concentrações plasmáticas de MDA no grupo SDM (T1) não diferiram estatisticamente em relação ao T0, como apresentado na Tabela 9.

A atividade da enzima GPx no sangue total aumentou após o período de intervenção nos dois grupos estudados e no eritrócito do grupo CDM. No entanto, não foi observada diferença na atividade da GPx no sangue total entre os grupos SDM (T1) e CDM (T1) (p -valor: 0,108) (**Tabela 9**).

O aumento na atividade da GPx no grupo SDM T1 foi dependente da quantidade de selênio ingerida, como a maioria dos estudos de suplementação têm mostrado. No entanto, o aumento desta enzima observado no grupo CDM T1 pode estar relacionado com a resposta adaptativa frente ao estresse oxidativo.

Aumento na atividade das enzimas antioxidantes tanto no diabetes como em outras doenças crônicas, nas quais há o envolvimento do estresse oxidativo, pode estar relacionado ao mecanismo de adaptação celular associado ao fator de transcrição Nrf2.

Em condições fisiológicas, a atividade transcricional do Nrf2 é inibida pela proteína repressora Keap1 localizada no citoplasma das células. A proteína Keap1 contém resíduos de cisteína, os quais desempenham papel crítico na manutenção do fator de transcrição Nrf2 no citoplasma. Entretanto, o aumento na produção das espécies reativas de oxigênio, como no diabetes, promove a dissociação desse complexo no citoplasma e o fator de transcrição Nrf2 é translocado para o núcleo. No núcleo, o fator de transcrição Nrf2 se liga ao elemento de resposta a antioxidante (ARE) na região promotora dos genes que codificam enzimas antioxidantes e de fase II. A ativação do Nrf2-ARE induz a transcrição dos genes envolvidos no metabolismo da glutatona, como glutamato cisteína ligase (subunidade catalítica e regulatória), glutatona s-transferase, glutatona peroxidase, superóxido dismutase, entre outros genes. Uma vez restabelecido o balanço *redox* celular, o fator de transcrição Nrf2 é dissociado do núcleo pelo Keap1 e subsequentemente translocado para o citoplasma, onde é direcionado para o sistema ubiquitina proteassomo, e então degradado (CHENG; SLOW; MANN, 2011; NEGI *et al.*, 2011; JOHNSON *et al.*, 2008).

Poucos estudos com humanos avaliaram o efeito da suplementação com selênio sobre os marcadores de estresse oxidativo em pacientes com diabetes. Faure *et al.* (2004) suplementaram pacientes com diabetes tipo 2 com 960 µg de selênio por dia (Granions de *Selenium*[®]) durante três meses. Os resultados mostraram que as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) continuaram elevadas tanto no grupo de pacientes com diabetes que recebeu a suplementação quanto no placebo quando comparados com o grupo de pessoas saudáveis. A suplementação também não alterou a atividade da SOD nos eritrócitos desses pacientes. Por outro lado, a suplementação aumentou a atividade da GPx nos eritrócitos, que antes da intervenção foi 41,7 U/g Hb e aumentou para 44,8 U/g Hb após a suplementação.

Outro estudo de suplementação com selênio em pacientes diabéticos tipo 2, mostrou que a suplementação com 100µg de selenito por dia durante 3 meses reduziu as concentrações de TBARS quando comparado ao grupo controle-diabético (KÄHLER *et al.*, 1993).

Tabela 9. Marcadores bioquímicos do estresse oxidativo, segundo o grupo e o tempo de avaliação, de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1. São Paulo, 2012.

Parâmetros	CDM ⁿ⁼³⁵		SDM ⁿ⁼³⁵		p-valor**
	T0	T1	T0	T1	
GPx sangue total (U/g Hb)	40,15 ± 11,19	47,08 ± 11,61*	39,65 ± 11,89	42,41 ± 12,38*	0,11
GPx nos eritrócitos (U/ g Hb)	39,18 ± 9,52	42,63 ± 9,93*	40,21 ± 10,61	40,34 ± 12,20	0,39
SOD nos eritrócitos (U/g Hb)	1658,97 ± 252,09	1638,03 ± 307,75	1732,57 ± 338,09	1672,69 ± 309,64	0,64
MDA no plasma (µM)	1,94 ± 1,03	2,67 ± 1,41*	2,30 ± 1,66	2,81 ± 1,64	0,70
LDL ⁽⁻⁾ no plasma (U/L)	4,30 ± 6,73	4,33 ± 6,17	4,01 ± 5,19	4,34 ± 5,62	0,99
8-isoprostanos na urina (pg/mL)	783,10 ± 518,58 [∞]	747,61 ± 676,54 [∞]	629,99 ± 457,05 [◇]	622,30 ± 517,85 [◇]	0,42

Dados apresentados em média ± desvio-padrão. Legenda: ∞ n=28; ◇ n=33; GPx: glutaciona peroxidase; SOD: superóxido dismutase; MDA: malonaldeído;

LDL⁽⁻⁾: lipoproteína de baixa densidade eletronegativa; Grupo CDM: Controle diabetes *mellitus* - não recebeu suplementação;

Grupo SDM: Suplementado diabetes *mellitus* - recebeu suplementação com 2,5 g de castanha-do-brasil *in natura*.

Valores de referência: GPx no sangue total: 27,5-73,4 U/g Hb; SOD nos eritrócitos: 1102 a 1601 U/gHb.

* p-valor <0,05: diferenças significativas em relação ao T0 do respectivo grupo; ** p-valor <0,05: diferenças significativas entre os grupos CDM e SDM após o período de intervenção (T1).

Sheng, Huang e Xu (2004) mostraram que ratos com diabetes induzida com aloxana tiveram concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos eritrócitos reduzidas após a suplementação com selenito em comparação aos animais controle-diabético. Também verificaram aumento na atividade da GPx nos eritrócitos dos ratos suplementados quando comparados com o grupo controle-diabético.

A atividade da enzima GPx nos eritrócitos de ratos tratados durante 12 semanas com selenato e selenometionina aumentou tanto em relação ao grupo controle-saudável quanto ao grupo controle-diabético. Esse resultado foi proporcional ao aumento das concentrações de selênio no plasma, ou seja, o grupo que recebeu selenometionina apresentou maior conteúdo de selênio no plasma no final do estudo e maior atividade da GPx (ERBAYRAKTAR *et al.*, 2007).

Os pacientes com diabetes, principalmente aqueles com alterações no perfil lipídico, possuem maior propensão às modificações da LDL, como lipoperoxidação e mudanças na carga elétrica (WAGNER *et al.*, 2004; SÁNCHEZ-QUESADA *et al.*, 2001). Mello *et al.* (2011) em revisão sobre a origem e impacto da LDL⁽⁻⁾ na saúde e doença, apontam nove estudos em que a LDL⁽⁻⁾ está aumentada no diabetes. Estudos com estes pacientes mostrando os efeitos da suplementação com selênio sobre as concentrações da LDL⁽⁻⁾ não foram encontrados nas bases de dados científicas pesquisadas.

No estudo de Evangelista (2010) não foram observadas diferenças nas concentrações de LDL⁽⁻⁾, GPx e SOD nos eritrócitos após a suplementação com minerais (selênio e zinco) em pacientes com aterosclerose tratados com estatinas.

Um estudo interessante avaliou o efeito da suplementação com selênio (100 µg/dia durante 10 dias) sobre as concentrações de LDL⁽⁻⁾ e MDA no plasma de pessoas saudáveis após o consumo de uma refeição com lipídios oxidados (dois hamburguers) com o objetivo de investigar alteração nas concentrações desses marcadores no organismo após suplementação de selênio. Os autores observaram que na fase pré-suplementação, as concentrações de LDL⁽⁻⁾ e MDA no plasma se elevaram logo após o consumo da refeição testada. No entanto, após os 10 dias de suplementação com selênio, não foram observadas alterações nas concentrações desses marcadores após o consumo da refeição com lipídios oxidados. Os autores sugeriram que apesar da suplementação não ter alterado o conteúdo de selênio no plasma, o aumento na sua ingestão foi capaz de proteger o organismo da peroxidação lipídica (NATELLA *et al.*, 2007).

Aumento nas concentrações de 8-isoprostanos no plasma e na urina de pacientes com diabetes tipo 1 e 2 tem sido discutido na literatura (IL'YASOVA *et al.* 2012; DEVARAJ *et al.*, 2001; GOPAUL *et al.*, 1995). Muitos estudos buscam investigar o efeito de micronutrientes, principalmente os que possuem propriedades antioxidantes, na redução das concentrações circulantes desse marcador de peroxidação lipídica (WARD *et al.*, 2007; WU *et al.*, 2007; DAVI *et al.*, 1999).

O estudo SETCAP (*SE*lenium *T*herapy in *C*oronary *A*rtery *d*isease *P*atients) conduzido com a população alemã, verificou que a suplementação com 200µg e 500µg de selenito de sódio por dia durante 12 semanas aumentou a atividade da enzima GPx nos eritrócitos dos pacientes com doença arterial coronariana, no entanto, os marcadores de estresse oxidativo, isoprostanos e SOD, não foram alterados após a suplementação com ambas as concentrações (SCHNABEL *et al.*, 2008).

No estudo de Cominetti (2010) após a suplementação com a castanha-do-brasil (290 µg/dia durante 8 semanas) em pacientes obesos foi observado aumento de TBARS no plasma e não foram verificadas alterações nas concentrações urinárias de 8-isoprostano.

O mecanismo pelo o qual a suplementação com selênio atua sobre os marcadores de estresse oxidativo não está claro e os estudos são bastante controversos. No entanto, a quantidade de selênio utilizada neste estudo parece não ter sido suficiente para reduzir as concentrações dos marcadores de estresse envolvidos na progressão do diabetes e que estão relacionados com as doenças coronárias e obesidade.

5.2.8 Efeitos da suplementação com castanha-do-brasil sobre os marcadores inflamatórios

A hiperglicemia crônica e persistente no diabetes está associada com o estresse oxidativo e estado inflamatório crônico. Para avaliar o efeito do consumo de castanha-do-brasil sobre os marcadores inflamatórios foram determinadas as concentrações circulantes de fibrinogênio, proteína C reativa, IL-6, TNF- α , bem como das moléculas de adesão (VCAM e ICAM), PAI-1 e MCP-1, importantes marcadores inflamatórios em eventos cardiovasculares.

Na **Figura 23**, estão apresentados os valores de fibrinogênio, proteína C reativa, IL-6 e TNF- α relativos aos T0 e T1 dos grupos CDM e SDM. Não foram observadas diferenças estatísticas nas concentrações circulantes de PCR após o período de intervenção nos grupos estudados. Os valores de fibrinogênio e TNF- α não foram alterados pela suplementação com castanha-do-brasil. No entanto, no grupo CDM os valores desses marcadores aumentaram significativamente (p -valor=0,02 e p -valor<0,01). Quanto aos valores de IL-6, observou-se elevação no T1 dos dois grupos estudados após o período de intervenção, com diferenças estatísticas (CDM: p -valor=0,02; SDM: p -valor=0,03).

Dados apresentados em média $\pm$ desvio-padrão. Legenda: PCR: proteína C reativa; IL-6: interleucina-6; TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa; Grupo CDM: Controle diabetes *mellitus* - não recebeu suplementação; Grupo SDM: Suplementado diabetes *mellitus* - recebeu suplementação com 2,5 g de castanha-do-brasil *in natura*.

* p -valor <0,05: diferenças significativas entre os tempos T0 e T1; ** p -valor <0,05: diferenças significativas entre os grupos CDM e SDM após o período de intervenção (T1).

Figura 23. Concentração das substâncias inflamatórias (fibrinogênio, IL-6, TNF- α e proteína C reativa), segundo o grupo e tempo de avaliação, de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1. São Paulo, 2012.

A concentração de fibrinogênio tem sido implicada com o desenvolvimento das complicações vasculares nos pacientes com diabetes, particularmente no tipo 2 da doença. No diabetes tipo 1 e naqueles sem complicações metabólicas também tem-se verificado concentrações elevadas de fibrinogênio. Estas concentrações também se relacionam com o controle glicêmico. De forma geral, as concentrações de PCR e fibrinogênio estão elevadas nos pacientes com diabetes, e esse aumento está intimamente relacionado com o risco de aterosclerose nos mesmos.

A abordagem da relação entre o *status* de selênio com as concentrações de fibrinogênio e PCR em pacientes com diabetes é escassa na literatura.

O aumento de substâncias inflamatórias está relacionado com o risco cardiovascular. Hughes *et al.* (1998) avaliaram o risco cardiovascular de 126 pacientes com diabetes tipo 2 comparados com 530 pessoas não diabéticas com idade de 40-69 anos da população de Singapura. O grupo de mulheres diabéticas tiveram, em média, maiores concentrações de fibrinogênio do que o grupo controle. O mesmo não foi observado nos homens. No entanto, não foram observadas diferenças nas concentrações plasmáticas de substâncias antioxidantes, incluindo o mineral selênio.

Um estudo de seguimento com duração de 18 anos com a população americana com idade inicial de 20-32 anos, provenientes do *Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Trace Element Study*, foi realizado com objetivo de verificar a associação entre as concentrações de selênio nas unhas e as concentrações de fibrinogênio, proteína C reativa e IL-6. Os resultados deste estudo não verificaram associações entre a concentração de selênio e os marcadores de inflamação avaliados (XUN *et al.*, 2010).

Semelhante ao que observamos nos pacientes com diabetes, nas condições estudadas, no estudo SETCAP (*SElenium Therapy in Coronary Artery disease Patients*) não foram observadas diferenças nas concentrações de fibrinogênio e PCR após a suplementação com 200µg e 500µg de selenito de sódio por dia durante 12 semanas (SCHNABEL *et al.*, 2008).

Ainda nesse contexto das moléculas inflamatórias, estudos tem mostrado que as doenças cardiovasculares apresentam associação com concentrações reduzidas de selênio. No entanto, o efeito do selênio *in vivo* sobre o estresse oxidativo e a inflamação em humanos não tem sido explorado de maneira extensa, o que dificulta

o entendimento dessas relações no contexto das doenças crônicas. No diabetes esses aspectos necessitam ser elucidados, a fim de reduzir o desenvolvimento das complicações, principalmente as cardiovasculares.

Helmersson *et al.* (2005) investigaram a associação entre as concentrações séricas de selênio, 8-isoprostanos na urina (indicador da inflamação mediada pela COX), PCR e IL-6 em um estudo de seguimento de 27 anos com 615 homens suecos. Os resultados não mostraram associações do *status* de selênio com as concentrações de PCR e IL-6 após os 27 anos de seguimento. No entanto, ao classificar os homens com maiores concentrações de selênio, verificou-se que os níveis de estresse oxidativo e inflamação (mediado pela COX) foram menores. Os autores concluíram que a associação do *status* de selênio com o estresse oxidativo e inflamação podem estar relacionados com a propriedade protetora cardiovascular do selênio.

Neste trabalho, as moléculas de adesão VCAM e ICAM tiveram suas concentrações reduzidas após a intervenção nos dois grupos avaliados. Essa redução foi marginalmente significativa para avaliação do VCAM (CDM: p -valor=0,07; SDM: p -valor= 0,08) e estatisticamente significativa para ICAM (CDM: p -valor=0,009; SDM: p -valor<0,001). As concentrações de MCP-1 não se alteraram após a suplementação com castanha (p -valor=0,61), no entanto, no grupo CDM houve redução significativa após o período de intervenção (p -valor<0,001), conforme mostra a **Figura 24**.

De acordo com dados da literatura, a redução nas concentrações de MCP-1 encontrada no grupo CDM está associada com as concentrações reduzidas das moléculas de adesão. A associação entre a MCP-1 e moléculas de adesão foi discutida em revisão recente. Estudos com células endoteliais de pacientes com diabetes expostas a altas concentrações de glicose resultou em aumento na liberação de MCP-1 e de VCAM-1, indicando interação celular endotélio-monócito. Aumento da MCP-1 tem sido correlacionada positivamente com a hemoglobina glicada e LDL⁽⁻⁾ (PANEE, 2012).

Dados apresentados em média $\pm$ desvio-padrão. Legenda: VCAM: molécula de adesão vascular; ICAM: molécula de adesão celular intercelular; MCP-1: proteína quimiotática de monócitos-1; PAI-1: inibidor de plasminogênio ativado 1; Grupo CDM: Controle diabetes *mellitus* - não recebeu suplementação; Grupo SDM: Suplementado diabetes *mellitus* - recebeu suplementação com 2,5 g de castanha-do-brasil *in natura*.

* p-valor < 0,05: diferenças significativas entre os tempos T0 e T1; **p-valor < 0,05: diferenças significativas entre os grupos CDM e SDM após o período de intervenção (T1).

Figura 24. Concentração de moléculas de adesão (VCAM e ICAM), do inibidor de plasminogênio ativado-1 (PAI-1) e da proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), segundo o grupo e tempo de avaliação, de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1. São Paulo, 2012.

Para avaliar o efeito do consumo da castanha-do-brasil em nível molecular, foram avaliadas a expressão gênica da GPx-1, ICAM, COX-2, MCP-1, IL-6 e TNF- α . Não foram observadas diferenças significativas na expressão de tais genes após o período de intervenção (T1) e entre os grupos, conforme mostra a **Figura 25**.

Dados apresentados em média $\pm$ desvio-padrão. Legenda: GPx-1: glutationa peroxidase-1; ICAM: molécula de adesão celular intercelular; COX-2: ciclooxigenase-2; MCP-1: proteína quimiotática de monócitos-1; IL-6: interleucina-6; TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa; RPS-13: proteína ribossomal S13; Grupo CDM: Controle diabetes *mellitus* - não recebeu suplementação; Grupo SDM: Suplementado diabetes *mellitus* - recebeu suplementação com 2,5 g de castanha-do-brasil *in natura*. A expressão do mRNA foi obtida pela razão entre a expressão do mRNA alvo e do mRNA de referência RPS-13.

Figura 25. Expressão gênica da GPx-1, ICAM, COX-2, MCP-1, IL-6 e MCP-1, segundo o grupo e tempo de avaliação, de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1. São Paulo, 2012.

Ainda é controversa a hipótese de que a avaliação de selenoproteínas em nível de expressão gênica pode ser um bom biomarcador do *status* de selênio, principalmente em populações com concentrações de selênio consideradas adequadas ou subótimas (RESZKA *et al.*, 2009; SUNDE *et al.*, 2008).

A suplementação com 100 µg de selenito de sódio por um período curto em pessoas saudáveis do estudo de SELGEN modificou a expressão de genes que codificam para proteínas que atuam na biossíntese proteica, observado pela técnica de *microarray*, a qual analisou o RNA isolado de linfócitos. Após a suplementação observou-se apenas aumento na expressão das selenoproteínas K e 15 (15 kDa), indicando que somente um pequeno número de genes que codificam para selenoproteínas podem se alterar pelas diferenças no consumo de selênio (PAGMANTIDIS *et al.*, 2008).

Os estudos conduzidos com animais e humanos para avaliar o *status* de selênio na expressão de selenoproteínas, mostraram que mesmo com a ingestão subótima de selênio, esta parece ser suficiente para manter a expressão dos genes das selenoproteínas. Nenhum dos estudos realizados em humanos indicaram que este biomarcador, ou seja, a avaliação da expressão gênica das selenoproteínas a partir do sangue total e de células do sangue, fosse um bom indicador do *status* de selênio (PAGMANTIDIS *et al.*, 2008; RAVN-HAREN *et al.*, 2008; SUNDE *et al.*, 2008; RESZKA *et al.*, 2009). Sendo assim, segundo Rezska *et al.* (2012), as necessidades moleculares de selênio parecem ser menores do que as estabelecidas para humanos (55 µg/dia) (EFSA, 2008; ESTADOS UNIDOS, 2000). No entanto, o baixo *status* de selênio pode não ser adequado para as atividades fisiológicas das selenoproteínas. Isto sugere que os marcadores funcionais, como a atividade das enzimas selenodependentes, são bons indicadores da ingestão de selênio quando comparados aos marcadores moleculares.

Rezska *et al.* (2012) ao abordarem a avaliação da expressão gênica de selenoproteínas como biomarcador do *status* de selênio, concluíram que este *status* avaliado tanto pelas técnicas bioquímicas quanto moleculares, podem ser influenciadas por fatores ambientais (fumo, exposição ao ambiente, dieta) e por parâmetros de saúde, sexo, idade e pelos sistemas imunológicos e endócrinos. Além disso, o impacto dos polimorfismos em genes de selenoproteínas sobre as necessidades de selênio é diferenciada para indivíduos com diferentes genótipos.

Poucos estudos com humanos foram realizados para verificar o efeito da suplementação com selênio sobre a expressão de genes pró-inflamatórios. Li *et al.* (2011) mostraram que o selênio foi capaz de inibir a expressão da COX-2 induzida por altas concentrações de glicose e insulina, e a expressão da COX-2 pelo H₂O₂ em células endoteliais. Segundo os autores, essa resposta foi parcialmente mediada pela capacidade do selênio em modular a via de sinalização do p38.

No diabetes, o risco para desenvolver doenças cardiovasculares é elevado, causado pela expressão aumentada de moléculas de adesão, sendo a hiperglicemia e a hiperinsulinemia responsáveis, em parte, por este aumento. A lesão aterosclerótica envolve uma célula endotelial em estado pró-inflamatório, a qual recruta leucócitos, e assim promove o seu movimento através do endotélio. Este processo necessita das moléculas de adesão endotelial ICAM-1 e VCAM-1, e de moléculas de adesão leucocitária (E-selectina), sendo o TNF- α um potente indutor destas moléculas. A participação do selênio em alterar a expressão de citocinas induzida por essas moléculas de adesão foi verificado em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) pré-tratadas com selenito de sódio (0-2 mM) por 24 horas, e em seguida tratadas com 0 ou 50 U/mL de TNF- α . O selenito inibiu significativamente a expressão gênica (mRNA) das moléculas de adesão induzida pelo TNF- α de maneira dose-dependente. No entanto, quando avaliada a translocação da subunidade p65 do fator de transcrição NF κ B, o selenito não foi capaz de inibir sua translocação para o núcleo. Nesse sentido, os autores concluíram que o selênio pode modular a expressão de ICAM-1, VCAM-1 e selectina-E induzidas por citocinas em HUVECs, e esta modulação não é mediada pela inibição na ativação do fator de transcrição NF κ B (ZHANG *et al.*, 2002).

Em células leucocitárias de humanos, a selenocisteína, a selenometionina e o composto sintético organo ebselen (2-fenil-1, 2-benzisoselenazol-3 (2H)-ona) em concentrações micromolares foram capazes de reduzir a ativação do fator de transcrição nuclear NF κ B estimulada pelo peroxinitrito. Além disso, essas substâncias também foram capazes de inibir a expressão gênica e proteica da IL-8, tanto nos leucócitos polimorfonucleares quanto nas células mononucleares. Estes resultados indicam que compostos contendo selênio podem ser eficazes na sinalização do peroxinitrito em leucócitos, e assim atuarem como moduladores

potenciais no recrutamento de leucócitos em condições patológicas associadas com o aumento da produção de peroxinitrito (JÓZSEF; FILEP, 2003).

De forma semelhante, Kim *et al.* (2004) verificaram que o selênio atenuou as concentrações de EROs e NO induzidas pelo LPS em culturas de macrófagos. A redução de NO foi observada tanto pela diminuição na expressão gênica quanto proteica da iNOS. Esses efeitos protetores do selênio foram dependentes da ativação da p38 da MAPK e do fator de transcrição NFκB. Estes resultados sugerem que o selênio pode atuar como um agente anti-inflamatório, e sua utilização pode ser considerada em uma possível intervenção preventiva. No entanto, a sua eficácia e segurança devem ser continuamente investigadas, uma vez que a ingestão superior a 400 µg/dia em adultos pode produzir efeitos adversos.

Em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, foi verificado que o selenito administrado durante duas semanas (2 mg de selenito/kg de peso corporal/dia, por gavagem) aumentou significativamente o conteúdo de selênio, a expressão gênica e a atividade da GPx no pâncreas quando comparado ao grupo de animais diabéticos não tratados. Da mesma forma, a expressão de genes pró-inflamatórios (IL-1β, TNF-α e IF-γ), bem como a expressão de mRNA e a atividade da iNOS, e o conteúdo de óxido nítrico foram reduzidos no grupo tratado com selenito quando comparada com o grupo de animais diabéticos não tratados. Os autores concluíram que a dose de selênio, classificada como farmacológica, foi capaz de reduzir as concentrações das substâncias pró-inflamatórias nos animais tratados quando comparados ao grupo controle (ZENG; ZHOU; HUANG, 2009).

Em macrófagos deficientes em selênio, a atividade de GPx foi significativamente reduzida e o estresse oxidativo foi significativamente maior do que em células suplementadas com selênio. Essas células ao serem estimuladas com LPS, tiveram a expressão proteica da COX-2 aumentada de 2-3 vezes, bem como houve aumento das concentrações de PGE₂ quando comparadas com as células suplementadas com selênio. No entanto, a expressão proteica da COX-1 não foi afetada pelo estímulo do LPS ou pelo *status* de selênio. Foi observado também nesse estudo que após as células serem estimuladas com LPS, a ativação do fator de transcrição NFκB foi significativamente aumentada nos macrófagos deficientes em selênio, corroborando com a expressão aumentada de COX-2 (ZAMAMIRI-DAVIS *et al.*, 2002).

Os estudos *in vitro* e com animais dão subsídios para investigar os efeitos do selênio em humanos, mas alguns aspectos devem ser considerados como a dose, a forma química e o modelo de estresse oxidativo utilizado. Além disso, quando realizada a suplementação com selênio em humanos, existe o fator biodisponibilidade, como a absorção, metabolização e utilização do composto, que embora saibamos que seja alta, ainda assim pode variar de um indivíduo para outro. Associado a isto, o complexo sistema do corpo humano se adapta às situações de estresse e influências do meio, como a dieta, que entre outros fatores pode influenciar diretamente os resultados de estudos com humanos. Portanto, apesar de todos esses estudos *in vitro* e em animais demonstrarem efeitos positivos do selênio sobre a inflamação, a suplementação com castanha-do-brasil em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 não alterou positivamente a expressão dos genes pró-inflamatórios nas condições estudadas.

5.2.9 Classificação dos pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 após o período de intervenção, de acordo com os parâmetros bioquímicos e moleculares avaliados.

Para avaliar associações estatísticas entre todas as variáveis, os pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 foram classificados de acordo com os parâmetros de selênio nos eritrócitos, GPx no sangue total, MDA e TNF- α utilizando a análise hierárquica de agrupamentos (AHA) (Figura 24). Assim, a similaridade entre todos os pacientes foi agrupada com o peso estatístico de todas as variáveis, e então os grupos (*clusters*) foram sugeridos (**Figura 26**).

Como pode ser observado na figura abaixo, os valores da atividade da GPx no sangue total estão relacionados com as demais variáveis utilizadas (selênio nos eritrócitos, MDA e TNF- α) para classificar os pacientes com diabetes tipo 1.

Figura 26. Análise Hierárquica de Agrupamentos (AHA) aplicada às variáveis. São Paulo, 2012. Legenda: GPx: glutathione peroxidase; TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa; MDA: malonaldeído; Se: selênio.

Usando a AHA, os pacientes ($n=70$) foram classificados de acordo com os valores de selênio nos eritrócitos, GPx no sangue total, MDA e TNF- α em três grupos distintos sugeridos por esta análise: grupo 1 constituído por 10 pacientes do grupo CDM e 14 do SDM ($n=24$), grupo 2 por apenas pacientes do grupo SDM ($n=11$) e o grupo 3, composto por 25 pacientes do grupo CDM e 10 do SDM (total de 35 pacientes). Para melhor visualização da classificação dos pacientes na figura, foi adotada a denominação castanha para o grupo SDM e controle para o grupo CDM (**Figura 27**).

Figura 27. Classificação dos pacientes (n=70) de acordo com os parâmetros de selênio nos eritrócitos, glutathione peroxidase (GPx) no sangue total, malonaldeído (MDA) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) usando a Análise Hierárquica de Agrupamentos (AHA). São Paulo, 2012.

Na **Tabela 10** estão apresentados os valores das variáveis de resposta dos três grupos sugeridos pela AHA, conforme a classificação dos pacientes com diabetes tipo 1 pelos parâmetros de selênio nos eritrócitos, GPx no sangue total, MDA e TNF- α . Como pode ser observado, o grupo 2, o qual foi constituído somente por pacientes do grupo SDM, apresentou maiores concentrações de selênio no plasma, eritrócitos e urina, como era esperado pelo conteúdo de selênio presente na castanha. Efeitos positivos da suplementação foram verificados, como a redução significativa ($p < 0,05$) do percentual de HbA_{1c} e da concentração sérica de VCAM. Os valores médios de MDA e glicose sérica também foram menores nesse grupo, com diferença considerada marginalmente significativa ($p < 0,10$). Apesar do *status* de selênio, confirmado pelos parâmetros plasmático, eritrocitário e urinário, ter sido melhorado, a atividade da GPx no sangue total e eritrócitos não aumentou com o

consumo da castanha-do-brasil. Em termos estatísticos, diferença significativa foi observada na atividade da GPx no sangue total entre o grupo 2 e os demais (p -valor: 0,02), o mesmo não foi observado para atividade da GPx e SOD nos eritrócitos entre os grupos (p -valores: 0,38 e 0,21, respectivamente). Uma possível explicação para os valores da atividade da GPx no sangue total terem sido menores no grupo 2, seguido pelos grupos 1 e 3, se deve ao menor estresse oxidativo, verificado pelo parâmetro de MDA e pelo percentual de HbA_{1c}, os quais apresentaram valores crescentes na mesma ordem dos grupos citados acima.

Para esta mesma AHA, os parâmetros do perfil lipídico não se alteraram conforme a classificação dos pacientes com diabetes pelos parâmetros de selênio nos eritrócitos, GPx no sangue total, MDA e TNF- α .

Os valores de LDL⁽⁻⁾ no plasma e 8-isoprostanos na urina não foram diferentes estatisticamente entre os grupos. Porém, as concentrações de 8-isoprostanos foram menores no grupo 2 seguido dos grupos 1 e 3, respectivamente. Lembrando que o grupo 2 foi constituído por 100% de pacientes suplementados, e os grupos 1 e 3 por 58% e 29%, respectivamente.

Os marcadores inflamatórios que tiveram seus valores médios diferentes estatisticamente entre os três grupos sugeridos pela AHA, foram TNF- α e VCAM (p -valores: <0,01 e 0,02, respectivamente). Os valores de TNF- α seguiram a seguinte ordem de concentração: grupo 3 < grupo 2 < grupo 1. E para as concentrações de VCAM, seguiu-se a ordem: grupo 2 < grupo 3 < grupo 1. As concentrações da proteína C reativa, IL-6, MCP-1, ICAM-1 e PAI-1 não foram diferentes entre os três grupos, bem como a expressão dos genes GPx-1, ICAM-1, COX-2, MCP-1, IL-6 e TNF- α . No entanto, este último gene teve sua expressão relacionada com a quantidade sérica de TNF- α .

Tabela 10. Caracterização dos pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 contidos em cada grupo, conforme a classificação pela AHA pelos parâmetros de selênio nos eritrócitos, GPx no sangue total, MDA e TNF- α . São Paulo, 2012.

Variáveis de resposta	Cluster 1 (n=24)	Cluster 2 (n=11)	Cluster 3 (n=35)	DPA ¹	P-valor ²	P-valor ³
Se plasmático ($\mu\text{g/L}$)	89,98^b	128,82^a	76,66^b	41,97	0,37	<0,01
Se Eritrocitário ($\mu\text{g/L}$)	100,23^b	200,07^a	88,55^b	52,59	0,77	<0,01
Se Urinário ($\mu\text{g/L}$)	19,38^{ab}	40,13^a	10,53^b	23,68	<0,01	0,03
HbA_{1C} (%)	10,80^a	8,30^b	11,19^a	3,54	0,67	0,02
Glicose (mg/dL)	239,41	141,51	263,15	140,66	0,27	0,08 [†]
Triglicerídeos (mg/dL)	96,90	68,92	127,87	145,21	0,01	0,36
Colesterol total (mg/dL)	159,19	156,21	168,37	41,78	0,19	0,56
HDL-c (mg/dL)	42,71	44,50	43,68	10,64	0,30	0,69
LDL-c (mg/dL)	97,10	97,93	99,11	28,16	0,63	0,96
VLDL-c (mg/dL)	19,38	13,78	25,57	29,04	0,01	0,36
LDL ⁽⁻⁾ (U/L)	3,56	5,93	4,36	5,86	0,28	0,74
MDA (μM)	2,85	1,83	2,95	1,52	0,07	0,09 [†]
Isoprostanos na urina (pg/mL)	663,63	551,40	733,95	594,1	0,08	0,67
GPx sangue total (U/g Hb)	41,34^{ab}	39,73^b	48,65^a	12,14	0,56	0,02
GPx eritrócitos (U/g Hb)	41,54	37,77	42,61	11,1	0,24	0,38
SOD eritrócitos (U/g Hb)	1715,92	1520,36	1656,26	306,95	0,57	0,21
Proteína C reativa (ng/mL)	4345,18	9176,06	7297,96	10698,81	0,99	0,71
Fibrinogênio (ng/mL)	327,44	607,80	533,21	403,81	0,02	0,06 [†]

Resultados e discussão

Continuação da **Tabela 10**. Caracterização dos pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 contidos em cada grupo, conforme a classificação pela AHA pelos parâmetros de selênio nos eritrócitos, GPx no sangue total, MDA e TNF- α . São Paulo, 2012.

Variáveis de resposta	Cluster 1 (n=24)	Cluster 2 (n=11)	Cluster 3 (n=35)	DPA ¹	P-valor ²	P-valor ³
IL-6 (pg/mL)	7,18	4,95	4,11	10,93	0,09	0,61
TNF-α (pg/mL)	8,63^a	5,79^b	4,18^b	3,01	0,80	<0,01
MCP-1 (pg/mL)	305,50	300,78	249,63	125,06	0,34	0,26
VCAM (ng/mL)	1.823,59^a	1.257,71^b	1.465,86^{ab}	561,63	0,01	0,02
ICAM (ng/mL)	228,51	182,96	220,62	70,68	0,44	0,25
PAI-1 (ng/mL)	135,13	111,13	125,66	48,62	0,00	0,28
GPX-1/RPS 13	1,17	1,05	0,92	0,61	0,08	0,48
ICAM-1/RPS 13	1,15	0,96	0,93	0,62	0,77	0,66
COX-2/RPS 13	1,03	1,80	0,82	1,33	0,21	0,19
MCP-1/RPS 13	1,58	9,76	1,85	11,43	<0,01	0,12
IL-6/RPS 13	0,99	1,26	0,95	0,46	0,80	0,21
TNF- α /RPS 13	1,46	1,13	1,04	1,74	0,06	0,67

Nota: ¹DPA = desvio padrão agrupado; ²Valor de probabilidade obtido pelo teste de Levene para homogeneidade de variâncias; ³Valor de probabilidade obtido pela análise de variância unifatorial. Letras diferentes na mesma linha representam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey ou Kruskal-Wallis. [†] p -valor $< 0,10$: marginalmente significativo.

Legenda: Se: selênio; HbA_{1c}: hemoglobina glicada; HDL-c: lipoproteína de alta densidade -colesterol; LDL-c: lipoproteína de baixa densidade - colesterol; VLDL-c: lipoproteína de muita baixa densidade – colesterol; LDL⁽⁻⁾: lipoproteína de baixa densidade eletronegativa; MDA: malondialdéido; GPx: glutathione peroxidase; SOD: superóxido dismutase; PCR: proteína C reativa; IL-6: interleucina-6; TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa; MCP-1: proteína quimiotática de monócitos-1; VCAM: molécula de adesão vascular; ICAM: molécula de adesão celular intercelular; PAI-1: inibidor de plasminogênio ativado 1.

Síntese dos principais resultados obtidos após suplementação

Após o consumo da castanha-do-brasil, houve aumento significativo das concentrações de selênio no plasma e eritrócito, sendo que esse aumento foi de 117 e 153%, respectivamente, mostrando que o selênio presente na castanha-do-brasil possui alta biodisponibilidade. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados em outros estudos que avaliaram a suplementação com este mineral. Paralelamente, a suplementação com selênio nesses estudos aumentou, também, a atividade da enzima GPx, um marcador funcional do *status* de selênio.

No entanto, quando avaliado o efeito da suplementação sobre as concentrações de substâncias inflamatórias, a castanha-do-brasil não foi efetiva em reduzir significativamente essas substâncias, com exceção da ICAM e PAI-1.

Ao avaliar os resultados pela AHA, observamos que o estresse oxidativo foi maior no grupo (*cluster*) que tinha maior percentual de pacientes diabéticos do grupo CDM. Este grupo foi também o que apresentou as menores concentrações de selênio e maior atividade da GPx no sangue total. Isso pode ser explicado pela ativação do fator de transcrição Nrf2, o qual induz a transcrição dos genes envolvidos na resposta antioxidante, como por exemplo, a GPx e SOD.

A elucidação de mecanismos pelos quais os compostos de selênio atuam no estresse oxidativo e inflamação induzida pela hiperglicemia em pacientes com diabetes será de grande relevância clínica e nutricional, pois o que se busca na terapia do diabetes é reduzir o aparecimento de outras doenças crônicas, trazendo benefícios à saúde desses pacientes.

6. CONCLUSÕES

A castanha-do-brasil, além de ser uma boa fonte de selênio e lipídios, apresentou quantidades elevadas de compostos fenólicos e atividade antioxidante expressiva *in vitro*.

A suplementação com a castanha-do-brasil mostrou-se efetiva em melhorar o estado nutricional relativo ao selênio dos pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 sem alterar a expressão gênica da GPx1.

Houve aumento da atividade da GPx no sangue total, embora não tenha sido observada redução dos marcadores de estresse oxidativo após a suplementação com a castanha-do-brasil.

O consumo da castanha-do-brasil reduziu a concentração de ICAM e PAI-1 no soro, sem, no entanto, exercer efeitos sobre os demais marcadores inflamatórios (bioquímicos e de expressão gênica).

Utilizando-se da análise hierárquica de agrupamentos, pode-se concluir que % HBA_{1C} e as concentrações de MDA no plasma e VCAM no soro foram menores no grupo constituído somente por pacientes que receberam a suplementação, justificando a continuidade dos estudos nesta linha de pensamento.

7. REFERÊNCIAS

- ABDULAH, R.; MIYAZAKI, K.; NAKAZAWA, M.; KOYAMA, H. Chemical forms of selenium for cancer prevention. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 19, p. 141-150, 2005.
- ABE, L. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Comparison of phenol content and antioxidant capacity of nuts. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, suppl.1, p. 254-259, 2010.
- ABRAHAM, E. NF-kappaB activation. **Critical Care Medicine**, v. 28, p.100-104, 2000.
- AHRÉN, B.; CORRIGAN, C.B. Intermittent need for insulin in a subgroup of diabetic patients in Tanzania. **Diabetic Medicine**, v. 2, p. 262-64, 1984.
- AKBARALY, T. N.; ARNAUD, J.; RAYMAN, M. P.; HININGER-FAVIER, I.; ROUSSEL, A.; BERR, C.; FONTBONNE, A. Plasma selenium and risk of dysglycemia in an elderly French population: results from the prospective Epidemiology of Vascular Ageing Study. **Nutrition & Metabolism**, p. 7-21, 2010. doi:10.1186/1743-7075-7-21
- AKSOY, N.; VURAL, H.; SABUNCU, T.; ARSLAN, O.; AKSOY, S. Beneficial effects of vitamins C and E against oxidative stress in diabetic rats. **Nutrition Research**, v. 25, p. 625-630, 2005.
- ALARCON-NAVARRO, M.; MARTINEZ, M. C. L. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. **Science of the Total Environment**, v. 249, p. 347-71, 2000.
- ALASALVAR, C.; KARAMAĆ, M.; AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Antioxidant and antiradical activities in extracts of hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut green leafy cover. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 13, p.4826-4832, 2006.
- ALASALVAR, C.; SHAHIDI, F. Natural antioxidants in tree nuts. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 111, n. 11, p. 1056-62, 2009.
- ALESSI, D.R.; DOWNES, C.P. The role of PI 3-kinase in insulin action. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1436, p. 151-164, 1998.
- AMAROWICZ, R.; TROSZYN'SKA, A.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of almond seed extract and its fractions. **Journal of Food Lipids**, v. 12, p. 344-358, 2005.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. **Diagnosis and classification of diabetes mellitus**. Diabetes Care, v. 33, suppl. 1, p.S62-S69, 2010.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. **Medical Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Consensus Algorithm for the Initiation and Adjustment of Therapy**. Diabetes Care, v. 32, n. 1, p.193-203, 2009.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 5.ed. Champaign: AOCS, 2004. p.1-2. [Official method Ce 2-66 - Preparation of Methyl Esters of Fatty Acids].

ARCANJO, C. L.; PICCIRILLO, L. J.; MACHADO, I. V.; ANDRADE JR, C. R. M.; CLEMENTE, E. L.; GOMES, M. B. Avaliação de dislipidemias e índices antropométricos em pacientes com diabetes mellitus tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, n. 6, p. 951-8, 2005.

ASHCROFT, F. M.; HARRISON, D. E.; ASHCROFT, S. J. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cell. **Nature**, v. 312, p. 446-448, 1984.

ASHCROFT, F. M.; RORSMAN, P. Electrophysiology of the pancreatic β -cell. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 54, p. 87-143, 1989.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. CD-ROM. 17th edition, Arlington, VA: AOAC International, 2000.

AVIRAM, M.; ROSENBLATT, M.; BISGAIER, C.L.; NEWTON, R.S.; PRIMOPARMA, S. L.; LADU, B. N. Paraoxanase inhibit high -density lipoproteins oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxanase. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 8, p.1581-1590, 1998.

BAGIS, S.; TAMER, L.; BILGIN, G.S.R.; GULER, H.; ERDOGAN, B.E.C. Free radicals and antioxidants in primary fibromyalgia: an oxidative stress disorder? **Rheumatology International**, v. 25, n. 3, p. 188-190, 2005.

BAKER, S.; COHEN H. J. Increased Sensitivity to H₂O₂ in Glutathione Peroxidase-Deficient Rat Granulocytes. **Journal of Nutrition**, v. 114, p. 2003-2009, 1984.

BALASUBASHINI, M. S.; RUKKUMANI, R.; VISWANATHAN, P.; MENON, V.P. Ferulic acid alleviates lipid peroxidation in diabetic rats. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 310-314, 2004.

BALASUBRAMANYAM, A. Syndromes of ketosis-prone diabetes *mellitus*. **Endocrine Reviews**, v. 29, p. 292-302, 2008.

BANGSTAD, H. J.; DANNE, T.; DEEB, L. C.; JAROSZ-CHOBOT, P.; URAKAMI, T.; HANAS, R. Insulin treatment. **Pediatric Diabetes**, v. 8, p. 88-102, 2007.

BARBER, A. D.; HARRIS, S. R. Oxygen free radicals and oxidants: a review. **American Pharmaceutical Review**, v. 34, n. 9, p. 26-35, 1994.

- BARREIRA, J. C. M.; FERREIRA, I. C. F. R.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; PEREIRA, J. A. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. **Food Chemistry**, v. 107, n. 3, p.1106-1113, 2008.
- BASTOS, A. S.; LOUREIRO, A. P. L.; OLIVEIRA, T. F.; CORBI, S. C. T.; CAMINAGA, R. M. S.; ROSSA-JÚNIOR, C.; SILVANA R.P. ORRICO, S. R.P. Quantitation of malondialdehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid chromatography-based method. **Analytical Biochemistry**, v. 423, p. 141-146, 2012.
- BATTELL, M. L.; DELGATTY, H. L. M.; MCNEILL, J. H. Sodium selenate corrects glucose tolerance and heart function in STZ diabetic rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 179, p. 27–34, 1998.
- BECKETT, G. J.; MACDOUGAL, D. A.; NICOL, F.; ARTHUR, J. R. Inhibition of types I and II iodothyronine deiodinase activity in rat liver, kidney and brain produced by selenium deficiency. **Biochemical Journal**, v. 259, p. 887-892, 1989.
- BEESON, M.; SAJAN, M.P.; DASPET, J. G.; LUNA, V.; DIZON, M.; GREBENEV, D.; POWE, J. L.; LUCIDI, S.; MIURA, A.; KANO, Y.; BANDYOPADHYAY, G.; STANDAERT, M. L.; YEKO, T. R.; FARESE, R. V. Defective activation of protein kinase C- α in muscle by insulin and phosphatidylinositol-3,4,5,-(PO(4))(3) in obesity and polycystic ovary syndrome. **Metabolic Syndrome and Related Disorders**, v. 2, p. 49–56, 2004.
- BELLINGER, F. P.; RAMAN, A. V.; REEVES, M. A.; BERRY, M. J. Regulation and function of selenoproteins in human disease. **Biochemical Journal**, v. 422, p.11–22, 2009.
- BENGMARK, S. Curcumin, an atoxic antioxidant and natural NF- κ B, cyclooxygenase-2, lipooxygenase, and inducible nitric oxide synthase inhibitor: a shield against acute and chronic diseases. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 30, p. 45–51, 2006.
- BENZIE, I. F. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 47, p. 233-261, 1996.
- BERG, E. A.; WU, J. Y.; CAMPBELL, L.; KAGEY, M.; STAPLETON, S. R. Insulin-like effects of vanadate and selenate on the expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase and fatty acid synthase in diabetic rats. **Biochimie**, v. 77, p. 919-924, 1995.
- BLEYS, J.; NAVAS-ACIEN, A.; STRANGES, S.; MENKE, A.; MILLER, E. R.; GUALLAR, E. Serum selenium and serum lipids in US adults. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, p. 416–423, 2008.
- BLEYS, J.; NAVAS-ACIEN, A.; GUALLAR, E. Serum selenium and diabetes in US adults. **Diabetes Care**, v. 30, p. 829–834, 2007.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v.181, n.26, p.1199-1200, 1958.

BLOMHOFF, R.; CARLSEN, M.H.; ANDERSEN, L.F.; JACOBS JR, D.R. Health benefits of nuts: potential role of antioxidants. **British Journal of Nutrition**, v. 99, n. 2, p. 447-8, 2008.

BRADY, M. J.; BOURBONNAIS, F. J.; SALTIEL, A. R. The activation of glycogen synthase by insulin switches from kinase inhibition to phosphatase activation during adipogenesis in 3T3-L1 cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 14063–14066, 1998.

BRAND-WILLIAMS, W.; UVELIER, M. E.; BREST, C. Use of Free Radical Method Evaluate Antioxidant Activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRAUN, M.; RAMRACHEYA, R.; AMISTEN, S.; BENGTSSON, M.; MORITOH, Y.; ZHANG, Q.; JOHNSON, P. R.; RORSMAN, P. Somatostatin release, electrical activity, membrane currents and exocytosis in human pancreatic delta cells. **Diabetologia**, v. 52, p. 1566–1578, 2009.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism. **Diabetes**, v. 54, p. 1615-1625, 2005.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, p. 813-820, 2001.

BRUFAU, G.; BOATELLA, J.; RAFECAS, M. Nuts: source of energy and macronutrients. **British Journal of Nutrition**, v. 96, n. 2, p.24-28, 2006.

BURK, R F.; NORSWORTHY, B. K.; HILL, K. E.; MOTLEY, A. K.; BYRNE, D. W. Effects of chemical form of selenium on plasma biomarkers in a high-dose human supplementation trial. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 15, p. 804-10, 2006.

BURK, R. F. Selenium, an antioxidant nutrient. **Nutrition Clinical Care**, v. 5, p. 75–79, 2002.

CABRERA, O.; BERMAN, D. M.; KENYON, N. S.; RICORDI, C.; BERGGREN, P. O.; CAICEDO, A. “The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function”. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 2334–2339, 2006.

CERIELLO, A. Oxidative stress and glycemic regulation. **Metabolism**, v.49, p. 27–29, 2000.

- CHEN, C. Y. O.; BLUMBERG, J. B. Phytochemical composition of nuts. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 17, p. 329-332, 2008.
- CHEN, F.; CASTRANOVA, V.; SHI, X.; DEMERS, L. M. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. **Clinical Chemistry**, v. 45, p. 7-17, 1999.
- CHENG, X.; SIOW, R. C. M.; MANN, G. E. Impaired Redox Signaling and Antioxidant Gene Expression in Endothelial Cells in Diabetes: A Role for Mitochondria and the Nuclear Factor-E2-Related Factor 2-Kelch-Like ECH-Associated Protein 1 Defense Pathway. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.14, n.3, p.469-487, 2011.
- CHUNHIENG, T.; PÉTRITIS, K.; ELFAKIR, C.; BROCHIER, J.; GOLI, T.; MONTET, D. Study of Selenium Distribution in the Protein Fractions of the Brazil Nut, *Bertholletia excels*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 13, p. 4318-4322, 2004
- COHEN, P. **Control of enzyme activity**. 2^a ed., New York, Chapman Hall, 1983, p. 42-71.
- COMINETTI, C.; BORTOLI, M. C.; GARRIDO, A. B.; COZZOLINO, S. M. F. Brazilian nut consumption improves selenium *status* and glutathione peroxidase activity and reduces atherogenic risk in obese women. **Nutrition Research**, v. 32, p. 403-407, 2012.
- COMINETTI, C.; BORTOLI, M. C.; PURGATTO, E.; ONG, T. P.; MORENO, F. S.; GARRIDO JR. A. B.; COZZOLINO, S. M. F. Associations between glutathione peroxidase-1 Pro198Leu polymorphism, selenium *status*, and DNA damage levels in obese women after consumption of Brazil nuts. **Nutrition**, p. 1-6, 2011.
- COMINETTI, C. **Efeitos da suplementação com castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) sobre o estresse oxidativo em mulheres obesas e sua relação com o polimorfismo Pro198Leu no gene da glutathione peroxidase 1**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- COSKUN, O.; KANTER, M.; KORKMAZ, A.; OTER, S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas. **Pharmacological Research**, v. 51, p. 117-123, 2005.
- COUTINHO, V. F. **Efeito da suplementação com castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) no estado nutricional de praticantes de capoeira em relação ao selênio**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003. 175p.
- CRAIG, M. E.; HATTERLEY, A.; DONAGHUE, K. C. Definition, epidemiology and classification of diabetes in children and adolescents. **Pediatric Diabetes**, v.10, suppl. 12, p. 3-12, 2009.

CROSS, D. A.; ALESSI, D. R.; COHEN, P.; ANDJELKOVICH, M.; HEMMINGS, B. A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. **Nature**, v. 378, p. 785-789, 1995.

CURRY, D. L.; BENNETT, L. L.; GRODSKY, G. M. Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. **Endocrinology**, v. 83, p. 572-584, 1968.

CZERNICHOW, S.; COUTHOUIS, A.; BERTRAIS, S.; VERGNAUD, A.; DAUCHET, L.; GALAN, P.; HERCBERG, S. Antioxidant supplementation does not affect fasting plasma glucose in the Supplementation with Antioxidant Vitamins and Minerals (SU.VI.MAX) study in France: association with dietary intake and plasma concentrations. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, p. 395-399, 2006.

DANESH, J.; WHINCUP, P.; WALKER, M.; LENNON, L.; THOMSON, A.; APPLEBY, P.; GALLIMORE, J. R.; PEPYS, M. B. Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. **British Medical Journal**, v. 321, p. 199-204, 2000.

DAVI, G.; CIABATTONI, G.; CONSOLI, A.; MEZZETTI, A.; FALCO, A.; SANTARONE, S.; PENNESE, A.; VITACOLONNA, E.; BUCCIARELLI, T.; COSTANTINI, F.; CAPANI, F.; PATRONO, C. *In vivo* formation of 8-epi-prostaglandin-F2a and platelet activation in diabetes *mellitus*. Effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. **Circulation**, v. 99, p.224-229, 1999.

DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 15, p. 316-328, 2005.

DEVARAJ, S.; HIRANY, S. V.; BURK, R. F.; JIALAL, I. Divergence between LDL Oxidative Susceptibility and Urinary F2-Isoprostanes as Measures of Oxidative Stress in Type 2 Diabetes. **Clinical Chemistry**, v. 47, n. 11, p. 1974-1979, 2001.

DHINGRA, S.; SINGH, U.; BANSAL, M. P. Effect of selenium depletion and supplementation on the kinetics of Type-I 5'-iodothyronine deiodinase and T3/T4 in rats. **Biological Trace Element Research**, v. 97, p. 95-104, 2004.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.

DU, X.; MATSUMURA, T.; EDELSTEIN, D.; ROSSETTI, L.; ZSENGELLER, Z.; SZABO, C.; BROWNLEE, M. Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, p. 1049-1057, 2003.

- DU, X. L.; EDELSTEIN, D.; ROSSETTI, L.; FANTUS, I. G.; GOLDBERG, H.; ZIYADEH, F.; WU, J.; BROWNLEE, M: Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p. 12222–12226, 2000.
- DUMONT, E.; DE PAUW, L.; VANHAECKE, F.; CORNELIS, R. Speciation of Se in *Bertholletia excelsa* (Brazil nut): A hard nut to crack. **Food Chemistry**, v. 95, p. 684-92, 2006.
- DUNNING, B. E.; FOLEY, J. E.; AHRÉN, B. Alpha cell function in health and disease: influence of glucagon-like peptide-1. **Diabetologia**, v. 48, p. 1700–1713, 2005.
- DUNTAS, L. H. Selenium and inflammation: underlying anti-inflammatory mechanisms. **Hormone and Metabolic Research**, v. 41, p. 443-447, 2009.
- ELENKOV, I. J.; IEZZONI, D. G.; DALY, A.; HARRIS, A. G.; CHROUSOS, G. P. Cytokine dysregulation, inflammation and well-being. **Neuroimmune modulation**, v. 12, p. 255-269, 2005.
- ERBAYRAKTAR, Z.; YILMAZ, O.; ARTMANN, A. T.; CEHRELI, R.; COKER, CANAN. Effects of Selenium Supplementation on Antioxidant Defense and Glucose Homeostasis in Experimental Diabetes *Mellitus*. **Biological Trace Element Research**, v. 118, p. 217–226, 2007.
- ERLICH, H.; VALDES, A. M.; NOBLE, J.; CARLSON, J. A.; VARNEY, M.; CONCANNON, P.; MYCHALECKYJ, J. C.; TODD, J. A.; BONELLA, P.; FEAR, A. L.; LAVANT, E.; LOUEY, A.; MOONSAMY, P. HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. **Diabetes**, v. 57, p. 1084-1092, 2008.
- ESTADOS UNIDOS. Institute of Medicine/Food Nutrition Board. Introduction to dietary reference intakes. In: **Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients)**. Washington, DC, 2005. Disponível em: <http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=10490>. Acesso em: 23 de junho de 2009.
- ESTADOS UNIDOS. Institute of Medicine/Food Nutrition Board. Introduction to dietary reference intakes. In.: **Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids**, cap.1, p. 21-34, 2000. Disponível em: <http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=9810#toc>. Acesso em: 23 de junho de 2009.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **Scientific opinion of the panel on food additives,flavourings, processing aids and materials in contact with food(AFC) on a request from the commission on selenium-enriched yeast as a source for selenium**. EFSA Journal, v. 766, p.1-43, 2008.

EVANGELISTA, K. C. M.S. **Efeito da suplementação com minerais antioxidantes em pacientes com aterosclerose tratados com estatinas.** Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES *MELLITUS*. Follow-up report on the diagnosis of diabetes *mellitus*. **Diabetes Care**, v. 26, p. 3160-7, 2003.

EZAKI, O. The insulin-like effects of selenate in rat adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 1124-8, 1990.

FAIRWEATHER-TAIT, S. J.; BAO, Y.; BROADLEY, M. R.; COLLINGS, R.; FORD, D.; HESKETH, J. E.; HURST, R. Selenium in Human Health and Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14, n 7, p. 1337-83, 2011.

FAIRWEATHER-TAIT, S. J.; COLLINGS, R.; HURST, R. Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 91, p. 1484S–91S, 2010.

FAURE, P.; RAMON, O.; FAVIER, A.; HALIMI, S. Selenium supplementation decreases nuclear factor-kappa B activity in peripheral blood mononuclear cells from type 2 diabetic patients. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 34, p. 475-81, 2004.

FAXON, D. P.; FUSTER, V.; LIBBY, P.; BECKMAN, J. A.; HIATT, W. R.; THOMPSON, R. W.; TOPPER, J. N.; ANNEX, B. H.; RUNDBACK, J. H.; FABUNMI, R. P.; ROBERTSON, R. M.; LOSCALZO, J. Atherosclerotic Vascular Disease Conference Writing Group III: pathophysiology. **Circulation**, v. 109, p. 2617-25, 2004.

FERREIRA, K. S.; GOMES, J. C.; BELLATO, C. R.; JORDÃO, C. P. Concentração de selênio em alimentos consumidos no Brasil. **Pan American Journal of Public Health**, v. 11, n. 3, p. 172-7, 2002.

FESTA, A.; D'AGOSTINO, R. J. R.; HOWARD, G.; MYKKANEN, L.; TRACY, R. P.; HAFFNER, S. M. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). **Circulation**, v.102, p.42-7, 2000.

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

FIOTTI, N.; GIANSAnte, C.; PONTE, E.; DELBELLO, C.; CALABRESE, S.; ZACCHI, T.; DOBRINA, A.; GUARNIERI, G. Atherosclerosis and inflammation: patterns of cytokine regulation in patients with peripheral arterial disease. **Atherosclerosis**, v. 145, p. 51-60, 1999.

- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids. **Journal of Biological Chemistry**, v.226, p.497-509, 1957.
- FORD, E. S. Body mass index, diabetes, and C reactive protein among U.S. adults. **Diabetes Care**, v. 22, p. 1971-7, 1999.
- FOSTER, L. H. AND SUMAR, S. A rapid microwave-based digestion method for the determination of selenium in infant formulae by means of hydride generation atomic absorption spectrometry (HGAAS). **Nahrung**, v. 40, p. 154-5, 1996.
- FRAYN, K. N. **Metabolic Regulation: A Human Perspective**. 2^a ed., Oxford: Blackwell Science, 2003.
- FREITAS, J. B.; NAVES, M. M. V. Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 2, p. 269-279, 2010.
- FRIEDWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FRADRIKSON, D. S. Estimation of concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without the use of preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v. 18, p. 494-502, 1972.
- FROHLICH, M.; IMHOF, A.; BERG, G.; HUTCHINSON, W. L.; PEPYS, M. B.; BOEING, H.; MUCHE, R.; BRENNER, H.; KOENIG, W. Association between C-reactive protein and features of the metabolic syndrome: a population-based study. **Diabetes Care**, v. 23, p. 1835-1839, 2000.
- FROJDO, S.; VIDAL, H.; PIROLA, L. Alterations of insulin signaling in type 2 diabetes: A review of the current evidence from humans. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1792, p. 83-92, 2009.
- GEBRE-MEDHIN, M.; EWALD, U.; PLANTIN, L. O.; TUVEMO, T. Elevated serum selenium in diabetic children. **Acta Paediatrica Scandinavica**, v. 73, n. 1, p. 109-114, 1984.
- GERLA, P. J.; SHARIF, M. U.; KOROM, S. F. Geochemical processes controlling the spatial distribution of selenium in soil and water, west central South Dakota, USA. **Environmental Earth Sciences**, v. 62, p. 1551–1560, 2011.
- GHOSH, S. Regulation of inducible gene expression by the transcription factor NF-kappaB. **Immunologic Research**, v. 19, p. 183–189, 1999.
- GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative Stress and Diabetic Complications **Circulation Research**, v. 107, p. 1058-1070, 2010.
- GOLDIN, A.; BECKMAN, J. A.; SCHMIDT, A. M.; CREAGER, M. A. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation**, v. 114, p. 597–605, 2006.

- GONZAGA, I. B. **Avaliação nutricional relativa ao selênio em crianças com dieta enriquecida de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*, L.)**. São Paulo, 2002, 115 p. (Tese de doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo).
- GOOD, J. A. L.; ZIEGLER, W. H.; PAREKH, D. B.; ALESSI, D. R.; COHEN, P.; PARKER, P. J. Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. **Science**, v. 281, p. 2042–2045, 1998.
- GOODGE, K. A.; HUTTON, J. C. Translational regulation of proinsulin biosynthesis and proinsulin conversion in the pancreatic β -cell. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 11, p. 235-242, 2000.
- GOPAUL, N. K.; ANGGARD, E. E.; MALLET, A. I.; BETTERIDGE, D. J.; WOLFF, S. P.; NOUROOZ-ZADEH, J. Plasma 8-epi-PGF2 α levels are elevated in individuals with non-insulin dependent diabetes *mellitus*. **FEBS Lett**, v. 368, p. 225–229, 1995.
- GREENFIELD, J. R.; CAMPBELL, L. V. Relationship between inflammation, insulin resistance and type 2 diabetes: 'cause or effect'? **Current Diabetes Reviews**, v. 22, p. 195-211, 2006.
- GROMADA, J.; BOKVIST, K.; DING, W.; BARG, S.; BUSCHARD, K.; RENSTRÖM, E.; RORSMAN, P. Adrenaline stimulates glucagon secretion in pancreatic A-cells by increasing the Ca₂C current and the number of granules close to the L-type Ca₂C channels. **Journal of General Physiology**, v. 110, p. 217–228, 1997.
- GROMADA, J.; MA, X.; HØY, M.; BOKVIST, K.; SALEHI, A.; BERGGREN, P.; RORSMAN, P. ATP-sensitive KC channel-dependent regulation of glucagon release and electrical activity by glucose in wild-type and SUR1K/K mouse alpha-cells. **Diabetes**, v. 53, suppl. 3, p. S181–S189, 2004.
- GROMADZINSKA, J.; RESZKA, E.; BRUZELIUS, K.; WASOWICZ, W.; AKESSON, B. Selenium and cancer: biomarkers of selenium status and molecular action of selenium supplements. **European Journal of Nutrition**, v. 47, suppl 2, p. S29-S50, 2008.
- HALLIWELL, B.; LEE, C. Y. J. Using Isoprostanes as Biomarkers of Oxidative Stress: Some Rarely Considered Issues. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 13, n. 2, p. 145-156, 2010.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press, p. 543, 1989.

- HANSSON, G. Immune mechanisms in atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.21, p. 1876-1890, 2001.
- HAO, D. Q.; XIE, G. H.; ZHANG, Y. M.; TIAN, G. J. Determination of serum selenium by hydride generation flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 43, p. 595-600, 1996.
- HARTGE, M. M.; UNGER, T.; KINTSCHER, U. The endothelium and vascular inflammation in diabetes. **Diabetes and Vascular Disease Research**, v. 4, p. 84-88, 2007.
- HATADA, E. N.; KRAPPMANN, D.; SCHEIDEREIT, C. NF-kappaB and the innate immune response. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, p. 52–58, 2000.
- HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 67-202, 2002.
- HEI, Y. J.; FARAHBAKHSIAN, S.; CHEN, X.; BATTELL, M. L.; MCNEILL, J. H. Stimulation of MAP kinase and S6 kinase by vanadium and selenium in rat adipocytes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 178, p. 367–375, 1998.
- HELMERSSON, J.; ÄRNLÖV, J.; VESSBY, B.; LARSSON, A.; ALFTHAN, G.; BASU, S. Serum selenium predicts levels of F2-isoprostanes and prostaglandin F2 α in a 27 year follow-up study of Swedish men. **Free Radical Research**, v. 39, n. 7, p. 763-770, 2005.
- HENQUIN, J. C. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. **Diabetes**, v. 49, p. 1751–1760, 2000.
- HERCBERG, S.; BERTRAIS, S.; CZERNICHOW, S.; NOISETTE, N.; GALAN, P.; JAOUEN, A.; TICHET, J.; BRIANCON, S.; FAVIER, A.; MENNEN, L.; ROUSSEL, A. Alterations of the Lipid Profile After 7.5 Years of Low-Dose Antioxidant Supplementation in the SU.VI.MAX Study. **Lipids**, v. 40, p. 335–342, 2005.
- HESKETH, J. Nutrigenomics and selenium: gene expression patterns, physiological targets, and genetics. **Annual Review of Nutrition**, v. 28, p. 157–177, 2008.
- HIRSCH, T.; SUSIN, S. A.; MARZO, I.; MARCHETTI, P.; ZAMZAMI, N.; KROEMER, G. Mitochondrial permeability transition in apoptosis and necrosis. **Cell Biology and Toxicology**, v. 14, p. 141–5, 1998.
- HJORTH, S. A.; ADELHORST, K.; PEDERSEN, B. B.; KIRK, O.; SCHWARTZ, T. W. Glucagon and glucagon-like peptide 1: selective receptor recognition via distinct peptide epitopes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 30121–30124, 1994.
- HUANG, S.; CZECH, M. P. The GLUT4 glucose transporter. **Cell Metabolism**, v. 5, p. 237-252, 2007.

HUANG, Z.; ROSE, A. H.; HOFFMANN, P. R. The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 16, n. 7, 2012.

HUGHES, K.; CHOO, M.; KUPERAN, P.; ONG, C-N.; AW, T-C. Cardiovascular risk factors in non-insulin-dependent diabetics compared to non-diabetic controls: a population-based survey among Asians in Singapore. **Atherosclerosis**, v. 136, n. 1, p. 25-31, 1998.

IKEDA, U.; ITO, T.; SHIMADA, K. Interleukin-6 and acute coronary syndrome. **Clinical Cardiology**, v. 24, p. 701-4, 2001.

IL'YASOVA, D.; SPASOJEVIC, I.; BASE, K.; ZHANG, H.; WANG, F.; YOUNG, S. P.; MILLINGTON, D. S.; D'AGOSTINO JR, R. B.; WAGENKNECHT, L. E. Urinary F2-Isoprostanes as a Biomarker of Reduced Risk of Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 35, n. 1, p.1173-174, 2012.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análises de alimentos**. v.1, 4 ed. Brasília, 2005. 1018p.

IOANNIDIS, I. The road from obesity to type 2 diabetes. **Angiology**, v. 59, p. 39-43, 2008.

JELINEK, L. J.; LOK, S.; ROSENBERG, G. B.; SMITH, R. A.; GRANT, F. J.; BIGGS, S.; BENSCH, P. A.; KUIJPER, J. L.; SHEPPARD, P.O.; SPRECHER, C. A.; O'HARA, P. J.; FOSTER, D.; WALKER, K. M.; CHEN, L. H. J.; MCKERNAN, P. A.; KINDSVOGEL, W. Expression cloning and signaling properties of the rat glucagon receptor. **Science**, v. 259, p. 1614–1616, 1993.

JOHN, J. A.; SHAHIDI, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). **Journal of Functional Foods**, v. 2, p. 196 – 209, 2010.

JOHNSON, J. A.; JOHNSON, D. A.; KRAFT, A. D.; CALKINS, M. J.; JAKEL, R. J.; VARGAS, M. R.; CHEN, P-C. The Nrf2-ARE Pathway: An Indicator and Modulator of Oxidative Stress in Neurodegeneration. **The Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1147, p.61-69, 2008.

JONES, D. P. Redefining Oxidative Stress. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 8, p. 1865-1879, 2006.

JÓZSEF, L.; FILEP, J. G. Selenium-containing compounds attenuate peroxynitrite-mediated NF- κ B and AP-1 activation and interleukin-8 gene and protein expression in human leukocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, p. 1018-1027, 2003.

- KÄHLER, W.; KUKLINSKI, B.; RÜHLMANN, C.; PLÖTZ, C. Diabetes *mellitus*-a free radical-associated disease. Results of adjuvant antioxidant supplementation. **Zeitschrift für die Gesamte Innere Medizin und Ihre Grenzgebiete**, v. 48, n. 5, p. 223-32, 1993.
- KAMATH, V.; RAJINI, P. S. The efficacy of cashew nut (**Anacardium occidentale** L.) skin extract as a free radical scavenger. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p.428-433, 2007.
- KANE, S.; SANO, H.; LIU, S. C. H.; ASARA, J. M.; LANE, W. S.; GARNER, C. C.; LIENHARD, G. E. A method to identify serine kinase substrates. Akt phosphorylates a novel adipocyte protein with a Rab GTPase-activating protein (GAP) domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 22115–22118, 2002.
- KANNAMKUMARATH, S.S.; WROBEL, K.; WROBEL, K.; VONDERHEIDE, A.; CARUSO, J.A. HPLC-ICP-MS determination of selenium distribution and speciation in different types of nut. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 373, p. 454-60, 2002.
- KAUSHAL, N.; GANDHI, U. H.; NELSON, S. M.; NARAYAN, V.; PRABHU, S. **Selenium and Inflammation**. HATFIELD, D.L. *et al.* (eds). In.: Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health. Springer Science+Business Media, 2012. p.443-456.
- KIM, S. H.; JOHNSON, V. J.; SHIN, T.; SHARMA, R. P. Selenium Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Oxidative Stress Responses Through Modulation of p38 MAPK and NF- κ B Signaling Pathways. **Experimental Biology and Medicine**, v. 229, p. 2203-2213, 2004.
- KORNHAUSER, C.; GARCIA-RAMIREZ, J. R.; WROBEL, K.; PÉREZ-LUQUE, E. L.; GARAY-SEVILLA, M. E.; WROBEL, K. Serum selenium and glutathione peroxidase concentrations in type 2 diabetes *mellitus* patients. **Primary Care Diabetes**, v. 2, p. 81-85, 2008.
- KORNSTEINER, M.; WAGNER, K.; ELMADFA, I. Tocopherols and totalphenolics in 10 different nut types. **Food Chemistry**, v. 98, p. 381-387, 2006.
- KRETZ-REMY, C.; MEHLEN, P.; MIRALT, M. E.; ARRIGO, A. P. Inhibition of I kappa B-alpha phosphorylation and degradation and subsequent NF-kappa B activation by glutathione peroxidase overexpression. **Journal of Cell Biology**, v. 133, p. 1083-1093, 1996.
- KRYGIER, K.; SOSULSKI, F.; HOGGER, L. Free, sterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, n. 2, p. 330-334, 1982.
- KRYUKOV, G. V.; CASTELLANO, S.; NOVOSELOV, S. V.; LOBANOV, A. V.; ZEHTAB, O.; GUIGO, R.; GLADYSHEV, V. N. Characterization of mammalian selenoproteomes. **Science**, v. 300, p. 1439-1443, 2003.

- KUO, C. F.; CHENG, S.; BURGESS, J. R. Deficiency of vitamin E and selenium enhances calcium-independent phospholipase A2 activity in rat lung and liver. **Journal of Nutrition**, v.125, n. 6, p. 1419-29, 1995.
- LACLAUSTRA, M.; STRANGES, S.; NAVAS-ACIEN, A.; ORDOVAS, J. M.; GUALLAR, E. Serum selenium and serum lipids in US adults: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003–2004. **Atherosclerosis**, v. 210, p. 643-48, 2010.
- LACLAUSTRA, M.; NAVAS-ACIEN, A.; STRANGES, S.; ORDOVAS, J. M.; GUALLAR, E. Serum selenium concentrations and diabetes in US adults: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003–2004. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, p. 1409–1413, 2009.
- LAMBERT, A. P.; GILLESPIE, K. M.; THOMSON, G.; CORDELL, H. J.; TODD, J. A.; GALE, E. A. M.; BINGLEY, P. J. Absolute risk of childhood-onset type 1 diabetes defined by human leukocyte antigen class II genotype: a population-based study in the United Kingdom. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, p. 4037-4043, 2004.
- LANDS, W. E. M. Biological consequences of fatty acid oxygenase reactions. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Medicine**, v. 13, p. 35-46, 1984.
- LE MARCHAND, S. J., PISTON, D. W. Glucose suppression of glucagon secretion: metabolic and calcium responses from alpha-cells in intact mouse pancreatic islets. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 14389–14398, 2010.
- LEE, O.; MOON, J.; CHUNG, Y. The relationship between serum selenium levels and lipid profiles in adult women. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 49, n. 6, p. 397-1904, 2003.
- LI, Y.; HAN, J.; JIANG, W.; WANG, J. Selenium inhibits high glucose-induced cyclooxygenase-2 and P-selectin expression in vascular endothelial cells. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 4, p. 2301-2306, 2011.
- LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; MASER, A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**, v. 105, p. 1135-43, 2002.
- LIU, Y.J.; VIEIRA, E.; GYLFE, E. A store-operated mechanism determines the activity of the electrically excitable glucagon-secreting pancreatic alpha cell. **Cell Calcium**, v. 35, p. 357–365, 2004.
- MACDONALD, P. E.; MARINIS, Y. Z. DE; RAMRACHEYA, R.; SALEHI, A.; MA, X.; JOHNSON, P. R. V.; COX, R.; ELIASSON, L.; RORSMAN, P. A K_{ATP} channel-dependent pathway within alpha cells regulates glucagon release from both rodent and human islets of Langerhans. **PLoS Biology**, v. 5, p. 1236-1247, 2007.

- MARITIM, A.C.; SANDERS, R. A.; WATKINS III, J.B. Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 17, n.1, p. 24-38, 2003.
- MARTENS, A.; COZZOLINO, S. M. F. **Mapeamento da distribuição de selênio em território brasileiro por meio da análise de alimentos nativos: feijão (FASEOLOS VULGARIS L.) e carne bovina para consumo humano e águas e solos oriundas**. Relatório PROCESSO FAPESP 00/11578-3 VINCULADO AO PROCESSO 00/11699-5, 2002.
- MCLARTY, D. G.; ATHAIDE, I.; BOTTAZZO, G. F.; SWAI, A. M. B.; ALBERTI, K.G.M.M. Islet cell antibodies are not specifically associated with insulin-dependent diabetes in rural Tanzanian Africans. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 9, p. 219-24, 1990.
- MCNEILL, J. H.; DELGATTY, H. L.; BATTELL, M. L. Insulinlike effects of sodium selenate in streptozocin-induced diabetic rats. **Diabetes**, v.40, n. 12, p.1675-1678, 1991.
- MEARS, D. Regulation of insulin secretion in islets of Langerhans by Ca(2+) channels. **Journal of Membrane Biology**, v. 200, n. 2, p. 57-66, 2004.
- MELLO, A. P. Q.; ABDALLA, D. S P.; DAMASCENO, N. R T. Electronegative low-density lipoprotein: Origin and impact on health and disease. **Atherosclerosis**, v. 215, n. 2, p. 257-265, 2011.
- MEOTTI, F. C. **Mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva e antiinflamatória do flavonóide miricitrina: estudos *in vivo* e *in vitro***. Santa Maria, 2006. 131p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica - Universidade Federal de Santa Maria.
- MILLER, H. E. Simplified method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 48, n. 2, p. 91, 1971.
- MOODLEY, R.; KINDNESS, A.; JONNALAGADDA, S. Elemental composition and chemical characteristics of five edible nuts (almond, Brazil, pecan, macadamia and walnut) consumed in Southern Africa. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v.42, p.585-591, 2007.
- MORAES, C. M.; PORTELLA, R. B.; PINHEIRO, V. S.; OLIVEIRA, M.M.S.; FUKS, A. G.; CUNHA, E. F.; GOMES, M.B. Prevalência de Sobrepeso e Obesidade em Pacientes Com Diabetes Tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 47, n. 6, p. 677-83, 2003.
- MOREIRA, A. V. B., MANCINI FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição da PUCCAMP**, v. 17, n. 4, p. 411-424, 2004.

- MORTENSEN, R. F. C-reactive protein, inflammation, and innate immunity. **Immunologic Research**, v. 24, p. 163-76, 2001.
- MUELLER, A. S.; MUELLER, K.; WOLF, N. M.; PALLAUF, J. Selenium and diabetes: an enigma? **Free Radical Research**, v. 43, n. 11, p. 1029-1059, 2009.
- MURROW, B. A.; HOEHN, K. L. Mitochondrial regulation of insulin action. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, p. 1936–1939, 2010.
- MUSSIG, K.; FIEDLER, H.; STAIGER, H.; WEIGERT, C.; LEHMANN, R.; SCHLEICHER, E.D.; HÄRING, H. U. Insulin-induced stimulation of JNK and the PI 3-kinase/mTOR pathway leads to phosphorylation of serine 318 of IRS-1 in C2C12 myotubes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 335, p. 819-25, 2005.
- NATELLA, F.; FIDALE, M.; TUBARO, F.; URSINI, F.; SCACCINI, C. Selenium supplementation prevents the increase in atherogenic electronegative LDL (LDL minus) in the postprandial phase. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 17, n. 9, p. 649-56, 2007.
- NATHAN, D. M. International Expert Committee report on the role of the A_{1c} assay in the diagnosis of diabetes. **Diabetes Care**, v. 32, p. 1327–1334, 2009.
- NAVAB, M.; BERLINER, J. A.; WATSON, A. D.; HAMA, S. Y.; TERRITO, M. C.; LUSIS, A. J.; SHIH, D. M.; VAN LENTEN, B. J.; FRANK, J. S.; DEMER, L. L.; EDWARDS, P. A.; FOGELMAN, A. M. The yin and yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 16, n. 7, p. 831-42, 1996.
- NEGI, G.; KUMAR, A.; JOSHI, R. P.; SHARMA, S. S. Oxidative stress and Nrf2 in the pathophysiology of diabetic neuropathy: Old perspective with a new angle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.408, p.1-5, 2011.
- OBBERGHEN, E. V. Surfing the insulin signaling web. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 31, p. 966–977, 2001.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxide in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 331-358, 1979.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Elementos traço na nutrição e saúde humana**. São Paulo: Roca, p. 63-91, 1998.
- OTTEN, J. J.; PITZI HELLWIG, J.; MEYERS, L. D. (Eds.) **Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements**. Washington DC: National Academies Press, 2006.

OYAIKU, M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. **Japanese Journal of Nutrition**, v. 44, p. 307-315, 1986.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **Journal of Clinical & Laboratory Investigation**, v. 70, p. 158–169, 1967.

PAGMANTIDIS, V.; MEPLAN, C.; VAN SCHOTHORST, E. M.; KEIJER, J.; HESKETH, J. E. Supplementation of healthy volunteers with nutritionally relevant amounts of selenium increases the expression of lymphocyte protein biosynthesis genes. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.87, p.181–189, 2008.

PANEE, J. Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) in obesity and diabetes. **Cytokine**, 2012. doi.org/10.1016/j.cyto.2012.06.018.

PAPP, L. V.; LU, J.; HOLMGREN, A.; KHANNA, K. K. From selenium selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 9, n. 7, p. 775 – 806, 2007.

PICKUP, J. C.; MATTOCK, M. B.; CHUSNEY, G. D.; BURT, D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. **Diabetologia**, v. 40, p. 1286-1292, 1997.

PILLAI, S. S.; SUGATHAN, J. K.; INDIRA, M. Selenium Downregulates RAGE and NFκB Expression in Diabetic Rats. **Biological Trace Element Research**, 2012. DOI 10.1007/s12011-012-9401-1.

PRABHU, K. S.; ZAMAMIRI-DAVIS, F.; STEWART, J. B.; THOMPSON, J. T.; SORDILLO, L. M.; REDDY, C. C. Selenium deficiency increases the expression of inducible nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophages: Role of nuclear factor-kappaB in up-regulation. **Biochemical Journal**, v. 366, p. 203-209, 2002.

PRENTKU, M.; TORNHEIM, K.; CORKEY, B. E. Signal transduction mechanism in nutrient-induced insulin secretion. **Diabetologia**, v. 40, suppl. 2, p. S32-S41, 1997.

PULLEN, N.; DENNIS, P. B.; ANDJELKOVIC, M.; DUFNER, A.; KOZMA, S. C.; HEMMINGS, B. A.; THOMAS, G. Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. **Science**, v. 279, p. 707-710, 1998.

QUESADA, I.; TUDURÍ, E.; RIPOLL, C.; NADAL, A. Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. **Journal of Endocrinology**, v. 199, p. 5-19, 2008.

QUESADA, I.; NADAL, A.; SORIA, B. Different effects of tolbutamide and diazoxide in alpha, beta-, and delta-cells within intact islets of Langerhans. **Diabetes**, v. 48, p. 2390-2397, 1999.

- RAJPATHAK, S.; RIMM, E.; MORRIS, J.S.; HU, F. Toenail selenium and cardiovascular disease in men with diabetes. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 24, p. 250-256, 2005.
- RAVN-HAREN, G.; BUGEL, S.; KRATH, B. N.; HOAC, T.; STAGSTED, J.; JØRGENSEN, K.; BRESSON, J. R.; LARSEN, E. H.; DRAGSTED, L. O. A short-term intervention trial with selenate, selenium-enriched yeast and selenium-enriched milk: effects on oxidative defense regulation. **British Journal of Nutrition**, v. 99, p. 883-892, 2008.
- RAYMAN, M. P. The important of selenium to human health. **Lancet**, v.15, n.356, p.233-241, 2000.
- RAYMAN, M. P.; INFANTE, H. G.; SARGENT, M. Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. **British Journal of Nutrition**, v. 100. p. 238-53, 2008.
- RESZKA, E.; JABLONSKA, E.; GROMADZINSKA, J.; WASOWICZ, W. Relevance of selenoprotein transcripts for selenium status in humans. **Genes & Nutrition**, v.7, p.127-137, 2012.
- RESZKA, E.; GROMADZINSKA, J.; JABLONSKA, E.; WASOWICZ, W.; JABLONOWSKI, Z.; SOSNOWSKI, M. Level of selenoprotein transcripts in peripheral leukocytes of patients with bladder cancer and healthy individuals. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.47, p.1125-1132, 2009.
- RIBEIRO, A. L. T.; SHIMADA, A. L. B.; HEBEDAA, C. B.; OLIVEIRA, T. F.; LOUREIRO, A. P. M.; PEREIRA-FILHO, W. R.; SANTOS, A. M. A.; LIMA, W. T.; FARSKY, S. H. P. *In vivo* hydroquinone exposure alters circulating neutrophil activities and impairs LPS-induced lung inflammation in mice. **Toxicology**, v. 288, p.1-7, 2011.
- ROCHA, A.V. **Estado nutricional relativo ao selênio de crianças residentes em duas localidades de Rondônia, Amazônia Ocidental**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- ROMERO, D. C.; BLANCO, L. F.; SÁNCHEZ, P. H.; RODRÍGUEZ, E.; MAJEM, L. S. Serum selenium concentration in a representative sample of the Canarian population. **Science of the Total Environment**, v. 269, p. 65-73, 2001.
- RORSMAN, P. The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: na electrophysiologist's viewpoint. **Diabetologia**, v. 40, p. 487-495, 1997.
- ROS, E.; MATAIX, J. Fatty acid composition of nuts – implications for cardiovascular health. **British Journal of Nutrition**, v. 96, Suppl. 2, p. S29-S35, 2006.

- RUIZ, C.; ALEGRÍA, A.; BARBERÁ, R.; FARRÉ, R.; LAGARDA, M. J. Selenium, zinc and copper in plasma of patients with Type 1 diabetes *mellitus* in different metabolic control states. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 12, p. 91-95, 1998.
- RYAN, E.; GALVIN, K.; O'CONNOR, T. P.; MAGUIRE, A. R.; O'BRIEN, N. M. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of brazil, pecan, pine, pistachio and cashew nuts. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 57, n. 3, p. 219-228, 2006.
- SABÉ, A. R.; RUBIO, A.; GARCÍA-BELTRÁN, L. Determination of selenium in human blood specimens by electrothermal atomic absorption. **Analytica Chimica Acta**, v. 419, p. 121-35, 2000.
- SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, p. 799-806, 2001.
- SAMBROOK, J.; GETHING, M. J. Protein structure. Chaperones, paperones. **Nature**, v. 342, p. 224-225, 1989.
- SÁNCHEZ-QUESADA, J. L.; PEREZ, A.; CAIXAS, A.; RIGLA, M.; PAYES, A.; BENITEZ, S.; ORDONEZ-LLANOS, J. Effect of glycemic optimization on electronegative low-density lipoprotein in diabetes: relation to nonenzymatic glycosylation and oxidative modification. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.86, p. 3243-3249, 2001.
- SANO, H.; KANE, S.; SANO, E.; MÎINEA, C. P.; ASARA, J. M.; LANE, W. S.; GARNER, C. W.; LIENHARD, G.E. Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 14599-14602, 2003.
- SCHNABEL, R.; LUBOS, E.; MESSOW, C. M.; SINNING, C. R.; ZELLER, T.; WILD, P. S.; PEETZ, D.; HANDY, D.E.; MUNZEL, T.; LOSCALZO, J.; LACKNER, K. J.; BLANKENBERG, S. 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, p. 1201-1211, 2008.
- SCHNELL, A. H.; SWENNE, I.; BORG, L. A. Lysosomes and pancreatic islet function. A quantitative estimation of crinophagy in the mouse pancreatic B-cell. **Cell and Tissue Research**, v. 252, p. 9-15, 1988.
- SENGUPTA, A.; CARLSON, B. A.; HOFFMANN, V. J.; GLADYSHEV, V. N.; HATFIELD, D. L. Loss of housekeeping selenoprotein expression in mouse liver modulates lipoprotein metabolism. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 365, p. 446-452, 2008.

- SHAHIDI, F.; ALASALVAR, C.; LIYANA-PATHIRANA, C. M. Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut byproduct. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.1212-1220, 2007.
- SHAW, J. E.; SICREE, R. A.; ZIMME, P.Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 87, p. 4-14, 2010.
- SHEN, X.; ZHENG, S.; METREVELI, N. S.; EPSTEIN, P. N. Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy. **Diabetes**, v. 55, p. 798–805, 2006.
- SHENG, X.; HUANG, K.; XU, H. New experimental observation on the relationship of selenium and diabetes *mellitus*. **Biological Trace Element Research**, v. 99, p. 241-253, 2004.
- SHOELSON, S.E.; LEE, J.; GOLDFINE, A.B. Inflammation and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 7, p. 1793-801, 2006.
- SIGULEM, D. M.; VEIGA, V. G.; PRIORE, S.E. **Obesidade em adolescentes de baixa renda**. In: FISBERG, M. Obesidade na infância e na adolescência. São Paulo: Fundo Editorial Byk; 1995. p. 80-3.
- SILVA, V. L. Avaliação do estado nutricional relativo ao selênio de mulheres idosas não institucionalizadas. **Efeito De uma dieta enriquecida com castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*, L.) no estado nutricional relativo ao selênio de idosos não institucionalizados**. São Paulo, 2002. 77 p. (Dissertação de mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo).
- SINDHU, R. K.; KOO, J.; ROBERTS, C. K.; VAZIRI, N. D. Dysregulation of hepatic superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in diabetes: response to insulin and antioxidant therapy. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 26, n. 1, p. 43-53, 2004.
- SIRIWARDHANA, S. S. K. W.; SHAHIDI, F. Antiradical activity of extracts of almond and its by-products. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 79, p. 903-908, 2002.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose**. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arquivos Brasileiro de Cardiologia, n. 88, Suplemento 1, 2007.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. 3ª ed., Itapevi: A. Araújo Silva Farmacêutica, 2009. 400p.

- SOMWAR, R.; PERREAULT, M.; KAPUR, S.; TAHA, C.; SWEENEY, G.; RAMLAL, T.; KIM, D. Y.; KEEN, J.; CÔTE, C. H.; KLIP, A.; MARETTE, A. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha and beta by insulin and contraction in rat skeletal muscle: potential role in the stimulation of glucose transport. **Diabetes**, v. 49, p. 1794-1800, 2000.
- SPAGNOLO, A.; MORISI, G.; MARANO, G.; RIGHETTI, G.; MAIETTA, A.; MENOTTI, A. Serum selenium and precursors of cardiovascular risk factors in adolescents. **European Journal of Epidemiology**, v. 7, n. 6, p. 654-657, 1991.
- SRIVASTAVA, A. K.; PANDEY, S. K. Potential mechanism(s) involved in the regulation of glycogen synthesis by insulin. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 182, p. 135-41, 1998.
- STEGHENS, J. P.; KAPPEL, A. L. V.; DENIS, I.; COLLOMBEL, C. Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n. 2, p. 242-249, 2001.
- STEINBRENNER, H.; SPECKMANN, B.; PINTO, A.; SIES, H. High selenium intake and increased diabetes risk: experimental evidence for interplay between selenium and carbohydrate metabolism. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 48, n. 1, p. 40-45, 2011.
- STEPHENS, L.; ANDERSON, K.; STOKOE, D.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; PAINTER, G. F.; HOLMES, A. B.; GAFFNEY, P. R.; REESE, C. B.; MCCORMICK, F.; TEMPST, P.; COADWELL, J.; HAWKINS, P. T. Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5- trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. **Science**, v. 279, p. 710-714, 1998.
- STITH, J. L. R. Endocrine and carbohydrate responses to interleukin-6 *in vivo*. **Circulatory Shock**, v. 44, p. 210-215, 1994.
- STOCKLER-PINTO, M. B.; MAFRA, D.; FARAGE, N. E.; BOAVENTURA, G.T.; COZZOLINO, S. M. Effect of Brazil nut supplementation on the blood levels of selenium and glutathione peroxidase in hemodialysis patients. **Nutrition**, v. 26, p. 1065-9, 2010.
- STRANGES, S.; LACLAUSTRA, M.; JI, C.; CAPPUCCIO, F.P.; NAVAS-ACIEN, A.; ORDOVAS, J.M.; RAYMAN, M.; GUALLAR, E. Higher selenium *status* is associated with adverse blood lipid profile in British adults. **Journal of Nutrition**, v. 140, p. 81–87, 2010.
- STRUNZ, C. C.; OLIVEIRA, T. V.; VINAGRE, J. C. N.; LIMA, A.; COZZOLINO, S.; MARANHÃO, R. C. Brazil nut ingestion increased plasma selenium but had minimal effects on lipids, apolipoproteins, and high-density lipoprotein function in human subjects. **Nutrition Research**, n. 28, p. 151-155. 2008.

- SUNDE, R. A.; PATERSON, E.; EVENSON, J. K.; BARNES, K. M.; LOVEGROVE, J. A.; GORDON, M.H. Longitudinal selenium status in healthy British adults: assessment using biochemical and molecular biomarkers. **British Journal of Nutrition**, v. 99, suppl 3, p. S37–S47, 2008.
- SUZUKI, K. T.; KURASAKI, K.; OKAZAKI, N.; OGRA, Y. Selenosugar and trimethylselenonium among urinary selenium metabolites: dose- and age-related change. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 206, p. 1-8, 2005.
- SWAIN, T., HILLS, W. E. The phenolic constituents of *Punns domestica*. I-quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 19, p. 63-68, 1959.
- TARASOV, A.; DUSONCHET, J.; ASHCROFT, F. Metabolic regulation of the pancreatic β -cell ATP-sensitive K^+ channel: a pas de deux. **Diabetes**, v. 53, Suppl. 3, p. S113-122, 2004.
- TAYLOR, R. W.; JONES, I. E.; WILLIAMS, S. M.; GOULDING, A. Evaluation of waist circumference, waist-to-hip ratio, and the conicity index as screening tools for high trunk fat mass, as measured by dual-energy X-ray absorptiometry, in children aged 3–19 y. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 72, p. 490-495, 2000.
- THOMSON, C. D.; BURTON, C. E.; ROBINSON, M. F. On supplementing the selenium intake of New Zealanders. 1. Short experiments with large doses of selenite or selenomethionine. **British Journal of Nutrition**, v. 39, p. 579-87, 1978.
- TSIGOS, C.; PAPANICOLAOU, D. A.; KYROU, I.; DEFENSOR, R.; MITSIADIS, C. S.; CHROUSOS, G.P. Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on glucose regulation. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.82, p.4167-4170, 1997.
- UNGER, R. H. The Banting Memorial Lecture 1975. Diabetes and the alpha cell. **Diabetes**, v. 25, p. 136-151, 1976.
- UTOMO, A.; JIANG, X.; FURUTA, S.; YUN, J.; LEVIN, D. S.; WANG, Y. C.; DESAI, K. V.; GREEN, J. E.; CHEN, P.L.; LEE, W.H. Identification of a novel putative non-selenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential for alleviating oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p.43522-43529, 2004.
- VACA, C. E.; WILHEM, J.; HARMS-RINGDAHL, M. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. **Mutation Research**, v.195, p.137-149, 1988.
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p. 44-84, 2007.

- VAN DAEL, P.; DEELSTRA, H. Selenium. **International Journal for Vitamin and Nutrition**, v. 63, p.312-316, 1993.
- VANHAESEBROECK, B.; ALESSI, D. R. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. **Biochemical Journal**, v. 346, p. 561–576, 2000.
- VENKATACHALAM, M.; SATHE, S. K. Chemical Composition of Selected Edible Nut Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, n.13, p. 4705-4714, 2006.
- VERGE, C.F.; STENGER, D.; BONIFACIO, E.; COLMAN, P. G.; PILCHER, C.; BINGLEY, P. J.; EISENBARTH, G. S. Combined use of autoantibodies (IA-2 autoantibody, GAD autoantibody, insulin autoantibody, cytoplasmic islet cell antibodies) in type 1 diabetes: Combinatorial Islet Autoantibody Workshop. **Diabetes**, v. 47, p. 1857-1866, 1998.
- VIEIRA, E.; SALEHI, A.; GYLFE, E. Glucose inhibits glucagon secretion by a direct effect on mouse pancreatic alpha cells. **Diabetologia**, v. 50, p. 370–379, 2007.
- VONDERHEIDE, A. P.; WROBEL, K.; KANNAMKUMARATH, S. S.; B'HYMER, C.; MONTES-BAYOÄ, M.; DE LEOÄ, C. P.; CARUSO, J. A. Characterization of Selenium Species in Brazil Nuts by HPLC–ICP-MS and ES-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5722-5728, 2002.
- VUNTA, H.; BELDA, B. J.; ARNER, R. J.; CHANNA REDDY, C.; VANDEN HEUVEL, J. P.; SANDEEP PRABHU, K. Selenium attenuates pro-inflammatory gene expression in macrophages. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, p. 1316-1323, 2008.
- VUNTA, H.; DAVIS, F.; PALEMPALLI, U. D.; BHAT, D.; ARNER, R. J.; THOMPSON, J. T.; PETERSON, D. G.; REDDY, C. C.; PRABHU, K. S. The anti-inflammatory effects of selenium are mediated through 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p.17964-17973, 2007.
- WAGNER, A. M.; ORDONEZ-LLANOS, J.; JORBA, O.; PEREZ, A. Predictors of change in low-density lipoprotein size during lipid-lowering treatment in type 2 diabetes. **Metabolism**, v.53, p. 1516, 2004.
- WALKER, J. N.; RAMRACHEYA, R.; ZHANG, Q.; JOHNSON, P. R.; BRAUN, M.; RORSMAN, P. Regulation of glucagon secretion by glucose: paracrine, intrinsic or both? **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 13, suppl. 1, p. 95-105, 2011.
- WARD, N. C.; WU, J. H.; CLARKE, M.W.; PUDDEY, I. B.; BURKE, V.; CROFT, K. D.; HODGSON, J. M. The effect of vitamin E on blood pressure in individuals with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Journal of Hypertension**, v.25, p. 227-234, 2007.

WAUTIER, J. L.; SCHMIDT, A. M. Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction. **Circulation Research**, v. 95, p. 233-238, 2004.

WHITE, M. F. IRS proteins and the common path to diabetes. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 283, p. E413-422, 2002.

WHITING, P. H.; KALANSOORIYA, A.; HOLBROOK, I.; HADDAD, F.; JENNINGS, P. E. The relationship between chronic glycaemic control and oxidative stress in type 2 diabetes *mellitus*. **British Journal of Biomedical Science**, v. 65, n. 2, p. 71-74, 2008.

WILLET, W.C. Issues in analysis and presentation of dietary data. In: _____. **Nutritional epidemiology**. 2.ed. New York: Oxford University Press, 1998. p.321-345. (Monographs in epidemiology and biostatistics, v.30).

WOODS, S.; LUTZ, T. A.; GEARY, N.; LANGHANS, W. Pancreatic signals controlling food intake; insulin, glucagon and amylin. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 361, p. 1219-1235, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. DE ONIS, M.; ONYANGO, A.W.; BORCHI, E.; SIYAM, A.; NISHIDA, C.; SIEKMANN, J. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 85, p. 660-7, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity: preventing and managing the global epidemic**. Report of a WHO Consultation (WHO Technical Report Series 894), 2000. 252p.

WU, J. H.; WARD, N. C.; INDRAWAN, A. P.; ALMEIDA, C. A.; HODGSON, J. M.; PROUDFOOT, J. M.; PUDDEY, I. B.; CROFT, K. D. Effects of alpha-tocopherol and mixed tocopherol supplementation on markers of oxidative stress and inflammation in type 2 diabetes. **Clinical Chemistry**, v. 53, p. 511-519, 2007.

WU, X.; BEECHER, G. R.; HOLDEN, J. M.; HAYTOWITZ, D. B.; GEBHARDT, S. E.; PRIOR, R. L. Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4026-4037, 2004.

XUN, P.; LIU, K.; MORRIS, J. S.; DAVIGLUS, M. L.; HE, K. Longitudinal association between toenail selenium levels and measures of subclinical atherosclerosis: The CARDIA trace element study. **Atherosclerosis**, v. 210, n. 2, p. 662-667, 2010.

YANG, J.; LIU, R. H.; HALIM, L. Antioxidant and antiproliferative activities of common edible nut seeds. **Food Science & Technology Lebensmittel-Wissenschaft-Tech**, v. 42, p. 1-8, 2009.

Referências

ZAMAMIRI-DAVIS, F.; LU, Y.; THOMPSON, J. T.; PRABHU, K.S.; REDDY, P. V.; SORDILLO, L. M.; REDDY, C.C. Nuclear factor- κ B mediates over-expression of cyclooxygenase-2 during activation of RAW 264.7 macrophages in selenium deficiency. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, p. 890-897, 2002.

ZENG, J.; ZHOU, J.; HUANG, K. Effect of selenium on pancreatic proinflammatory cytokines in streptozotocin-induced diabetic mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, p. 530-536, 2009.

ZHANG, F.; YU, W.; HARGROVE, J. L.; GREENSPAN, P.; DEAN, R. G.; TAYLOR, E. W.; HARTLE, D. K. Inhibition of TNF- α induced ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression by selenium. **Atherosclerosis**, v. 161, p. 381-386, 2002.

ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/26/2011

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto "Avaliação do efeito dos compostos fenólicos do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre a inflamação e atividade/expressão das enzimas antioxidantes de ratos diabéticos." (Protocolo CEUA/FCF/307), de responsabilidade da pesquisadora **Ana Mara de Oliveira e Silva** sob a orientação do Prof. Dr. Jorge Mancini Filho, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 14 de março de 2011.

São Paulo, 15 de março de 2011.

Profa. Dra. Vladi Olga Consiglieri
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – FCF/USP
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DOS ALIMENTOS

FICHA DE CADASTRAMENTO

Nº _____

GRUPO: _____

Identificação

Nome: _____ Data: ____/____/____

DN: ____/____/____ Idade: ____ anos Naturalidade: _____

Escolaridade: _____

Escolaridade da mãe: _____ Escolaridade do pai: _____

Renda Familiar: () até 10 SM () De 10 a 20 SM () Acima de 20 SM

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____

CEP: _____ - _____ Telefones: _____

História Clínica

a) Antecedentes familiares:

() Diabetes *mellitus* () Dislipidemias () Hipertensão arterial () Obesidade () Doença Renal
() Outras: _____

b) Presença de Doenças? S () N ()

() Artrite reumatóide () Hipertensão Arterial () Doença Renal () Hipotireoidismo
() Febre ou processo inflamatório Outras: _____

Tempo de doença (Diabetes *Mellitus*): _____

c) Uso de Medicamentos: S () N () Qual? _____

d) Uso de suplemento vitamínico-mineral? () S () N Qual? _____

e) Pratica alguma atividade física? () S () N

Qual? _____ Frequência/intensidade: _____

f) Faz uso de bebida alcoólica? () S () N

Qual? _____ Quanto/Frequência: _____

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Grupo Suplementado)

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

1. Nome do Paciente:.....
 Documento de Identidade Nº :..... Sexo: () M () F
 Data de Nascimento:...../...../.....
 Endereço:..... Nº:..... Apto:.....
 Bairro:..... Cidade:.....
 CEP:..... Telefone:.....
 2. Responsável Legal:.....
 Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):.....
 Documento de Identidade Nº:..... Sexo: () M () F
 Data de Nascimento:...../...../.....
 Endereço:..... Nº:..... Apto:.....
 Bairro:..... Cidade:..... CEP:..... Tel:.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

Caro Senhor(a) responsável pelo(a) adolescente, pedimos sua autorização para que o(a) mesmo possa participar como voluntário(a) da pesquisa, cujo título é **“Efeito da suplementação com castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) na expressão de citocinas Inflamatórias e sua relação com o estresse oxidativo em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1”**. Este estudo está sendo conduzido pela estudante de Doutorado em Ciência dos Alimentos, Liliane Viana Pires, sob orientação da Profa. Dra. Sílvia Maria Franciscato Cozzolino, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. A participação do adolescente terá duração de três meses e, esta pesquisa é considerada de risco mínimo.

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

No diabetes *mellitus* existem muitas alterações que afetam o equilíbrio e o bom desenvolvimento dos pacientes que estão com esta doença. Devido a isso, este estudo tem como objetivo avaliar o estado nutricional relativo ao mineral chamado de selênio, que pode ser importante para diminuir estas alterações. A castanha-do-Brasil é um alimento muito rico em selênio, os participantes do estudo deverão consumir 01 nóz de castanha por dia durante três meses. A pesquisa contará com 50 adolescentes tanto do sexo masculino quanto do feminino, com idade entre 10 e 18 anos, voluntários com diabetes *mellitus* tipo 1. Serão realizadas análises no sangue, na urina e na alimentação, para avaliar o mineral selênio. Também, serão realizados

exames no sangue e urina para avaliar substâncias que aumentam o risco do desenvolvimento das complicações tardias do diabetes *mellitus*. Para isso, serão necessárias no início do acompanhamento e após o término do consumo das castanhas-do-Brasil: uma (1) coleta de sangue (15 mL), estando o (a) participante em jejum de no mínimo 12 horas; coletas de urina de um dia inteiro, ou seja, em um frasco fornecido pela pesquisadora o(a) adolescente deverá armazenar toda a urina de 24 horas e manter esse frasco em geladeira até o momento de ser entregue a pesquisadora. Medidas de peso, altura e da circunferência da cintura, também serão obtidas antes e após a suplementação com a castanha. Será necessário que durante três dias (dois dias durante a semana e um dia no final de semana) sejam anotados todos os alimentos consumidos pelo (a) participante, a fim de analisar o consumo de alimentos no início e no final do estudo. Os participantes receberão todas as orientações necessárias para a realização da pesquisa. Na coleta do sangue poderá ocorrer um desconforto, devido à dor da picada da agulha, podendo surgir uma mancha arroxeadada no local, mas logo passa (serão utilizadas seringas e agulhas descartáveis e esterilizadas). Esta pesquisa trará benefícios para a população com diabetes *mellitus* tipo 1, pois existem evidências de que os minerais exercem um efeito protetor no organismo, equilibrando e contribuindo para bom funcionamento do organismo. Além do que, (o)a participante passará por uma avaliação nutricional completa, sem nenhum custo financeiro para a família e, será dada uma orientação quanto à alimentação que deverá ser seguida para a melhora do quadro.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

É direito de cada participante obter os resultados das análises que serão feitas, bem como informações sobre o andamento da pesquisa, procedimentos utilizados, riscos e benefícios relacionados a esta pesquisa, em qualquer fase do estudo, a fim de esclarecer eventuais dúvidas.

Deve ser ressaltado que a participação na pesquisa poderá ser desfeita em qualquer momento que o Sr. (a) achar conveniente, sem nenhum prejuízo à continuidade do tratamento do(a) adolescente.

Os resultados obtidos na pesquisa serão arquivados e mantidos em sigilo, preservando a privacidade de cada participante, conforme ética.

Não haverá nenhuma despesa financeira para o(a) Sr.(a) na participação deste estudo. Também não haverá recompensa financeira relacionada à participação na pesquisa.

V – CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Lillane Viana Pires (Doutoranda do programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da FCF/USP)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas/FCF
Av. Lineu Prestes, 580 – Bloco 14
Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira”
CEP 05508-000 – São Paulo – SP
Telefones: (11) 3091-3625 (Laboratório de Nutrição-Minerais / USP)
(11) 8518-6420

VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

Todas as castanhas-do-Brasil serão fornecidas pela pesquisadora e quando não consumidas deverão ser devolvidas. Qualquer sintoma de mal-estar deverá ser informado a pesquisadora.

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa
ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos dessa pesquisa, favor entrar em contato com: 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, Telefone 3091-3677 – e-mail: cepfcf@usp.br

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Assistência Técnica Acadêmica

PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer CEPFCF/91/2009
Protocolo CEP/FCF/511
CAAE: 0011.0.018.018-09

I – Identificação:

Projeto de Pesquisa:	Efeito da suplementação com castanha-do-Brasil (<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K.) na expressão de citocinas inflamatórias e sua relação com o estresse oxidativo em pacientes com diabetes mellitus tipo 1
Pesquisador Responsável:	Liliane Viana Pires
Orientador:	Profa. Dra. Silvia Maria Franciscato Cozzolino
Instituição:	Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP
Área Temática Especial:	Não se aplica
Patrocinadores:	Laboratório de Nutrição-Minerais e, eventualmente, FAPESP

II - Sumário Geral do Protocolo:

Descreve-se que o selênio reduz o risco de doenças crônicas não transmissíveis como a aterosclerose e o diabetes. Nesta última, sua ação está ainda pouco esclarecida, limitando-se à prevenção de injúrias inflamatórias frequentes em diabéticos atribuível à função antioxidante do mineral por meio da glutathione peroxidase, enzima dependente de selênio. Sabe-se que a castanha-do-Brasil apresenta conteúdo elevado em selênio. Portanto, pretende-se, basicamente, avaliar no projeto eventuais efeitos da suplementação por 3 meses consecutivos com castanha-do-Brasil, da alimentação de diabéticos do tipo 1 com idade entre 11 e 18 anos, em citocinas inflamatórias e sua relação com o estresse oxidativo.

Os objetivos do presente estudo são:

Geral: Avaliar o efeito da suplementação com castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) sobre as citocinas inflamatórias e sua relação com o estresse oxidativo em pacientes com diabetes *mellitus* do tipo 1. **Específicos:** (a) avaliar a composição corporal das pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1. (b) determinar as concentrações de selênio no plasma, eritrócito, urina e unhas antes e após a suplementação com castanha-do-Brasil; (c) avaliar o consumo alimentar das pacientes diabéticas antes e após a suplementação com castanha-do-Brasil; (d) avaliar o estresse oxidativo das participantes do estudo; (e) quantificar as citocinas inflamatórias (IL-6 e IL-10) das pacientes diabéticas e (f) avaliar a expressão gênica das IL-6 e IL-10 antes e após a suplementação com a castanha-do-Brasil.

Tipo de estudo:

Trata-se de estudo longitudinal onde serão constituídos dois grupos de pacientes com diabetes mellitus do tipo 1, um que receberá a suplementação com castanha-do-Brasil e outro sem a suplementação.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS
Assistência Técnica Acadêmica

Descrição da Casuística:

Pretende-se estudar 100 pacientes com diabetes do tipo 1 e idade entre 10 e 18 anos, e que fazem acompanhamento clínico na endocrinologia da UNIFESP. Espera-se realizar duas (02) colheitas de sangue (15 mL cada em jejum e urina), uma no início do estudo e outra após 3 meses. Nessas duas etapas pretende-se também avaliar a composição corporal por meio de avaliação antropométrica (peso, estatura, índice de massa corpórea, circunferência da cintura) e impedância bioelétrica. Será também determinado o consumo alimentar por meio de método do registro alimentar de 3 dias. Serão avaliados: glicemia; lipidograma; concentrações de selênio no plasma, eritrócitos e na urina; atividade da glutathione peroxidase no eritrócito; concentração plasmática de malondialdeído (MDA); presença de autoanticorpos anti-LDL eletronegativa; concentração de isoprostanos na urina; quantificação de IL-6, IL-10 e proteína C reativa no soro, bem como avaliação da expressão gênica de IL-6, IL-10 e proteína C reativa a partir de plasma.

Os critérios de inclusão dos participantes são:

Presença de diabetes *mellitus* tipo 1 e faixa etária entre 10 e 18 anos; a ausência de doenças que interfiram no estado nutricional relativo ao selênio, tais como artrite reumatóide, câncer, insuficiência renal crônica, disfunções da tireóide e alteração inflamatória aguda; a não utilização de suplementos vitamínico-minerais e de medicamentos que interfiram com o perfil bioquímico do selênio.

III – Situação do Projeto: APROVADO em reunião de 3 de agosto de 2009.

Cabe ao pesquisador:

- Comunicar ao CEP:
 - a ocorrência de efeitos colaterais e ou de reações não esperadas;
 - eventuais modificações no projeto aguardando a apreciação e aprovação do CEP;
 - a interrupção do projeto.
- Apresentar relatórios: parcial (após 50% da execução do projeto) e final.

São Paulo, 4 de agosto de 2009.

Profa. Dra. Mariza Landgraf
Vice-Coordenadora em exercício
Comitê de Ética em Pesquisa CEP/FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - FCF/USP
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DOS ALIMENTOS

AVALIAÇÃO NUTRICIONAL

--ANTROPOMETRIA--

Data: ____/____/____

Nome: _____ Nº: _____

DN: ____/____/____ Idade: ____ anos Grupo: _____

(Tempo O - TO)

DADOS ANTROPOMÉTRICOS:

Estatura _____ cm Peso _____ kg CC: _____ cm

IMC (kg/m^2): _____ Classificação: _____

BIOIMPEDÂNCIA

% massa gordura: ____/____/____

Peso de gordura (kg): ____/____/____

Taxa de metabólica basal (TMB): ____/____/____

Peso massa magra (kg): ____/____/____

Taxa de água do corpo (L): ____/____/____

% do peso do corpo: ____/____/____ (% de massa magra)

Bioresistência (OHMS): ____/____/____ Reactância (OHMS): ____/____/____

OBSERVAÇÕES:

ACOMPANHAMENTO NUTRICIONAL

Nome: _____

☐ Grupo: _____ HP: _____

Responsável: Nutricionista Liliane Viana Pires
 RP USP: 5507230
 Telefone: (11) 8678-4420

RECOMENDAÇÕES

No diabetes mellitus existem muitas alterações que afetam o equilíbrio e o bom desenvolvimento dos pacientes que estão com esta doença. O tratamento do paciente com diabetes mellitus tipo 1 inclui terapia nutricional, plano de atividade física e insulinoterapia.

Devido a isso, este acompanhamento tem como objetivo avaliar o estado nutricional relativo ao mineral chamado de selênio, que pode ser importante para diminuir as alterações metabólicas inerentes a doença.

Para isso, é muito importante que todas as recomendações e orientações prestadas durante o acompanhamento nutricional sejam atendidas.

Liliane Viana Pires
 Doutorado em Clínica das Alérgias - FAPESP

São Paulo/SP - 2010

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

1. Nome do Paciente: _____

Documento de Identidade Nº: _____ Sexo: ☐ M ☐ F

Data de Nascimento: ____/____/____

Endereço: _____ Nº: _____ Apto: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

CEP: _____ Telefone: _____

2. Responsável Legal: _____

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.): _____

Documento de Identidade Nº: _____ Sexo: ☐ M ☐ F

Data de Nascimento: ____/____/____

Endereço: _____ Nº: _____ Apto: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

CEP: _____ Telefone: _____

INDICAÇÕES QUANTO À OBTENÇÃO DE URINA DE 24 HORAS

A obtenção da urina será realizada em um frasco plástico com capacidade de 2 litros sem conservantes e deverá ser mantido **SEMPRE em geladeira** até na hora da entrega.

A urina deverá ser obtida da seguinte forma:

- ➡ Pela manhã, ao acordar, o participante irá **desprezar a primeira urina** no sanitário, ou seja, não deverá guardá-la no frasco;

- ➡ A partir da **segunda urina** todas deverão ser **guardadas** no frasco **até a primeira urina do dia seguinte**.

ORIENTAÇÕES QUANTO AO REGISTRO DOS ALIMENTOS

1. Anotar todos os alimentos consumidos durante todo o dia e a noite, desde a hora que acordar até a hora em que for dormir;
2. Colocar o horário das refeições;
3. Não se esquecer de anotar os alimentos e/ou qualquer guloseima consumida (balas, chicletes, etc.) durante as refeições e nos intervalos;
4. Anotar a quantidade do alimento consumido, na forma de medidas caseiras, como por exemplo (vide ilustração páginas 6 e 7):
 - Colher de servir; colher de sopa; colher de sobremesa; colher de chá ou café;
 - Concha; escumadeira; copo americano; copo de requeijão; copo descartável de 180 mL ou 200 mL;
 - Xícara de chá ou café;
 - Prato de mesa; prato de sopa; prato de sobremesa ou pires;
5. Descrever com o maior detalhe os tipos de alimentos ou marcas, como por exemplo:
 - Leite desnatado, integral, tipo C, em pó, etc.;
 - Pão francês, integral, de forma, de leite, de batata, de mel, doce ou caseiro, etc.;

4

- Bolachas recheadas, água e sal, chocolate sem recheio, SEMPRE colocar o sabor e a marca, etc.;
 - Frutas (anotar o tipo e o tamanho), por exemplo: laranja lima média; meia unidade de mamão papaya;
 - Vegetais folhosos (anotar o tipo e a preparação), por exemplo: acelga refogada ou crua;
 - Manteiga ou margarina (o tipo, a marca, a quantidade consumida anotada em pontas de faca ou em colheres de chá, café, sobremesa ou sopa);
 - Salada de frutas (colocar o tipo de frutas e os ingredientes incluídos na salada);
 - Bolo (sabor, com ou sem recheio, com ou sem cobertura, de festa – se possível, escrever os principais ingredientes).
6. Lembrar de descrever o tipo de preparação: se o alimento é cozido, frito, grelhado, ensopado ou à milanesa (empanado);
 7. Registrar os alimentos em unidades ou porções, como por exemplo, bife médio, pequena; coxa de frango; posta de peixe (pequena, média ou grande);
 8. Anotar preparações que utilizem mais de um ingrediente e descrevê-los um a um: como por exemplo: Sopa de legumes (quais os ingredientes e legumes utilizados nesta preparação).

5

MEDIDAS CASEIRAS

Colocamos ao lado de cada item uma caixa de fósforo ilustrativa, para fins de referência quanto ao tamanho das medidas.

6

MEDIDAS CASEIRAS

Colocamos ao lado de cada item uma caixa de fósforo ilustrativa, para fins de referência quanto ao tamanho das medidas.

7

REGISTRO DE NUMEROS 1

Nome: _____

Data: ____/____/____ Dia da semana: _____

[illegible][illegible]

REGISTRO DE ALUMNOS 2

Nome: _____

Data: ____/____/____ Dia da semana: _____

[illegible][illegible]

REGISTRO DE NUMEROS 3

Nome: _____

Data: ____/____/____ Dia da semana: _____

[illegible][illegible]

Agradecemos a sua colaboração!

Msc. Liãne Viana Pires

(Nutricionista - Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Universidade de São Paulo).

Dra. Silvia M. F. Cozzolino

(Nutricionista - Professora Titular do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental - Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Universidade de São Paulo).

Dra. Ângela Maria Spínola-Castro

(Médica Endocrinologista - Professora adjunta do Departamento de Pediatria/Universidade Federal de São Paulo).

*Entrega o teu caminho ao Senhor, confia Nele, e Ele tudo faz!

(15) $\lambda \in \mathbb{R}$ is a *regular value* of f if $f^{-1}(\lambda)$ is a submanifold of M .