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

**Efeito da suplementação com castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*
H.B. K) como fonte de selênio sobre os marcadores de estresse
oxidativo, citocinas inflamatórias e sua relação com o polimorfismo
Pro198Leu no gene da glutathione peroxidase 1 em pacientes com
artrite reumatoide**

KÁTIA RAU DE ALMEIDA CALLOU

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa Titular Silvia Maria Franciscato Cozzolino

São Paulo

2014

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

**Efeito da suplementação com castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K)
como fonte de selênio sobre os marcadores de estresse oxidativo, citocinas
inflamatórias e sua relação com o polimorfismo Pro198Leu no gene da glutathione
peroxidase 1 em pacientes com artrite reumatoide**

KÁTIA RAU DE ALMEIDA CALLOU

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa Titular Silvia Maria Franciscato Cozzolino

São Paulo

2014

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

C163t	Callou, Kátia Rau de Almeida Efeito da suplementação com castanha-do-brasil (<i>Bertholetia excelsa</i> H.B.K) como fonte de selênio sobre os marcadores de estresse oxidativo, citocinas inflamatórias e sua relação com o polimorfismo Pro198Leu no gene da glutathione peroxidase 1 em pacientes com artrite reumatoide / Kátia Rau de Almeida Callou . -- São Paulo, 2014. 120p. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Orientador: Cozzolino, Silvia Maria Franciscato 1. Selênio : Avaliação nutricional : Ciência dos alimentos 2. Nutrigenômica I. T. II. Cozzolino, Silvia Maria Franciscato, orientador. 641.17 CDD

KÁTIA RAU DE ALMEIDA CALLOU

Efeito da suplementação com castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K) como fonte de selênio sobre os marcadores de estresse oxidativo, citocinas inflamatórias e sua relação com o polimorfismo Pro198Leu no gene da glutathione peroxidase 1 em pacientes com artrite reumatoide

COMISSÃO EXAMINADORA

Silvia Maria Franciscato Cozzolino
(Orientadora- Presidente)

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

4º Examinador

São Paulo, março de 2014.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE QUADROS.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. ARTRITE REUMATOIDE: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, FATORES DE RISCO E FISIOPATOLOGIA	13
1.2. SELÊNIO: FUNÇÃO, HOMEOSTASE E ESTADO NUTRICIONAL EM INDIVÍDUOS COM ARTRITE REUMATOIDE	17
1.3. SELÊNIO E SUA RELAÇÃO COM O ESTRESSE OXIDATIVO E CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NA ARTRITE REUMATOIDE.....	24
1.4. POLIMORFISMO NO GENE QUE CODIFICA PARA A GPx1 (Pro198Leu)	28
1.5. INTERVENÇÃO ALIMENTAR COM CASTANHA-DO- BRASIL	30
2. HIPÓTESES EXPERIMENTAIS	33
3. OBJETIVOS.....	34
3.1. GERAL.....	34
3.2. ESPECÍFICOS.....	34
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	35
4.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	35
4.2. SUPLEMENTAÇÃO.....	37
4.3. ANÁLISES PROPOSTAS NO ESTUDO.....	37
4.3.1. AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA.....	37
4.3.1.1. PESO.....	37
4.3.1.2. ESTATURA.....	37
4.3.1.3. ÍNDICE DE MASSA CORPÓREA.....	38

4.3.1.4. IMPEDÂNCIA BIOELÉTRICA	38
4.3.2. AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR	38
4.3.3. COLETA DOS MATERIAIS BIOLÓGICOS E AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA	38
4.3.3.1. SANGUE	38
4.3.3.2. URINA DE 24 HORAS	39
4.3.3.3. CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO	39
4.3.4. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE AVALIAÇÃO DO SELÊNIO	39
4.3.4.1. DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO NO PLASMA, ERITRÓCITOS E URINA	39
4.3.5. AVALIAÇÃO DO GRAU DE ESTRESSE OXIDATIVO	40
4.3.5.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	40
4.3.5.1.1. GLUTATIONA PEROXIDASE	40
4.3.5.1.2. SUPERÓXIDO DISMUTASE	40
4.3.5.1.3. GLUTATIONA PEROXIDASE 1	41
4.3.5.2. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL - MÉTODO ORAC (CAPACIDADE ABSORÇÃO DE RADICAIS DE OXIGÊNIO)	41
4.3.5.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO URINÁRIA DE ISOPROSTANOS (8-ISO PGF2)	42
4.3.5.4. DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS	42
4.3.5.5. DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO PRO198LEU DA ENZIMA GPX1	43
4.3.5.6. EXPRESSÃO GÊNICA DA GPX1	43
4.3.5.7. CARACTERIZAÇÃO DA CASTANHA-DO-BRASIL (BERTHOLLETIA EXCELSA H.B.K.)	44
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1. CARACTERIZAÇÃO DA CASTANHA-DO-BRASIL	48
5.2. ESTUDO DA SUPLEMENTAÇÃO COM CASTANHA-DO-BRASIL EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE	49
5.2.1. PARTICIPANTES	49

5.2.2. AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA.....	54
5.2.3. AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR	56
5.2.4. DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO PRO198LEU NO GENE DA GPX1	60
5.2.5. AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL RELATIVO AO SELÊNIO DAS PARTICIPANTES E SUA RELAÇÃO COM O POLIMORFISMO PRO198LEU.....	63
5.2.6. EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM CASTANHA-DO-BRASIL SOBRE OS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO	79
5.2.7. EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM CASTANHA-DO-BRASIL SOBRE OS MARCADORES INFLAMATÓRIOS.....	86
6. CONCLUSÕES.....	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
ANEXOS.....	119

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma das atividades desenvolvidas na pesquisa.....	36
Figura 2. Distribuição percentual de doenças associadas em pacientes com AR. São Paulo, 2013.....	54
Figura 3. Valores médios de energia total obtidos dos recordatórios alimentares de 24h e de Necessidade Média estimada (EER) segundo as recomendações propostas pelo IOM (2003), antes e após a suplementação com castanha-do-brasil.	58
Figura 4. Valores médios de ingestão de carboidratos, proteínas e lipídeos (%) em relação ao VET, obtidos por meio dos recordatórios alimentares de 24h, antes e após a suplementação com castanha-do-brasil.	59
Figura 5. Distribuição da adequação das pacientes com artrite reumatoide segundo as concentrações plasmáticas de selênio na fase inicial do estudo. São Paulo, 2013.	66
Figura 6. Distribuição da adequação das pacientes com artrite reumatoide segundo as concentrações eritrocitárias de selênio na fase inicial do estudo. São Paulo, 2013.	66
Figura 7. Concentrações de selênio no plasma (A) e eritrócitos (B) antes e após a suplementação com uma unidade de castanha-do-brasil em pacientes com artrite reumatoide. São Paulo, 2013.	67
Figura 8. Distribuição da adequação das pacientes com artrite reumatoide, segundo as concentrações plasmáticas (A) e eritrocitárias (B) de selênio na fase pós-suplementação. São Paulo, 2013.	69
Figura 9. Expressão gênica da GPx1, segundo o tempo de avaliação, de pacientes com artrite reumatoide. São Paulo, 2013.	70
Figura 10. Efeito da suplementação com castanha-do-brasil sobre a expressão gênica da GPx1, segundo o tempo de avaliação e genótipo (Pro/Pro; Pro/Leu; Leu/Leu), em pacientes com artrite reumatoide. São Paulo, 2013.	76
Figura 11. Concentração das substâncias inflamatórias (fibrinogênio, proteína C reativa, IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-2) e anti-inflamatória (IL-10), segundo o tempo de avaliação, de pacientes com AR. São Paulo, 2013.	89
Figura 12. Concentração de moléculas de adesão (VCAM e ICAM e sE-selectina) e do inibidor de plasminogênio ativado-1 (PAI-1), segundo os tempos de avaliação, de pacientes com AR. São Paulo, 2013.	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição centesimal da castanha-do-brasil (<i>Bertholletia excelsa</i>) proveniente de Itacotiara – AM.	49
Tabela 2. Distribuição das pacientes com artrite reumatoide, segundo os aspectos socioeconômicos e clínicos. São Paulo, 2013.	50
Tabela 3. Medicamentos utilizados pelas pacientes com AR. São Paulo, 2013.	53
Tabela 4. Dados antropométricos das pacientes com artrite reumatoide, segundo o tempo de avaliação. São Paulo, 2013.	55
Tabela 5. Valores de ingestão de energia e macronutrientes, segundo o tempo de avaliação.	57
Tabela 6. Distribuição do polimorfismo Pro198Leu no gene que codifica para a GPx1 em mulheres com artrite reumatoide	61
Tabela 7. Frequências genotípicas do SNP Pro198Leu no gene da GPx1 observadas neste estudo em outros grupos populacionais no Brasil. São Paulo, 2013.	62
Tabela 8. Parâmetros bioquímicos para avaliação do estado nutricional relativo ao selênio, de pacientes com artrite reumatoide, segundo o grau de atividade da doença. São Paulo, 2013.	64
Tabela 9. Efeito da suplementação com castanha-do-brasil sobre as concentrações plasmáticas, eritrocitárias e urinárias de selênio, categorizadas de acordo com o genótipo para o SNP Pro198Leu no gene da GPx1 em indivíduos com artrite reumatoide. São Paulo, 2013.	72
Tabela 10. Modelo ajustado para a diferença entre os instantes T1 e T0 da variável selênio eritrócito (ug/L).	74
Tabela 11. Modelo ajustado para a diferença entre os instantes T1 e T0 da variável selênio plasma (ug/L).	75
Tabela 12. Modelo ajustado para a diferença entre os instantes T1 e T0 da variável GPx eritrócito (U/gHb).	75
Tabela 13. Modelo ajustado para a diferença entre os instantes T1 e T0 da variável GPx1.	77
Tabela 14. Marcadores bioquímicos de estresse oxidativo em pacientes com AR na fase inicial do estudo (T0), segundo o grau de atividade da doença. São Paulo, 2013.	80
Tabela 15. Marcadores bioquímicos do estresse oxidativo, segundo o tempo de avaliação, em pacientes com AR. São Paulo, 2013.	81

Tabela 16. Marcadores bioquímicos do estresse oxidativo, segundo o genótipo e o tempo de avaliação, de pacientes com artrite reumatoide. São Paulo, 2013.	84
Tabela 17. Concentração das substâncias inflamatórias (fibrinogênio, proteína C reativa, IL-6, IL-10, TNF- α , IL-1 β , IL-2, VCAM, ICAM, PAI-1), segundo o grau d atividade da doença. São Paulo, 2013.	86
Tabela 18. Diferença da concentração de substâncias inflamatórias (fibrinogênio, proteína C reativa, IL-6, TNF- α , IL-10, IL-1 β , IL-2, VCAM, ICAM, PAI-1, sE-selectina) entre os instantes T1 e T0 e separadas por genótipo, em pacientes com artrite reumatoide. São Paulo, 2013.	92

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Estudos que avaliaram o status de selênio (Se) na artrite reumatoide, no período de 1992 a 2014.....	22

RESUMO

CALLOU, K.R.A. Efeito da suplementação com castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K) como fonte de selênio sobre os marcadores de estresse oxidativo, citocinas inflamatórias e sua relação com o polimorfismo Pro198Leu no gene da glutathione peroxidase 1 em pacientes com artrite reumatoide.

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica, caracterizada por inflamação das articulações e se manifesta por inchaço e incapacidade funcional das mesmas. A patologia da doença envolve a produção excessiva de radicais livres pelos neutrófilos ativados, podendo induzir à peroxidação lipídica nas membranas celulares o que leva ao aumento da inflamação. Nesse sentido, o selênio (principal fonte é a castanha-do-brasil) é um importante fator por diminuir a atividade dos hidroperóxidos por meio da ação da enzima antioxidante glutathione peroxidase (GPx). No entanto, estudos que avaliem a associação do estado nutricional relativo ao selênio em pacientes com AR com os biomarcadores do estresse oxidativo e de inflamação são escassos na literatura. Desse modo, a avaliação do efeito potencial *in vivo* da suplementação com castanha-do-brasil, como fonte de selênio, sobre os parâmetros descritos anteriormente e sua relação com o polimorfismo Pro198Leu no gene da GPx1, em pacientes com artrite reumatoide (AR), vêm a suprir essa lacuna. Inicialmente foi realizada a caracterização da castanha-do-brasil quanto à composição de macronutrientes e teor de selênio. O estudo em pacientes com artrite reumatoide foi de natureza longitudinal. Foram avaliados 46 pacientes com AR, com idade média de $55,2 \pm 10,9$ anos, atendidos no Setor de Reumatologia da Universidade Federal de São Paulo. O estudo foi dividido em duas fases: antes (T0) e após a suplementação (T1) com 1 nóz de castanha-do-brasil. Foi realizada a avaliação da composição corporal e do consumo alimentar. Além disso, foram avaliados parâmetros bioquímicos relativos ao *status* de selênio por espectrofotometria de absorção atômica por geração de hidretos; atividades da GPx e SOD com uso de kits comerciais; concentração da GPx1 por kits comerciais, sua expressão gênica (qRT-PCR) e genotipagem do Pro198Leu no referido gene por PCR em tempo real; determinação de 8-isoprostanos por kit comercial, assim como níveis circulantes de fibrinogênio, proteína C reativa, IL-6, IL-10, TNF- α , IL-1 β , IL-2, VCAM, ICAM, PAI-1 e sE-selectina pelo ensaio ELISA. O genótipo selvagem (Pro/Pro) foi observado em 57,63% das participantes; 35,59% para as heterozigotas para o alelo variante (Pro/Leu) e 6,78% apresentaram os dois alelos variantes. As pacientes com artrite reumatoide apresentaram baixa ingestão de selênio e, após a intervenção, o consumo aumentou significativamente. Em relação ao *status* de selênio, houve um aumento em sua concentração no plasma e eritrócitos após o período de intervenção com castanha-do-brasil, assim como na atividade da GPx, na concentração da GPx1 e em sua expressão gênica. Níveis urinários reduzidos de 8-isoprostano e nenhuma alteração quanto à capacidade antioxidante total plasmática e quanto aos marcadores inflamatórios foram observados após o período de intervenção. Por outro lado, houve um aumento nas concentrações séricas das moléculas de adesão celulares. Portanto, pode-se concluir que a suplementação com castanha-do-brasil mostrou-se efetiva em melhorar o estado nutricional relativo ao selênio dos pacientes e os marcadores de estresse oxidativo, todavia a ingestão de 350 $\mu\text{gSe/dia}$ não foi suficiente para promover uma melhora do quadro inflamatório. Além disso, a presença do polimorfismo Pro198Leu modificou as respostas dos indivíduos CT e TT em relação à suplementação, sendo inferior à dos indivíduos CC.

Palavras-chave: selênio, artrite reumatoide, estresse oxidativo, inflamação.

ABSTRACT

CALLOU, K.R.A. Effect of Brazil-nut supplementation (*Bertholletia excelsa* HBK) as a source of selenium on markers of oxidative stress, inflammatory cytokines and their relationship with the polymorphism Pro198Leu of glutathione peroxidase-1 gene in patients with rheumatoid arthritis.

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease characterized by joint inflammation, manifested by swelling and joint impairment. This pathology involves excessive free radicals production by activated neutrophils leading to lipid peroxidation in cell membranes and increased inflammation. Accordingly, selenium (Brazil-nut as main source) is an important factor reducing hydroperoxides through the improvement of glutathione peroxidase (GPx) activity. However, studies evaluating their association with oxidative stress biomarkers and inflammation in RA patients are scarce. Thus, the assessment of the in vivo potential Brazil nut supplementation on the parameters described above and its relationship to the polymorphism Pro198Leu in GPx1 gene in patients with rheumatoid arthritis, come to fill this gap. First of all, we analysed macronutrients and selenium content in Brazil nut. This is a longitudinal study with 46 RA patients attending rheumatologic treatment at Federal University of São Paulo and whose mean age were 55.2 ± 10.9 years. The present study was carried out by two phases, before and after one Brazil ingestion. We evaluated selenium status by spectrophotometry absorption with hydride generation; body composition, SOD, GPx activities, GPx1 concentration and 8-isoprostane levels, using commercial Kits; gene expression by RT-PCR and genotyping using real time PCR. Besides, inflammatory biomarkers were performed (fibrinogen, C reactive protein, IL-6, IL-10, TNF- α , IL-1 β , IL-2, VCAM, ICAM, PAI-1 e sE-selectin by ELISA). The wild genotype (Pro/Pro) was observed in 57.63% of the participants, 35.59% were heterozygote for variant allele (Pro/Leu) and 6.78% had two variant alleles. Patients with rheumatoid arthritis had low selenium intake and after the intervention, consumption of this element increased significantly. Selenium status increased significantly after Brazil nut ingestion, as well as GPx activity, GPx1 concentration and its gene expression. Reduced urinary levels of 8-isoprostane and no change for total plasma antioxidant capacity and markers for inflammation were observed after the intervention period. On the other hand, there was an increase in serum concentrations of cell adhesion molecules. Therefore, it can be concluded that Brazil-nut supplementation proved to be effective in improving selenium status and markers of oxidative stress in RA patients, however ingestion of 350 $\mu\text{gSe/day}$ wasn't enough to ameliorate inflammation. Besides, the presence of Pro198Leu polymorphisms interfere in supplementation response in CT and TT groups, being less responsive than CC ones.

Key-words: selenium, rheumatoid arthritis, oxidative stress, inflammation

1. INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune caracterizada por inflamação crônica das articulações periféricas, acometendo 0,4 a 1,9% da população adulta. No Brasil, estima-se uma prevalência aproximada de 0,46% (FERNANDES *et al.*, 2011; ALARMANOS; DROSOS, 2005). Alguns fatores, como a ausência de diagnóstico precoce, sua natureza inflamatória sistêmica, risco aumentado de mortalidade devido à predisposição às doenças cardiovasculares e perda da capacidade funcional das articulações, a tornaram uma das mais intrigantes doenças no campo da reumatologia. Todos esses fatores têm um efeito social em termos de custo, desabilidade e perda de produtividade dos indivíduos; onerando os gastos públicos e tendo um impacto significativo tanto para o paciente quanto para a sociedade (KALPAKCIOGLU & SENEL, 2008).

Apesar do desconhecimento de uma causa específica, o envolvimento do estresse oxidativo e da inflamação parecem estar implicados na fisiopatologia da AR. A partir de então, diversos pesquisadores passaram a analisar o efeito de compostos antioxidantes nessa doença. Dentre eles, o selênio merece destaque (DUNTAS, 2009; THOMSON, 2004).

Alguns estudos têm investigado se o selênio pode estar envolvido com a causa (PEDERSEN *et al.*, 2005, KNEKT *et al.*, 2000;) ou com a patogênese da AR (VIJAYAKUMAR; SURESH; MANOHARAN, 2006; KAMANLI *et al.*, 2004; TARP *et al.*, 1992). Baixas concentrações do mineral têm sido associadas ao desequilíbrio do *status* redox celular e ao aumento de marcadores inflamatórios nessa população (CANTER; WIDER; ERNST, 2007). Desse modo, especula-se que a suplementação do mineral seria benéfica por diminuir a quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, conseqüentemente, melhorar o prognóstico da doença reumática ou retardar a sua natureza incapacitante.

Além disso, por não haver cura da artrite reumatoide, os pacientes são submetidos ao tratamento farmacológico durante toda a vida com o intuito de aliviar os sintomas e induzir a remissão ou diminuir a atividade da doença. No entanto, a longo prazo, esses medicamentos podem causar danos ao sistema renal e hepático, além da modificação de rotas metabólicas importantes para a homeostase do organismo (ALETAHA *et al.*, 2011). O selênio, por seu papel biológico explicado anteriormente, poderia ajudar no tratamento da

doença e, até mesmo, possibilitar a diminuição da dosagem farmacológica oferecida ao paciente.

A atividade da glutathiona peroxidase (GPx) é influenciada pelo estado nutricional relativo ao selênio dos indivíduos e pela presença de polimorfismos genéticos (MÉPLAN *et al.*, 2006; SHINKAI *et al.*, 2006). Esse é o primeiro trabalho que propõe avaliar o efeito da suplementação da castanha-do-brasil como fonte de selênio sobre o *status* antioxidante e sua relação com o polimorfismo Pro198Leu no gene da GPx 1 em pacientes com AR.

1.1. ARTRITE REUMATOIDE: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, FATORES DE RISCO E FISIOPATOLOGIA

A AR é a forma mais comum de poliartrite inflamatória, afetando três vezes mais as mulheres do que os homens e, embora a exacerbação dos sintomas costume aparecer entre os 40 e 50 anos, pode acometer qualquer faixa etária (GELDERMAN *et al.*, 2007). No entanto, o início da doença em idade precoce (artrite juvenil) parece estar associado a uma forma mais agressiva da doença (ALETAHA *et al.*, 2010).

Para ser diagnosticada, os médicos costumam utilizar a associação de uma série de sintomas e sinais clínicos, achados laboratoriais e radiográficos, sendo a orientação para o diagnóstico baseada nos critérios estabelecidos pelo Colégio Americano de Reumatologia (ALETAHA *et al.*, 2010).

O curso da doença varia consideravelmente entre os indivíduos, podendo causar limitações graves de movimentos, principalmente nos locais inflamados, devido ao dano da cartilagem ou destruição do osso e à dor associada. Os locais mais afetados são as articulações das extremidades do corpo como as dos pés e das mãos (KALPACKCIOGLU & SENEL, 2008, GELDERMAN *et al.*, 2007).

Durante o curso da doença, os pacientes passam por períodos de atividade e de remissão, podendo esta última ser decorrente do próprio mecanismo da doença ou por meio de sua indução através do tratamento farmacológico. Diversas drogas têm sido utilizadas para o alívio dos sintomas e para retardar o avanço da doença e de suas complicações associadas e incluem fármacos que são usados isoladamente ou em combinação com outras substâncias. Dentre os compostos mais usados no tratamento farmacológico, o metotrexato é a droga de primeira escolha sendo a via oral e a

intramuscular os meios de administração do medicamento mais utilizados (AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY, 2002).

A terapia medicamentosa é o principal tratamento para a AR e estão inclusos: os anti-inflamatórios não esteroides (AINHs), os corticoides e as drogas modificadoras do curso da doença (DMCDs), as quais podem ser sintéticas ou biológicas. Os AINHs, sobretudo no início da doença, são utilizados para diminuir o processo inflamatório e a dor. Com relação aos corticoides, além de exercer os mesmo benefícios dos AINHs, existem indícios de que atuam na modificação do curso da doença em associação com os DMCDs. As DMCDs são indicadas para impedir a progressão e o surgimento de lesões articulares permanentes e devem ser administradas a partir da definição do diagnóstico. Dentre as DMCDs sintéticas está o metotrexato (MTX), considerado o principal fármaco de escolha no tratamento da AR. Outros fármacos sintéticos também estão disponíveis e são utilizados tanto na forma de monoterapia ou associado a outro DMCD para uma resposta ainda melhor ao tratamento. As DMCDs biológicas são consideradas um grande avanço na terapia medicamentosa da AR e são indicados para pacientes que persistem com atividade da doença apesar do tratamento com pelo menos dois esquemas de DMCD sintéticas. A utilização de agentes biológicos deve ser feita em associação a um DMCD. (BÉRTOLO *et al.*, 2007; KWOH, 2002; O'DELL, 2002; PEREIRA, 2006; MOTA *et al.*, 2012).

Além do característico acometimento poliarticular, a AR pode envolver, direta ou indiretamente, outros órgãos e sistemas. As manifestações extra-articulares podem ser decorrentes do processo imunopatológico (ex: nódulos reumatóides) ou oriundos de outras complicações inerentes à evolução desta patologia (ex: síndrome do túnel de carpo, fratura osteoporótica). Anormalidades hepáticas; hematológicas; envolvimento neurológico; pulmonar e cardiovascular podem estar presentes nesse grupo (MONTENEGRO & ROCHA, 2009). A AR também está associada ao aumento da mortalidade por aterosclerose e risco 2 a 3 vezes maior para o infarto coronariano, quando comparados à população em geral (WANG & FENG, 2004). Todas essas complicações da AR ocorrem devido à condição inflamatória crônica e são indícios de mau prognóstico da doença reumática (MONTENEGRO & ROCHA, 2009).

Fatores genéticos, assim como condições ambientais como o contato com agentes infecciosos e o hábito de fumar parecem estar envolvidos na etiologia da doença. A susceptibilidade genética, por exemplo, aumenta o risco de desenvolvimento da AR em até 60% (GELDERMAN *et al.*, 2007; PATTINSON *et al.*, 2004).

A ação de um antígeno específico na região sinovial resulta na ativação da resposta imune, levando ao quadro inflamatório em todo o órgão. Na região sinovial, o aumento dos mediadores inflamatórios, tais como as citocinas pró-inflamatórias ocorrem por meio da ativação dos macrófagos, monócitos e granulócitos e do recrutamento dessas células através de quimiocinas (HITCHON & EL-GABALAWY, 2004; SUKKAR & ROSSI, 2004; DARLINGTON & STONE, 2001; SWEENEY & FIRESTEIN, 2004; FIRESTEIN, 2003). Na região abaixo da linha sinovial ocorre a infiltração de células T que podem formar agregados linfoides com as células B e dendríticas, resultando na produção de imunoglobulinas dos auto-anticorpos e na formação do complexo imune (SWEENEY & FIRESTEIN, 2003). As células T produzem a IL-17 e o interferon gama (IFN γ) e os fibroblastos e macrófagos; a IL-1, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a IL-8 e muitas outras citocinas, as quais contribuem para a inflamação. A IL-1 e o TNF- α estimulam a proliferação dos fibroblastos e aumentam a produção da IL-8, de outras citocinas e de enzimas que contribuem para a destruição da articulação por criarem um mecanismo de *feedback* positivo entre os macrófagos e fibroblastos, perpetuando assim a inflamação da articulação (FIRESTEIN, 2003).

Em nível molecular, as citocinas inflamatórias ativam vias de transdução intracelular de sinal e fatores de transcrição, resultando na produção de citocinas e metaloproteínas. Dentre eles, destacam-se o NF- κ B, as MAP quinases e o fator de transcrição ativador da proteína-1 (AP-1) como fatores reguladores da inflamação sinovial. A ativação do NF- κ B é responsável pelo controle de genes inflamatórios e que estão relacionados à AR (TNF, IL-1, IL-6, IL-8, ciclooxygenase 2 (COX-2), óxido nítrico sintase induzível e a molécula de adesão intercelular 1). Já o fator de transcrição AP-1 é dependente da via das MAP-quinases, sendo ativado pelo MAP-quinase JNK (SWEENEY & FIRESTEIN, 2004).

O desequilíbrio do sistema pró-oxidante/antioxidante é observado na artrite reumatoide. A doença, uma vez instalada, leva ao quadro inflamatório e essa inflamação é retroalimentada pela geração exacerbada de EROs e ERNs (TINCANI *et al.*, 2007; GELDERMAN *et al.*, 2004; HITCHON & EL-GABALAWY, 2004; SWEENEY & FIRESTEIN, 2004; DARLINGTON & STONE, 2001; JASIN, 2000). O excesso dessas substâncias deve-se à elevada produção de superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila pelos macrófagos ativados; ao aumento da atividade de sistemas enzimáticos, como o da xantina oxidase devido à condição de hipóxia na articulação (HITCHON & EL-GABALAWY, 2004),

e aumento da COX-2 e óxido nítrico sintase por meio da ativação de fatores de transcrição (DUNTAS, 2009).

As citocinas formadas, especialmente o TNF- α e o IFN- γ , são responsáveis pelo aumento da secreção de H₂O₂ (TINCANI *et al.*, 2007; GELDERMAN *et al.*, 2004; HITCHON & EL-GABALAWY, 2004; SWEENEY & FIRESTEIN, 2004; DARLINGTON & STONE, 2001; JASIN, 2000). O superóxido é convertido a peróxido de hidrogênio (H₂O₂), podendo ser espontaneamente formado ou mais rapidamente através da superóxido dismutase (SOD), uma enzima que apresenta duas isoformas, sendo uma delas induzida por citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (DARLINGTON & STONE, 2001). Em ratos, o TNF- α correlacionou-se com a habilidade dos fagócitos em gerar superóxido (MIESEL *et al.*, 1996a,b) e a remoção do TNF- α , por diálise, reduziu a produção de superóxido (TIKU *et al.*, 1990).

O TNF- α e a IL-1 β estimula indiretamente a produção de óxido nítrico (DARLINGTON & STONE, 2001). Concentração aumentada dessa substância foi constatada em modelos de artrite induzida em ratos (YANG *et al.*, 1998; CANNON *et al.*, 1996; GRABOWSKI *et al.*, 1996), estando envolvida na destruição da cartilagem da articulação acometida (DARLINGTON & STONE, 2001).

As citocinas pró-inflamatórias e os radicais livres levam também ao aumento das moléculas de adesão (COLGALGIL & TAYSI, 2002). Essas moléculas estão representadas em três classes (as imunoglobulinas, as integrinas e as selectinas) (STAUTON *et al.*, 1989) e são importantes durante o processo inflamatório, uma vez que regulam a adesão dos leucócitos e a transmigração desses componentes para o local da inflamação e também por possibilitarem interações intercelulares e entre a célula e a matriz extracelular (STEGEMAN *et al.*, 1994; SPRINGER, 1990). As moléculas de adesão são liberadas das células e encontradas na circulação, desse modo podem ser quantificadas no soro dos indivíduos (KAPLANSKI *et al.*, 2000; GEARING & NEWMAN, 1993). Na artrite reumatoide, a concentração de sICAM-1 (COGALSIL & TAYSI, 2002; LAUCELLA *et al.*, 1999; CUSH *et al.*, 1993; MASON; KAPAHI; HASKARD, 1993), s-VCAM e s-Selectina (PEMBERTON *et al.*, 2009) encontram-se bastante aumentadas. A ICAM-1 é expressa em células epiteliais, nos fibroblastos e em células endoteliais. No endotélio, as citocinas pró-inflamatórias geradas pelos monócitos e linfócitos T (especialmente a IL-1 β , o TNF- α e a IL-6) estimulam a produção da ICAM-1 (COLGALGIL & TAISY, 2002). Estudos apontam uma correlação

positiva entre a ICAM-1 e marcadores inflamatórios de resposta aguda, como a proteína C reativa (PCR) em indivíduos com artrite reumatoide (LITTER *et al.*, 1997).

O principal alvo das EROs e ERNs são os ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares. A ação desses compostos sobre os lipídios predispõem à ocorrência de interações covalentes entre as moléculas vizinhas, levando a um comprometimento da função celular. Diversos produtos são formados durante a peroxidação lipídica, entre eles destacam-se o 4-hidroxinonenal e o malondialdeído. O malondialdeído, por sua vez, reage com o grupamento lisina das proteínas formando moléculas imunogênicas, as quais ativam o processo inflamatório. Além da peroxidação lipídica, o excesso de radicais livres pode causar injúria na estrutura dos ácidos nucleicos e proteínas. O efeito desses compostos, sobre os ácidos nucleicos, leva ao comprometimento da sobrevivência celular, afetando a expressão gênica e à consequente desordem da proliferação da célula. Nas proteínas, os radicais livres predispõem à deterioração da viabilidade celular, comprometendo a funcionalidade de enzimas, receptores e o transporte na célula (DARLINGTON & STONE, 2001).

1.2. SELÊNIO: FUNÇÃO, HOMEOSTASE E ESTADO NUTRICIONAL EM INDIVÍDUOS COM ARTRITE REUMATOIDE

O selênio é um metaloide descoberto em 1817 pelo químico sueco Jöns Jacob Berzelius (BARCELOUX, 1999) e, em meados da década de 1950, foi identificado como um micronutriente essencial ao bom funcionamento do organismo (SCHWARZ *et al.*, 1957). Em 1973, observou-se que o selênio era um componente essencial da enzima antioxidante GPx. Em humanos e sob a forma de selenocisteína (Sec), o selênio está presente nas glutatona peroxidases, participando de reações de oxido-redução (FAIRWEATHER-TAIT *et al.*, 2011; HESKETH, 2008).

O selênio está distribuído em diferentes compartimentos biológicos e em concentrações variadas, totalizando, em um ser humano saudável (70 kg), cerca de 10 a 20 mg (NAVARRO-ALARCON & CABRERA-VIQUE, 2008). Aproximadamente metade desse total encontra-se estocado nos músculos, rins, fígado e testículos. Os eritrócitos, plaquetas e componentes do sistema imune (linfócitos T e B, monócitos, macrófagos) são as células que mais precisam do mineral (CASTRO, 2007; THOMSON, 2006).

A primeira reserva de selênio a ser metabolizada é dependente do *turnover* proteico da metionina. O selênio ingerido na forma de selenometionina é armazenado nos músculos, esqueleto, fígado, rins, estômago, cérebro, pele e mucosa gastrointestinal; sendo esse estoque utilizado para a manutenção do bom funcionamento do organismo. O segundo estoque do mineral encontra-se na forma da glutathione peroxidase, no fígado. Em caso de deficiência de selênio, a síntese das selenoproteínas é afetada, incluindo a da GPx (GPx) (MARTENS; MARTENS; COZZOLINO, 2012; IOM, 2002; SUNDE, 1997). Já o terceiro estoque é o da selenoproteína P (SePP) plasmática, bastante sensível às necessidades corporais de selênio (MARTENS *et al.*, 2012 CASTRO 2007; THOMSON, 2006).

Em humanos, o estado nutricional relativo ao selênio pode ser avaliado através da dosagem de sua concentração nos cabelos, unhas, urina e sangue (sangue total, soro, plasma e eritrócitos). Atualmente, análises de selenoproteínas (SePP e GPx) em diversas frações do sangue podem fornecer uma avaliação do estado nutricional dos indivíduos em relação ao selênio mais fidedigna (FAIRWEATHER-TAIT *et al.*, 2011).

Aproximadamente 80% do selênio dos alimentos são absorvidos, embora a taxa absorviva dependa da forma química de selênio presente e do estado nutricional dos indivíduos em relação a este mineral (FINLEY, 2006). Existem duas formas de compostos de selênio na natureza: a orgânica e a inorgânica e essas formas diferem quanto à biodisponibilidade (THOMSON, 2004).

A biodisponibilidade do selênio também depende, além de sua forma química, de outros fatores, tais como o teor proteico e lipídico do alimento e a presença de metais pesados. Alimentos proteicos, por exemplo, tendem a apresentar alta biodisponibilidade de selênio, uma vez que este mineral se liga ao aminoácido e é absorvido pelo organismo. Em contrapartida, alimentos contaminados por mercúrio (Hg) apresentam biodisponibilidade de Se reduzida devido a sua complexação com esse metal pesado (NAVARRO-ALARCON & CABRERA-VIQUE, 2008).

O fígado é o órgão central no metabolismo do selênio. A maior parte do selênio ingerido é metabolizado nesse órgão, sendo em seguida transportado pela veia porta para o sangue ou então removido no próprio órgão pela transulfuração do mineral. O selênio será usado para a síntese de selenoproteínas ou degradado e excretado por diferentes vias, dependendo de sua forma química (BURKE & HILL, 2005).

Os mecanismos, pelos quais o selênio é incorporado às selenoproteínas, são bastante complexos e não foram elucidados completamente, incluindo também as funções biológicas de todas as selenoproteínas formadas (FAIRWEATHER-TAIT *et al.*, 2011).

A excreção urinária de selênio é a principal forma de regulação da homeostase do mineral, diante da função renal preservada (ROMAN; GITARO; BARBANTE, 2014). O teor excretado depende do estado nutricional do indivíduo em relação ao selênio, da matriz alimentar e de sua forma química (ROMAN; GITARO; BARBANTE, 2014; NAVARRO-ALARCON & CABRERA-VIQUE, 2008).

O *Institute of Medicine* (IOM), por meio do *Food and Nutrition Board* (FNB) estipulou as recomendações ideais de ingestão de selênio baseadas em dois estudos de intervenção realizados na China e na Nova Zelândia, com o objetivo de evitar deficiência e toxicidade na população e de maximizar a atividade da GPx plasmática. A média dos dois valores resultou no estabelecimento de uma necessidade média estimada (EAR) de 45 µg Se/dia para homens e mulheres com idades entre 19-70 anos. O valor da RDA (*recommended dietary allowance*/ingestão dietética recomendada) para esse grupo foi calculado como sendo 120% da EAR e arredondado para 55 µg Se/dia. Os valores correspondentes às demais faixas etárias foram obtidos por meio da extrapolação dos valores anteriores, sendo utilizados, dentre alguns parâmetros, a massa corporal, para o estabelecimento das recomendações (IOM, 2000).

Ainda não há resultados conclusivos sobre o estado nutricional de pacientes com AR e relativo ao selênio. Alguns estudos mostraram resultados de selênio sérico/plasmáticos reduzidos ou semelhantes aos observados em grupos controles (Quadro 1). Algumas possíveis explicações para esses resultados são as diferenças metodológicas entre os estudos; exemplos disso são os fatores de exclusão adotados, a ausência de informações sobre a dieta e, principalmente, a heterogeneidade do grau de atividade da doença. Observou-se também diferença quanto ao método empregado para avaliar a atividade da doença e falta de dados referentes à estabilidade, tanto medicamentosa quanto da atividade da AR. Esses fatos comprometem ainda mais o estudo do mineral.

A prevalência da AR não é diferente quando comparadas regiões de alta e baixa ingestão de selênio (O'DELL *et al.*, 1991). Esse fato indica que a sua deficiência não é um fator importante para o surgimento da doença. Por outro lado, baixas concentrações de selênio sérico têm sido frequentemente descritas em pacientes com AR, o que mostra a

importância do mineral na doença reumática (YAZAR *et al.*, 2005; MAEHIRA *et al.*, 2002; KNEKT *et al.*, 2000; KÖSE *et al.*, 1996; TARP *et al.*, 1992).

O estado nutricional relativo ao selênio dos pacientes parece ser influenciado pelo estágio da AR. Tarp e colaboradores (1985) analisaram as concentrações de selênio de 87 indivíduos dinamarqueses com AR (clássica e definitiva); sendo a divisão dos grupos realizada de acordo com o tempo de duração e gravidade da doença reumática. Para tanto, os participantes foram alocados em 3 grupos. O primeiro deles com AR grave (atividade intensa), com mais de 6 articulações edemaciadas e de elevada duração, apresentou selênio sérico reduzido ($63,7 \pm 14,1 \mu\text{gSe/L}$) comparado aos demais grupos. Já o segundo e terceiro grupo (atividade da doença moderada e duração variada ou de pequena duração, respectivamente) apresentaram concentrações mais elevadas do mineral ($75,9 \pm 10,8$; $74,1 \pm 10,8 \mu\text{gSe/L}$, respectivamente). Os resultados desse estudo indicam que o estado nutricional relativo ao selênio dos indivíduos não está associado à duração da doença reumática, no entanto, as menores concentrações séricas do mineral foram observadas em indivíduos com AR grave (RYAN-HARSHMAN & ALDOORI, 2005; TARP, 1995; MAEHIRA *et al.*, 2002; TARP, 1985).

Inúmeras pesquisas apresentadas no quadro 1 avaliaram pacientes com artrite reumatoide de ambos os sexos e sorologia positiva ou negativa do fator reumatoide; sendo esses indivíduos comparados à população saudável e/ou comparados a outras enfermidades (osteoartrite, lúpus, câncer, entre outras). Nesses trabalhos, não foram observados efeitos significativos dessas variáveis sobre o estado nutricional relativo ao selênio do grupo estudado. Os estudos também mostram que, apesar da variabilidade encontrada, os indivíduos com AR tendem a apresentar estado nutricional deficiente em selênio, indicando que o mineral corpóreo é afetado pela doença. Apesar de alguns estudos mostrados no quadro 1 terem sido conduzidos em regiões com solos deficientes em selênio, os valores observados do mineral estavam mais reduzidos na população com AR, quando relacionada aos indivíduos saudáveis. Kose e colaboradores (1996) sugerem que o selênio sérico seja direcionado para órgãos que necessitem de um maior concentração do mineral para combater o quadro inflamatório e o estresse oxidativo elevado, principalmente nos líquidos sinoviais e nos leucócitos polimorfonucleares.

A ingestão alimentar de selênio, uma variável importante para a avaliação do estado nutricional do indivíduo quanto a esse mineral e que poderia ajudar no entendimento dessas diferenças, não foi verificada na maioria dos estudos. No ambiente, o mineral é

encontrado nos solos e, conseqüentemente, em frutas, vegetais, carnes, leites e em pequena quantidade no ar. Sua concentração nos alimentos é bastante variável, dependendo do tipo de alimento e do teor de selênio nos solos (NAVARRO-ALARCON & CABRERA-VIQUE, 2008; COMBS, 2001; FAIRWEATHER-TAIT *et al.*, 2011). Diversos países apresentam solos com elevado teor de selênio (seleníferos), sendo característicos do Canadá, da China, da Rússia, da Irlanda e do oeste dos Estados Unidos; enquanto outras regiões apresentam solos muito pobres no mineral e incluem a Finlândia, Nova Zelândia, Sul e Sudeste da China. No Brasil, o teor de selênio no solo é bastante variável e depende de vários fatores, sendo um deles a distância do litoral (NAVARRO-ALARCON & CABRERA-VIQUE, 2008; FAIRWEATHER-TAIT *et al.*, 2011).

Quadro 1. Estudos que avaliaram o status de selênio (Se) na artrite reumatoide, no período de 1992 a 2014.

Estudos	Amostra	País	Fatores de exclusão	Idade (anos)	Atividade da doença	Se sérico/plasmático (µg/L)	Método
Maehira <i>et al</i> , 2012	141 saudáveis (71H, 70M) 40 PCR alto (21H, 19M) 20 AR (8H, 16M) 16 Câncer pulmão (13H, 3M) 12 ATL (11H, 11M)	Japão	Não informado	(20-89)	Não informado	121,7 ± 21,3 64,8 ± 24,8 90,1 ± 20,1 92,1 ± 25,4 85,2 ± 31,3	Fluorimétrico
Peretz & Nève, 2001	Saudáveis 55 AR	Bélgica	Uso de fármacos imunossupressores e corticoide >10mg e de suplementos; neoplasia, doença renal, hepática, neurológica e desordens metabólicas	(18-80)	Ativa > 6 junções edemaciadas ESR>25 mm/h PCR> 1mg/dl	70 ± 14 77 ± 21	EAA por forno grafite
Knekt <i>et al</i> , 2000	Longitudinal (19518 indivíduos) para avaliar o risco para a AR AR soropositiva (FR+) AR soronegativa (RF -)	Finlândia	História prévia de AR	(20-98)	Não informada	46,1 ± 10,9 49,4 ± 12,9	Método modificado de Lieberman-Buchard
O'Dell <i>et al</i> , 1992	101 AR (FR+) 21 AR (FR-) 49 OA 20 LES 20 saudáveis	Estados Unidos da América	AR não especificada	55,5 49,9 62,3 36,8 38,9	Para AR – pelo menos 4 critérios da ACR (1991)	148 ± 42 151 ± 27 143 ± 23 156 ± 34 160 ± 25	Análise por ativação de nêutron
Köse <i>et al</i> , 1996	60 AR crônica (44H, 16M) Saudáveis (40H, 20M)	Turquia	Consumo regular de vitaminas, uso excessivo de álcool, história de inflamação	51,1 ± 12,2	Doença ativa e clinicamente estável	107,5 ± 23,8 168,5 ± 46,4	EAA por forno de grafite

			intercorrente, tratamento sistêmico com corticoide				
Heinle, 1997*	70 AR	Alemanha	Não disponível	Não disponível	Não disponível	-	Não disponível
Jasvinder & Lali, 1999	40 Saudáveis 20H 20 M 20 mulheres com AR	Índia	Não informado		Doença ativa	139,0 ± 36,7 128 ± 41,0 122,2 ± 40,6	Espectrofluorimétrico
Tarp <i>et al.</i> , 1985	87 AR	Dinamarca		Não disponível	1. Ativa, severa e de longa duração 2. moderada e duração variada 3. moderada e de pequena duração	70,2 ± 13,3 63,7 ± 14,1 75,9 ± 10,8 74,1 ± 10,8	Fluorimétrico
Tarp <i>et al.</i> , 1992	9 AR ativa 8 saudáveis	Dinamarca	Uso de suplementos Outras doenças Tratamento sistêmico com corticoide		Ativa: ESR > 40 mm/h > 7 junções edemaciadas Fator reumatoide positivo Presença de erosões radiológicas	61 ± 17 89 ± 12	PIXE multielemento
Yazar <i>et al.</i> , 2005	25 saudáveis 25 AR 25 OA	Turquia	Uso de corticosteroides e Gold	48,2 ± 6,2 47,4 ± 7,3 49,3 ± 8,2	Não informado	111,7 ± 67,7 64,4 ± 28 78,2 ± 35,2	EAA por forno de grafite

Legenda: H- Homens; M- Mulheres; PCR- Proteína C Reativa; AR- Artrite Reumatoide; ATL- Leucemia de células T; FR- Fator Reumatoide; OA- Osteoartrite; LES- Lupus Eritematoso Sistêmico; EAA- Espectrofotometria de Absorção Atômica. Compilação de dados – resultados expressos como média ± desvio-padrão.

1.3. SELÊNIO E SUA RELAÇÃO COM O ESTRESSE OXIDATIVO E CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NA ARTRITE REUMATOIDE

O sistema de defesa antioxidante em indivíduos com AR tem sido analisado em inúmeros estudos clínicos por meio da dosagem da atividade de enzimas antioxidantes, da capacidade antioxidante total plasmática e de marcadores de estresse oxidativo (VIJAYAKUMAR *et al.*, 2006; KAMANLI *et al.*, 2004; HONKANEN, 1991; BAE; KIM; SUNG, 2003), incluindo os subprodutos da peroxidação lipídica (MDA) (JASWAL *et al.*, 2003; TAYSI *et al.*, 2002; GAMBHIR; LALI; JAIN 1997) e de lesão do DNA (ALTINDAG *et al.*, 2007).

A capacidade antioxidante total plasmática reduzida (SARBAN *et al.*, 2005), o nível aumentado de lesão do DNA (ALTINDAG *et al.*, 2007) quando comparados indivíduos com AR e indivíduos saudáveis, altos níveis de 8-isoprostano urinário (PEMBERTON *et al.*, 2009) e atividade alterada de várias enzimas antioxidantes (SOD e GPx) (VIJAYAKUMAR *et al.*, 2006; KALPAKCIOGLU & SENEL, 2008; HASSAN *et al.*, 2001) são indícios de que, de fato, os indivíduos estão submetidos a um quadro de estresse oxidativo.

O aumento da concentração (PEMBERTON *et al.*, 2009) e da expressão de moléculas de adesão (E-selectina e VCAM) (CUNANNE *et al.*, 1998; CUTOLO *et al.*, 1993), aliado a uma diminuição da atividade da GPx, também foi encontrado nos fluidos sinoviais dos pacientes com artrite reumatoide (MAURICE *et al.*, 1997). Além disso, têm sido relatados na literatura a diminuição dos níveis de α -tocoferol e o aumento de marcadores de peroxidação lipídica em indivíduos com AR (SUKKAR & ROSSI, 2003).

A partir da descoberta de que a GPx é uma enzima dependente de selênio, diversos pesquisadores passaram a se interessar pelo tema, tendo sido identificada a importância do selênio também como um cofator essencial para outras selenoproteínas (FAIRWEATHER-TAIT *et al.*, 2011), além de sua possível ação anti-inflamatória (DUNTAS, 2009; RYAN-HARSHMAN *et al.*, 2005) .

In vivo, o selênio regula a atividade da GPx e, desse modo, controla os níveis intracelulares das EROs. O mecanismo pelo qual a GPx mantém o equilíbrio oxidativo celular ocorre por meio do controle da translocação do NF- κ B para o núcleo celular, seguida da produção de citocinas. Níveis aumentados de selênio impedem a ativação de genes que codificam para as citocinas inflamatórias, inibindo a liberação de proteínas de fase aguda. Além disso, o selênio pode modificar a proliferação dos linfócitos e a resposta

imune, através da alteração do metabolismo do ácido araquidônico e da formação de eicosanoides (DUNTAS, 2009). Altas concentrações de Se podem induzir à liberação de L-selectina, diminuindo a diferenciação dos monócitos em macrófagos e, desse modo, reduzindo a produção de EROs e a consequente liberação de citocinas (DUNTAS, 2009). Desse modo, a suplementação de selênio seria uma alternativa interessante para melhorar a qualidade de vida dos indivíduos acometidos pela AR.

No entanto, a suplementação com selênio tem produzido resultados conflitantes. Alguns estudos relataram melhora dos sintomas (HEINLE *et al.*, 1997; MUNTHER *et al.*, 1996; PERETZ *et al.*, 1992) ou nenhuma mudança com a suplementação (TARP *et al.*, 1985; JANTTI *et al.*, 1991; PETERSSON *et al.*, 1991) em indivíduos com AR, o que poderia ser explicado por diferenças no delineamento dos estudos incluindo as diversas fases da doença, o tempo de suplementação e o tratamento farmacológico. Além disso, os estudos que se propuseram a avaliar a atividade enzimática da enzima GPx apresentaram resultados controversos, tendo sido encontradas atividades da enzima baixas (SARBAN *et al.*, 2005; TAYSI *et al.*, 2002; ASHOUR *et al.*, 2000) e inalteradas (CIMEN *et al.*, 2000; KERIMOVA *et al.*, 2000; OLIVIERI *et al.*, 1991;), nos eritrócitos e soro de pacientes com artrite reumatoide.

As GPx são encontradas em todos os tecidos dos mamíferos em que ocorrem processos de óxido-redução. Estão presentes no meio extra e intracelular, em órgãos como o fígado, rins, pulmão, intestino; além de em outras áreas tais como nos fluidos corpóreos (sangue, líquido sinovial), epidídimo, placenta, entre outros (BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999). Contribuem para a redução de EROs e, desse modo, atuam protegendo macromoléculas e membranas celulares contra a oxidação. A atividade das lipoxigenase pode ser silenciada pela GPx, sendo esta enzima também responsável pela regulação das vias de sinalização de citocinas; inibição da apoptose celular e inibição da formação da lipoproteína oxidada. Esses mecanismos explicam a relação da GPx com a inflamação (BRIGELIUS-FLOHÉ & MAIORINO, 2013).

Atualmente, existem 7 membros da família GPx e que são bastante conhecidos. A GPx 1 foi a primeira a ser descoberta e é conhecida como GPx clássica ou citossólica. Representa a selenoproteína mais abundante nos mamíferos e atua como um potente antioxidante, reduzindo os H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos convertendo-os em álcool e água. Já a GPx2 é a forma gastrointestinal da enzima e atua protegendo todo o órgão contra os efeitos deletérios dos hidroperóxidos provenientes dos alimentos e do

metabolismo oxidativo. Além dessas funções, a GPx2 protege todo o trato gastrointestinal contra o potencial mutagênico dos hidroperóxidos e previne o início e o desenvolvimento de toxicidade. A GPx extracelular ou plasmática (GPx3) é encontrada em maiores concentrações nos rins, seguida do fígado, músculo esquelético, pâncreas, cérebro, entre outros; podendo ter efeito antioxidante e regulatório durante o processo inflamatório. A GPx4 ou glutathione peroxidase fosfolípido hidroperóxido apresenta função antioxidante, mas também é importante para a maturação sexual e regulação do *status* redox celular. Está também relacionada a uma diminuição da peroxidação lipídica nas membranas celulares, na biossíntese de leucotrienos e na regulação da sinalização celular mediada por citocinas (BRIGELIUS-FLOHÉ & MAIORINO, 2013; PAPP *et al.*, 2007; BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999). A GPx6 foi recentemente descoberta, sendo encontrada no epitélio olfatório e tecidos embrionários. Outras variantes da GPx contêm cisteína em seu centro ativo e estão representadas pela GPx5 (expressa no epidídimo) e GPx7 (fosfolípido hidroperóxido) (HUANG; ROSE; HOFFMAN, 2012; PAPP *et al.*, 2007; UTOMO *et al.*, 2004; KRYUVOV *et al.*, 2003).

As GPx dependentes de selênio apresentam um resíduo simples de selenocisteína em cada uma das quatro subunidades, sendo a sua incorporação realizada através de um mecanismo genético complexo codificado pelo códon UGA (ROMAN; JITARU; BARBANTE, 2014; BRIGELIUS-FLOHÉ & MAIORINO, 2013). As GPx são responsáveis pela conversão dos hidroperóxidos em alcoóis e água. Os hidroperóxidos não são apenas moléculas tóxicas ao organismo, eles apresentam funções biológicas importantes e que incluem a sinalização celular, a morte celular programada, além do papel importante na proliferação, diferenciação celular e maturação das hemácias. Desse modo, não é vantajoso para o organismo remover todos os hidroperóxidos, pois a manutenção de quantidade adequada desse composto é importante para o funcionamento celular adequado. Toda essa regulação é feita pelas glutathione peroxidases (BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999), cuja hierarquia depende do estado nutricional dos indivíduos em relação ao selênio (SHOMBURG & SCHWEIZER, 2009).

Em caso de deficiência moderada de selênio, por exemplo, nem todas as GPx apresentam alterações em suas atividades. Algumas isoformas diminuem de atividade apenas em casos de deficiência grave e prolongada do mineral. Por outro lado, as GPx1, GPx3 e GPx4 têm a atividade alterada em populações deficientes em selênio e atividade aumentada quando da ingestão de pelo menos 65 µg/dia do mineral (FAIRWEATHER-TAIT

et al., 2011; OTTEN; PITZI; HELLWIG; MEYERS, 2006). Dentre esses compostos, a GPx1 é a enzima que responde mais rapidamente à depleção (BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999) e é mais sensível a mudanças de selênio nos fluidos biológicos (ROMAN; JITARU ; BARBANTE, 2014), mas demora mais tempo para atingir a expressão máxima (BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999).

A GPx1, por ser citossólica, é a principal isoforma envolvida na redução dos níveis de peróxidos de hidrogênio, sendo expressa em maior quantidade em tecidos com alta taxa de produção de peróxidos (eritrócitos, rins, fígado e pulmões) (ROMAN; JITARU ; BARBANTE, 2014; BRIGELIUS-FLOHÉ & MAIORINO, 2013).

Na literatura, estudos experimentais, em cultura de células e *in vitro*, se preocuparam em estudar o efeito da GPx1 sobre a função celular e na fisiopatologia de diversas doenças . A compilação dos achados científicos permitiu à Haan e colaboradores (2003) elucidar alguns mecanismos de ação da enzima. Foi observado que ratos *knockout* apresentaram maior concentração de peróxidos de hidrogênio e essa concentração aumentada favoreceu o processo inflamatório e o desenvolvimento de doenças, tais como catarata, doenças neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer), infarto e outras enfermidades associadas à senilidade. Além disso, a incorporação de compostos altamente oxidantes no organismo dos animais levou ao aumento da expressão da GPx1, com menores danos celulares se comparado ao grupo *knockout* . Em contrapartida, os animais *knockout* para o gene da GPx1 morreram devido aos efeitos deletérios dessas substâncias que, em elevadas concentrações, levam à produção do radical hidroxila, altamente tóxico para as células. Apesar de não ter sido avaliado o estado nutricional de selênio dos indivíduos, a referida pesquisa apresenta indícios de que a atividade e expressão da GPx1 está associada com parâmetros de estresse oxidativo.

Segundo Hesketh (2008), a expressão da GPx1 parece ser influenciada pelo selênio em estudos realizados em culturas de células e *in vitro* e a diminuição de sua expressão têm sido observada em indivíduos com câncer (ZACHARA *et al.*, 2005; BRIGELIUS-FLOHE & KIPP, 2009; CHEN *et al.*, 2011). Apesar de serem escassos os estudos *in vivo* que tratam do efeito modulador do selênio sobre a expressão gênica de selenoproteínas, têm sido observados aumento da expressão da GPx1 devido à suplementação do mineral (sob a forma de selenometionina ou selenito de sódio), em casos de deficiência de selênio (HESKETH, 2008).

Saed e colaboradores (2008) afirmam que a expressão da GPx1 diminui drasticamente na deficiência de selênio em ratos e aumenta sigmoidalmente com o aumento da ingestão de selênio até atingir um *plateau* (SUNDE *et al.*, 2005; WEISS *et al.*, 1997; LEI *et al.*, 1995). Para esses pesquisadores, a avaliação da GPx1 em nível molecular é um bom biomarcador para avaliar o *status* de selênio. No entanto, ainda não há consenso na literatura sobre a utilização deste biomarcador (BARNES *et al.*, 2009; RESZKA *et al.*, 2009; SUNDE *et al.*, 2008). A razão deve-se à influência de diversos fatores ambientais (alimentação, exposição ao ambiente, fumo), de saúde, sexo e sistema imune (RESZKA *et al.*, 2012) sobre a expressão gênica.

Além disso, pesquisas conduzidas com animais e seres humanos mostraram que a expressão dos genes de selenoproteínas manteve-se constante mesmo com a ingestão subótima do mineral (RESZKA *et al.*, 2009; PAGMANTIDIS *et al.*, 2008; RAVN-HAREN *et al.*, 2008; SUNDE *et al.*, 2008). Em contrapartida, a atividade das enzimas selenodependentes pode ser um melhor indicador para a avaliação do estado nutricional dos indivíduos quanto ao selênio. A presença de polimorfismos genéticos é outro fator que pode influenciar a atividade e expressão da enzima e será abordado no próximo tópico.

1.4. POLIMORFISMO NO GENE QUE CODIFICA PARA A GPx1 (Pro198Leu)

Inúmeros estudos vêm tentando estabelecer associações entre o *status* antioxidante e o desenvolvimento de algumas doenças. As análises de biomarcadores do estresse oxidativo, de moléculas de adesão e de citocinas inflamatórias têm sido utilizadas rotineiramente para essa função (RAYMAN, 2009; FERRARI, 2005). No entanto, as pesquisas mais recentes, além de terem como objetivo elucidar o impacto da alimentação sobre o risco de doenças, também questionam o porquê de apenas alguns indivíduos com elevado estresse oxidativo responderem favoravelmente à suplementação com minerais. As respostas ainda estão longe de serem entendidas em toda sua plenitude, mas segundo os pesquisadores, pode envolver o genoma humano.

A partir do sequenciamento do genoma, diversas mutações foram descobertas e os polimorfismos aparecem como consequência dessas mutações. O tipo mais comum de polimorfismo é originado de uma mutação simples, onde ocorre a troca de um nucleotídeo por outro, sendo denominado de SNP (*Single Nucleotide Polymorphism* ou polimorfismo de um único nucleotídeo) (PASTERNAK, 2005). Os SNPs são alterações em uma base do

DNA (alelo variante de um gene no locus do cromossomo), onde o alelo menos frequente ocorre em 1% ou mais de indivíduos normais em uma população (BROOKES, 1999). Quando essa alteração na sequência de nucleotídeos leva à formação de um aminoácido diferente, é bem possível que haja mudança conformacional na estrutura da proteína e, conseqüentemente, em sua função (IIDA *et al.*, 2009). Se ele ocorre na região promotora ou em éxons, esses polimorfismos podem mais facilmente levar a mudanças funcionais nas células e, desse modo, aumentam o risco e/ou resistência para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (KAUWELL, 2005).

Pesquisas recentes estão voltadas para a detecção dessas variações em diversos genes, incluindo os que codificam para enzimas do sistema de defesa antioxidante e de suas possíveis conseqüências fenotípicas. A existência, por exemplo, de um polimorfismo no gene de selenoproteínas e o consumo inadequado de selênio são fatores que poderiam levar a um desequilíbrio no balanço oxidativo da célula; predispondo ao dano oxidativo, favorecendo os processos inflamatórios e aumentando a suscetibilidade para algumas doenças (MÉPLAN *et al.*, 2006; SHINKAI *et al.*, 2006).

Diversos polimorfismos foram observados no gene da GPx1, sendo o mais extensivamente estudado o Pro198Leu. Fosberg e colaboradores (1999) detectaram um ponto de mutação na posição 593, com substituição do nucleotídeo citosina (C) por uma timina (T), que causa a mudança de uma prolina (Pro) por uma Leucina (Leu) no códon 198, localizado no gene da GPx1 (no cromossomo 3p21.3), sendo este polimorfismo bastante importante por estar presente em diferentes etnias (IIDA *et al.*, 2009).

A presença do polimorfismo Pro198Leu tem sido associada com a etiologia de diversos tipos de câncer (HESKETH, 2008). Em uma meta-análise publicada recentemente, Chen e colaboradores (2011) conseguiram agrupar dados de 14.372 indivíduos com diferentes tipos de tumor e 18.081 controles obtidos de 31 artigos do tipo caso-controle encontrados na literatura. Os resultados mostraram que a presença do alelo variante (Leu) aumentou o risco para o desenvolvimento de câncer devido à alteração da expressão gênica da GPx1. Em concordância, Zhuo & Diamond (2009) e Kuzuya e colaboradores (2008) observaram que o alelo variante do gene da GPx1 estava associado à prevalência de câncer de pulmão, mama, próstata, entre outros, além de maior risco para síndrome metabólica em homens japoneses. Diversos estudos ainda sugerem a associação deste polimorfismo com o aumento do risco de desenvolvimento de câncer de próstata (ARSOVA-SARAFINOVSKA *et al.*, 2009), de mama (RAVN-HARREN *et al.*, 2006),

de pulmão (ROSENBERGER *et al.*, 2008), de bexiga (GOERLITZ *et al.*, 2011) e doenças cardiovasculares (HAMANISHI *et al.*, 2004). No entanto, Hansen e colaboradores (2009) afirmaram que o polimorfismo Pro198Leu no gene da GPx1 não influenciou na etiologia do câncer colorretal. Entre os carreadores homozigotos para o alelo Leu, o consumo de álcool e fumo aumentou o risco de desenvolvimento dessa doença. Além disso, os resultados mostraram que o estilo de vida pode ser um fator importante para o surgimento do câncer colorretal.

A identificação da troca do aminoácido Pro pelo Leu no códon 198 pode levar a consequências quanto à atividade da enzima GPx1, porém ainda existe bastante controvérsia sobre esse tema (ARSOVA-SARAFINOVSKA *et al.*, 2008; FOSBERG *et al.*, 2000).

Estudos *in vitro* mostraram que a presença do polimorfismo Pro198Leu na região codificadora do gene da GPx1 diminuiu em 40% a atividade da enzima. Essa diminuição também foi observada por Ravn-haren e colaboradores (2006) em indivíduos com genótipo mutante e por Kuzuya e colaboradores (2008), onde afirmaram que a atividade eritrocitária da GPx estava reduzida na dependência do alelo variante T. Hu & Diamond (2003) observaram ainda que os indivíduos carreadores do alelo variante foram menos responsivos ao aumento da atividade da GPx1 durante a suplementação com selênio. Já Fosberg e colaboradores (2000) e Erdem e colaboradores (2012) não observaram diferenças quanto à atividade da GPx entre os diversos genótipos estudados.

No entanto, ainda não existem na literatura pesquisas que avaliaram a associação do estado nutricional relativo ao selênio com o polimorfismo Pro198Leu no gene da GPx1 em pacientes com artrite reumatoide.

1.5. INTERVENÇÃO ALIMENTAR COM CASTANHA-DO-BRASIL

A castanha-do-brasil apresenta alto valor nutricional, contendo elevado teor de lipídios (76,79%), seguido de proteínas (14,81%) e carboidratos (8,5%). Contém aproximadamente 15% de ácidos graxos saturados, 25% de monoinsaturados e 21% de poli-insaturados. Além de ser uma excelente fonte de selênio, apresenta outros nutrientes como magnésio, fósforo, cálcio, ferro, potássio, zinco, cobre, vitaminas E e B₆ e fibras (YANG, 2009).

A castanha-do-pará ou castanha-do-brasil contém de 29 a 115 $\mu\text{gSe/g}$ e é considerada a principal fonte deste elemento na dieta (COMINETTI *et al.*, 2012; DUMONT *et al.*, 2006; COUTINHO, 2003; GONZAGA, 2002; VONDERHEIDE *et al.*, 2002).

Populações com baixa ingestão de selênio poderiam se beneficiar com o consumo moderado de castanha-do-brasil pela possibilidade de redução do risco de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, à inflamação, desordens no funcionamento das deiodinases e incluindo as doenças autoimunes.

A suplementação com castanha-do-brasil em indivíduos saudáveis foi estudada por Thomson e colaboradores (2008) objetivando relacionar o estado nutricional relativo ao selênio dos participantes e a concentração de enzimas antioxidantes. A administração de 100 μg de Se diariamente foi responsável pelo aumento dos níveis plasmáticos de Se e da atividade da GPx, após 12 semanas de suplementação; indicando que de fato existe uma correlação entre estes dois parâmetros. De forma semelhante, um estudo pioneiro realizado em nosso laboratório investigou o efeito da suplementação dessa castanha em pacientes em hemodiálise. Os resultados mostraram que esses pacientes apresentavam deficiência em selênio e que o consumo de apenas uma unidade de castanha-do-brasil, o equivalente a 300 μg de Se/dia durante 12 semanas, foi efetivo em aumentar a concentração plasmática desse mineral e da atividade da GPx nessa população, sugerindo melhora de seu *status* antioxidante (STOCKLER-PINTO *et al.*, 2009). Em pacientes obesos, a ingestão de uma unidade de castanha-do-brasil, o equivalente a 290 μg de Se/dia foi eficiente em restaurar o estado nutricional de selênio e melhorar os índices de castelli I e II, preditores de risco cardiovascular (COMINETTI *et al.*, 2012) e reduzir danos ao DNA (COMINETTI *et al.*, 2011). Outros estudos apontam que o selênio pode alterar a expressão gênica de enzimas dependentes desse elemento. A suplementação com selenito de sódio, em pacientes com doença arterial coronariana, e estudada por Shnabel e colaboradores (2008), por exemplo, resultou em aumento da atividade e da expressão gênica da enzima GPx1, tanto *in vivo* quanto em cultura de células endoteliais. Além disso, a suplementação desse mineral também tem sido relacionada à proteção contra os danos causados pelos hidroperóxidos em estudos de cultura de células humanas (LEWIN *et al.*, 2002), à diminuição da peroxidação lipídica nos eritrócitos e aumento da atividade de enzimas antioxidantes dependentes de selênio em pacientes diabéticos tipo 2 (SEKEROGLU *et al.*, 2000) e melhora do estresse oxidativo em pacientes com doenças autoimune (KURIEN; SCOFIELD, 2008).

Alguns pesquisadores têm especulado que a suplementação com selênio parece reduzir a gravidade da resposta inflamatória, em pacientes asmáticos, por mecanismos relacionados a enzimas antioxidantes dependentes de selênio, tais como a GPx (MISSO *et al.*, 1996). Além disso, em um estudo multicêntrico randomizado utilizando pacientes em sepsis ou em choque hipovolêmico, a administração de selênio reduziu a mortalidade desses pacientes (ANGSTWURM *et al.*, 2007). A suplementação com selênio de pacientes com graves injúrias ósseas e caracterizados por baixas concentrações plasmáticas de selênio e de GPx, levou a uma redução significativa da taxa de infecção secundária (GARTNER *et al.*, 2001).

A artrite reumatoide é uma doença inflamatória crônica com risco duas vezes maior para o desenvolvimento de infarto do miocárdio em relação à população em geral e três vezes maior para aqueles com 10 anos ou mais da doença (SOLOMON *et al.*, 2003; WOLF *et al.*, 2003). A ingestão ótima de selênio, além da possível redução do risco de complicações cardíacas em indivíduos com AR, pode estar envolvida com a redução do estresse oxidativo e a consequente diminuição da inflamação das articulações, trazendo alívio para as dores, as quais são frequentemente causadas pela produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias. Desse modo, especula-se que o selênio poderia ser um fator importante para a melhoria da qualidade de vida da população acometida e do prognóstico da doença reumática.

No entanto, estudos que avaliem a associação entre o estado nutricional de pacientes com artrite reumatoide e biomarcadores do estresse oxidativo e de inflamação são escassos na literatura. Desse modo, a avaliação do efeito potencial *in vivo* da suplementação com castanha-do-brasil, como fonte de selênio, sobre os parâmetros de estresse oxidativo e de inflamação e sua relação com o polimorfismo Pro198Leu no gene da GPx 1, em pacientes com artrite reumatoide, vêm a suprir essa lacuna.

2. HIPÓTESES EXPERIMENTAIS

- ❖ Indivíduos com AR são deficientes em selênio;
- ❖ O grau de atividade da doença, bem como o fator reumatoide são fatores que influenciam o estado nutricional dos indivíduos em relação ao selênio na AR;
- ❖ Indivíduos homozigotos selvagens para o SNP Pro198Leu no gene da GPx1 apresentam melhor *status* de selênio se comparados aos do grupo CT ou TT;
- ❖ A intervenção alimentar com castanha-do-brasil melhora o *status* de selênio dos indivíduos, bem como os parâmetros de estresse oxidativo e de inflamação;
- ❖ O efeito da suplementação com castanha-do-brasil sobre os marcadores de estresse oxidativo e de inflamação é influenciado pela presença do polimorfismo Pro198Leu no gene da GPx1.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

- Avaliar o efeito da suplementação com castanha-do-brasil como fonte de selênio sobre os marcadores de estresse oxidativo, citocinas inflamatórias e sua relação com o polimorfismo Pro198Leu no gene da GPx 1 em pacientes com artrite reumatoide.

3.2. ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da suplementação com castanha-do-brasil como fonte de selênio sobre os parâmetros bioquímicos e atividade da enzima glutathione peroxidase no plasma e eritrócitos;
- Estudar a associação entre os marcadores de estresse oxidativo, citocinas inflamatórias e o estado nutricional relativo ao selênio;
- Estudar a associação entre estes parâmetros e o polimorfismo Pro198Leu no gene da GPx 1 em pacientes com artrite reumatoide.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram selecionadas 59 pacientes com artrite reumatoide, do sexo feminino, com idades entre 20 e 70 anos, voluntários, que fazem acompanhamento clínico no setor de reumatologia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP.

Foi aplicado um questionário, a fim de obter informações socioeconômicas, de 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 artrite reumatoide e faixa etária acima citada, ausência de doenças que poderiam interferir no estado nutricional relativo ao selênio (diabetes mellitus, disfunções da tireoide, condições inflamatórias agudas, câncer, doenças renais) e utilização de suplementos vitamínico-mineral, excetuando cálcio e vitamina D, por fazerem parte do tratamento medicamentoso dos pacientes. As pacientes tabagistas também não foram incluídas no estudo.

Todas as participantes foram esclarecidas sobre os procedimentos aos quais foram submetidas e o destino do material biológico coletado, assim como da demanda de tempo necessária para a realização do estudo. Foram informadas também sobre o direito de desistir de participar da pesquisa em qualquer momento, sem constrangimentos.

As participantes 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 necessitem experiências com humanos.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e apresentada ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP.

4.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O material biológico coletado foi analisado para caracterizar as participantes quanto ao estado nutricional relativo ao selênio, o grau de inflamação e de estresse oxidativo, a concentração e expressão gênica da GPx1, assim como a análise do polimorfismo Pro198Leu no gene da GPx1. Após o período de intervenção, os mesmos parâmetros foram reavaliados. A figura 1 mostra o fluxograma das atividades desenvolvidas.

Figura 1. Fluxograma das atividades desenvolvidas na pesquisa.

As coletas de sangue foram realizadas na Universidade Federal de São Paulo por um técnico especializado. Este estudo é de natureza longitudinal e de intervenção, tendo sido realizado o acompanhamento das participantes em dois momentos do estudo: antes e após a suplementação com castanha-do-brasil. Após a suplementação, os mesmos parâmetros foram avaliados com o intuito de comparar os resultados entre as duas etapas.

4.2. SUPLEMENTAÇÃO

Após as coletas da primeira fase (Tempo 0), as pacientes receberam suplementação com 1 nóz de castanha-do-brasil (contendo aproximadamente 350 µg de selênio/dia) durante 60 dias. As castanhas foram obtidas por doação da Agropecuária Aruanã provenientes do estado do Amazonas, sendo todas de um único lote. As castanhas foram analisadas na Universidade de São Paulo quanto ao teor de selênio e o seu consumo foi controlado pela pesquisadora.

4.3. ANÁLISES PROPOSTAS NO ESTUDO

4.3.1. AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

4.3.1.1. PESO

Para aferição do peso, utilizou-se uma balança antropométrica com graduação de 100g, onde as participantes foram posicionadas no centro da balança, descalças, usando a menor quantidade de roupa possível, em posição ereta e com os braços estendidos ao longo do corpo.

4.3.1.2. ESTATURA

A estatura foi aferida utilizando um antropômetro contido na própria balança, onde a participante permaneceu com os pés juntos, descalços e braços estendidos ao longo do corpo, olhando para a linha do horizonte com a cabeça formando um ângulo de 90°.

4.3.1.3. ÍNDICE DE MASSA CORPÓREA

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

4.3.1.4. IMPEDÂNCIA BIOELÉTRICA

Esta medida foi realizada com as pacientes deitadas em decúbito dorsal, estando pernas e braços afastados do corpo. Após a assepsia da pele, foram colocados dois eletrodos (um distal e outro proximal) no pé direito e dois eletrodos na mão direita.

4.3.2. AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR

Para avaliação do consumo alimentar foi utilizado o método do recordatório alimentar de 24h de três dias, sendo dois dias durante a semana e mais um dia no final de semana, no momento inicial da pesquisa e após o período de intervenção.

A análise dos alimentos consumidos pelas participantes da pesquisa, foi feita por meio do *software NutWin*, do Departamento de Informática da Escola Paulista de Medicina/UNIFESP e a adequação das dietas realizada por meio das DRIs de 2002 (IOM, 2002), considerando os macronutrientes e o selênio.

4.3.3. COLETA DOS MATERIAIS BIOLÓGICOS E AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

4.3.3.1. SANGUE

Amostras de 20 mL de sangue foram colhidas utilizando materiais e utensílios descartáveis e no período da manhã, estando as participantes entre 10 e 12h de jejum. As amostras foram destinadas à análise de selênio, marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo, polimorfismo e expressão gênica da GPx1. Após a coleta, o plasma foi separado do sangue total por centrifugação a 3000 x g por 15 minutos a 4°C, sendo acondicionado em tubos de polipropileno (EPPENDORFS) previamente desmineralizados e em seguida 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 salina a 0,9%, homogeneizada lentamente por inversão e centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado. Após a última centrifugação, a solução salina foi aspirada, a massa de eritrócito foi cuidadosamente extraída com micropipeta e colocada em tubos de polipropileno (EPPENDORFS) desmineralizados, e armazenada à -80 °C até o momento da análise.

4.3.3.2. URINA DE 24 HORAS

As amostras de urina foram coletadas em frascos previamente desmineralizados e entregues às participantes para que a coleta fosse realizada em domicílio. As participantes foram orientadas quanto à forma correta de coletar e armazenar a urina. O material biológico foi entregue à pesquisadora no dia da coleta de sangue, sendo em seguida o volume total medido com auxílio de uma proveta. Separou-se uma alíquota total de 33 mL de urina, distribuída em 3 tubos Falcon previamente desmineralizados e em 4 microtubos de polipropileno. As alíquotas dos tubos Falcon foram armazenadas a -20°C para avaliação da concentração de selênio e os microtubos de polipropileno, à - 80°C, para posterior análise de creatinina e 8-isoprostanos.

4.3.3.3. CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO

Todo o material utilizado (vidrarias, plásticos, ponteiras, tubos Falcon e de polipropileno, etc.) para as análises de selênio foram desmineralizados, utilizando um banho de ácido nítrico a 30%, por pelo menos 12 horas, e enxaguados 10 vezes consecutivas com água nanopura, minimizando assim a contaminação por minerais.

4.3.4. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE AVALIAÇÃO DO SELÊNIO

4.3.4.1. DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO NO PLASMA, ERITRÓCITOS E URINA

As amostras de plasma, eritrócitos e urina foram previamente digeridas via úmida ácida, ou seja, nos tubos de vidro pirex contendo as amostras foram adicionados 5 mL de ácido nítrico 68% P.A. (MERCK) e mantidas em repouso durante a noite. Em seguida,

a digestão foi realizada em bloco digestor com temperatura inicial de 50°C, aumentada gradativamente até alcançar, no máximo, 150°C, a fim de eliminar as substâncias orgânicas e reduzir o selênio presente na solução para selênio IV. O fim dessa etapa ocorre quando as amostras têm seu volume bastante reduzido e sua coloração modificada de amarelo citrino para transparente, excetuando o material eritrocitário, que permanece ligeiramente amarelo. A selênioquímica, foram acrescidas de 5 mL de HCL 1,2N e aquecidas durante duas horas a uma temperatura de 100°C. Após este procedimento essas soluções foram diluídas para 25 mL com água deionizada e submetidas à leitura de selênio, por meio do método de espectrometria de absorção atômica por geração de hidretos acoplados à cela de quartzo (HGQTAAS) (modelo Z5000, Hitachi, Tokio, Japão) (HAO *et al.*, 1996; SABÉ; RUBIO; GARCÍA-BELTRAN, 2000; ROMERO *et al.*, 2001). Os resultados foram expressos em µg/L.

4.3.5. AVALIAÇÃO DO GRAU DE ESTRESSE OXIDATIVO

4.3.5.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

4.3.5.1.1. GLUTATIONA PEROXIDASE

A análise da atividade da GPx, no sangue total e nos eritrócitos, foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Paglia e Valentine (1967), em um analisador bioquímico Labmax 240, usando um kit disponível comercialmente (Ransel; Randox Laboratories, UK). Essa técnica baseia-se na oxidação da glutatona pelo peróxido de hidrogênio. Na presença da glutatona redutase e NADH, a glutatona oxidada é prontamente convertida à forma reduzida juntamente com a oxidação de NADH (reduzindo NADPH a NADPH⁺). Também foi determinada a concentração de hemoglobina, uma vez que a atividade da enzima foi expressa em U/g de hemoglobina.

4.3.5.1.2. SUPERÓXIDO DISMUTASE

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada nos eritrócitos pelo método *in vitro*, em um analisador bioquímico Labmax 240, por meio de um kit disponível comercialmente (Ransod; Randox Laboratories, UK), seguindo o protocolo do fabricante.

Este método emprega a xantina oxidase como geradora de radicais superóxido (O_2^-). Esses radicais reagem com o 2-(4-iodofenil)-3-(4 nitrofenol)-5-cloreto de feniltiazol (INT), formando o composto vermelho formazan. A atividade da superóxido dismutase é calculada por meio do grau de inibição desta reação. Os eritrócitos foram diluídos 300 vezes em tampão fosfato 0,01M (pH 7,0), de forma que o percentual de inibição ficasse dentro da faixa de 30% a 60%. Foram preparados, além da amostra, o substrato misto, o tampão, a xantina oxidase e o padrão. Os resultados foram expressos em U/g de hemoglobina.

4.3.5.1.3. *GLUTATIONA PEROXIDASE 1*

A concentração da enzima GPx1 foi realizada nos eritrócitos por meio do ensaio ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), em um leitor de microplacas Biotech Synergy H1, usando um kit disponível comercialmente (Abnova) e específico para material biológico de humanos. A determinação foi realizada segundo as orientações do fabricante, com algumas modificações: amostras de eritrócitos foram diluídas 40 vezes em tampão fornecido pelo kit; tempo de incubação após a adição do substrato foi ajustado para 15 minutos e os valores de densidade óptica foram monitorados para a determinação exata desse tempo. Em seguida, a leitura da concentração da GPx1 foi feita a 450 nm e dentro de 20 minutos da adição da solução *stop*. As absorbâncias das amostras foram plotadas em uma curva padrão de concentrações conhecidas e considerando o fator de diluição usado para o cálculo. Os resultados foram expressos em ng/mL.

4.3.5.2. *DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL - MÉTODO ORAC (CAPACIDADE ABSORÇÃO DE RADICAIS DE OXIGÊNIO)*

A capacidade antioxidante total do plasma foi avaliada através do método ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*) e determinada de acordo com Prior e colaboradores (2003). Amostras de plasma humano estocadas a $-80^{\circ}C$ foram desproteinizadas pela adição de 400 μL de ácido perclórico 0,5M, homogeneizadas em vórtex por 5 segundos e centrifugadas a 14000 rpm por 5 minutos a $20^{\circ}C$ para a retirada do sobrenadante. Em seguida, as amostras foram diluídas 10 vezes em tampão fosfato

75 mM pH 7,4. Dando prosseguimento, 25 µL de plasma, 150 µL de fluoresceína (40nm) em tampão fosfato 75 mM e 25 µL de 2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH – 153 nM) em água foram adicionados na microplaca, sendo apenas o primeiro realizado manualmente. A solução de AAPH foi preparada no momento da análise e antes de sua adição, a placa foi incubada a 37 °C. O tampão fosfato foi utilizado como branco e como padrão, preparou-se solução de Trolox em tampão fosfato, para o preparo da curva, nas seguintes concentrações: 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM. Após a adição de todos os reagentes na placa, a fluorescência foi lida a cada minuto, por 80 minutos e usados os filtros de emissão de 520 nm e excitação de 485 nm. A leitura foi obtida por meio de um leitor de microplaca automatizado Biotech Synergy H1 e os reagentes adicionados através do uso de dispensadores acoplados ao equipamento. A capacidade antioxidante foi determinada pela curva resultante da perda de fluorescência da fluoresceína versus a concentração de antioxidante e foi expressa em µmol equivalentes de Trolox/ mL de plasma. As determinações foram realizadas em triplicata.

4.3.5.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO URINÁRIA DE ISOPROSTANOS (8-ISO PGF2)

Foi determinada por ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) com kit 8-isoprostane EIA® (Cayman Chemical Co). Amostras de urina, previamente estocadas à -80°C em tubos de polipropileno contendo BHT 1%, foram centrifugadas a 3000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante, utilizado para a dosagem proposta. O procedimento utilizado na análise foi de acordo com o protocolo do fabricante, sendo a leitura das placas efetuada em espectrofotômetro Biotech Synergy H1, com comprimento de onda de 412 nm. As determinações foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em pg/mL urina.

4.3.5.4. DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS

A determinação das IL-6, IL-10, TNF-α, IL-1β, IL-2, VCAM, ICAM, PAI-1 e sE-selectina 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, PAI-1 e sE-selectina foram expressos em ng/mL e IL-6, IL-10, TNF- α , IL-1 β , e IL-2 foram expressos em pg/mL.

4.3.5.5. DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO PRO198LEU DA ENZIMA GPX1

A extração do DNA foi realizada através do kit Purelink Genomic DNA, da Invitrogen, Life Technologies. O DNA extraído foi aliquotado e armazenado à -20°C em microtubos de polipropileno autoclavados. Posteriormente, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop, sendo o resultado expresso em ng/mL. Utilizou-se a razão 260/280 superior a 1,7 e inferior a 2,0, como parâmetro de qualidade do DNA. Amostras com a razão abaixo desse valor foram reextraídas. Em seguida, o DNA genômico de todas as amostras foi ajustado em água autoclavada para uma concentração de 10 ng/mL e volume final de 20 μ L. Um total de 2 μ L de DNA foi usado para a reação em cadeia da polimerase e 18 μ L de solução contendo o master mix específico para o ensaio de genotipagem (Taqman® genotyping master mix – Applied Biosystems®) com sondas de hidrólise (Custom Taqman® SNP Genotyping Assay, Human; Alelo 1: VIC/MGB-NFQ; Alelo 2: FAM/MGB-NFQ; *part number* 4331349) e primers específicos para o SNP (rs 1050450) estudado. Foram utilizados o *primer forward*- CATCGAAGCCCTGCTGTCT e o *primer reverse*- CACTGCAACTGCCAAGCA para a confecção da sonda.

A genotipagem da população do estudo foi realizada pelo sistema TaqMan SNP Genotyping Assays, da Applied Biosystems, utilizando as condições de termociclagem recomendadas pelo fabricante. Este sistema é baseado na análise *end-point* da PCR (Real time – PCR, ou Reação em cadeia da Polimerase em Tempo Real).

4.3.5.6. EXPRESSÃO GÊNICA DA GPX1

A extração do mRNA foi realizada através do Kit RiboPure – Blood Kit (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante. O RNA assim obtido foi tratado com DNase I para remover a possível contaminação com o DNA genômico. O RNA foi quantificado por meio da leitura da absorbância em espectrofotômetro Nanodrop, em

260nm de comprimento de onda. O grau de pureza da amostra foi avaliado através da relação 260/280, sendo considerados ideais os valores entre 1,8 e 2,0. Já a transcrição reversa do RNA total para cDNA foi realizada por meio da enzima MultiScribe™ MuLV (Invitrogen, Carllsbad, CA, USA) com o uso do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Invitrogen™) para um volume final de 40 µL e seguindo as condições de termociclagem sugeridas pelo fabricante.

Amostras de cDNA foram ajustadas para uma concentração de 20 ng/µL e volume final de 20 µL. O preparo do mix de reação de PCR foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante utilizando o master mix universal 2x (Taqman® Universal master mix II), 20x Taqman Gene Expression assay e água autoclavada. Em seguida, foram adicionados 18,5 µL dessa solução e 1,5 µL de cada amostra de cDNA em microplaca de 96 poços. As mesmas condições foram feitas para o assay do gene de referência (β -actina).

O método utilizado para a análise de expressão gênica foi o de $\Delta\Delta CT$, sendo anteriormente validada a eficiência da reação de PCR por meio da realização de curva seriada de diluição de 10 vezes em um *pool* de amostras de cDNA. A eficiência da reação de amplificação da GPx1 e da β -actina foi de 90%, ou seja, de acordo com o postulado na literatura $100\pm 10\%$. Os primers e sondas utilizados nas reações qRT-PCR já estavam inventoriados pela empresa Life Technologies. As reações de PCR em tempo real (qRT-PCR) foram realizadas em triplicata em placas específicas de 96 poços e por meio do equipamento *Step One Plus* que utiliza o sistema para detecção de produtos de amplificação “Taqman® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, USA). Seguiu-se o protocolo recomendado pelo fabricante para as condições de termociclagem do método do $\Delta\Delta CT$. A análise quantitativa da expressão relativa do RNAm foi calculada usando-se o método comparativo Ct (“*cycle threshold*”).

4.3.5.7. CARACTERIZAÇÃO DA CASTANHA-DO-BRASIL (BERTHOLLETIA EXCELSA H.B.K.)

As castanhas utilizadas neste estudo foram doadas pela empresa Agropecuária Aruanã S/A (Itacotiara – AM). Ao serem recebidas pelo Laboratório de Nutrição e Minerais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, as castanhas foram imediatamente armazenadas em freezer a -20 °C e mantidas na própria

embalagem fornecida pelo fabricante até o momento da análise. As castanhas encontravam-se embaladas a vácuo, em embalagem metalizada e protegidas da ação da luz e do ar.

Para a determinação da concentração de selênio e da composição centesimal, foi realizado um pool por meio de amostragem aleatória. Em seguida, as castanhas foram trituradas e depois liofilizadas para a quantificação do percentual de umidade. A amostra seca foi utilizada para a determinação da concentração de selênio, cinzas, lipídios e proteína. O carboidrato foi estimado por diferença.

A concentração de selênio foi realizada por meio do método de espectrofotometria de absorção atômica por geração de hidretos acoplados a cela de quartzo (HGQTAAS), tendo sido utilizadas 50 mg de castanha-do-brasil, previamente liofilizadas. A análise foi realizada em triplicata e os resultados foram expressos em $\mu\text{g}/100\text{g}$ de alimento *in natura*.

Para o controle da metodologia foi utilizado o material de referência certificado pelo *National Institute of Standard & Technology* (NIST), *Wheat Flour Standard Reference Material 1567^a*. A análise foi por digestão via úmida ácida, seguindo os mesmos padrões que as 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 $\mu\text{g}/\text{L}$ e com 10% de HCL 1,2 N.

A determinação das cinzas e lipídios foi realizada segundo as normas do Instituto Adolfo Lutz, e das proteínas, conforme proposto pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC). A fração Nifext relacionada ao extrato livre de nitrogênio foi determinada por meio da diferença das porcentagens obtidas anteriormente (umidade, cinzas, lipídeos totais e proteínas).

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software Statistica versão 8.0. Inicialmente foram testadas a normalidade através do teste W de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade de variância, com o teste de Levene considerando a população na primeira fase do estudo segundo o grau de atividade da doença. As pacientes foram alocadas em três grupos: remissão, atividade leve e atividade moderada/intensa. As variáveis foram classificadas como independentes, sendo aplicada a análise de variância

(ANOVA) quando as variáveis apresentavam normalidade e homogeneidade ou apenas homogeneidade e, em caso contrário, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Não foi observada diferença estatística entre os grupos, considerando todas as variáveis do trabalho. Desse modo, a população foi realocada em dois grupos: antes e após a suplementação com castanha-do-brasil. Foram construídas tabelas de medidas resumo de cada uma das variáveis de interesse e foram comparados, por meio do teste-t pareado os valores nos instantes T1 e T0 das variáveis de estresse oxidativo e de inflamação, a fim de verificar se houve alguma diferença. Por fim, foi realizada uma análise de correlação.

Os dados referentes à concentração de selênio, marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo foram testados. A normalidade e homogeneidade dos dados foram verificadas e, em seguida, utilizou-se o teste t de Student para amostras paramétricas ou o de Wilcoxon, para as não paramétricas. Nesta etapa, foi verificado se havia diferenças significativas entre todas as variáveis nas duas fases do estudo. A seguir, os dados foram separados de acordo com os genótipos relativos ao polimorfismo Pro198Leu. Utilizou-se a diferença dos valores entre os instantes T1 e T0 para cada variável do estudo. Os dados foram apresentados na forma de média e desvio padrão dessa diferença e também por meio do intervalo de confiança. A homogeneidade de variância foi testada por meio do teste de Levene. Nestes casos, as variáveis foram classificadas como independentes e ambos os testes t de student e Mann-Whitney foram usados de acordo com a distribuição dos dados e a presença/ausência de homogeneidade de variâncias. Para a expressão da GPx1, a fase após a suplementação foi comparada à fase antes da suplementação entre os grupos de genótipos, para se avaliar o efeito obtido com a intervenção. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado através do teste de Qui-Quadrado com o uso da calculadora para marcadores bialélicos (RODRIGUEZ, GAUNT, DAY, 2009). Foi adotado como padrão o nível de significância de 5%. Quando este nível apresentou-se entre 6-10%, os resultados foram considerados como marginalmente significativos.

Os valores de ingestão dos macronutrientes e selênio foram ajustados pelo valor energético da dieta pelo método residual de Willet (1998) para o instante T1. Para tanto, os valores de ingestão de nutrientes obtidos pelos recordatórios alimentares de 24h foram testados quanto a sua distribuição normal através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Para verificar a existência de correlação entre os nutrientes e a energia, foi

aplicada a correlação linear de Pearson. Em seguida, foi realizada a análise de regressão linear simples, sendo considerada a energia como variável independente e cada nutriente como variável dependente. Os valores dos nutrientes estimados, residuais e constantes foram obtidos por meio do β_0 e β_1 , sendo posteriormente ajustados. Ao final, a média dos valores de ingestão de nutrientes permaneceu inalterada. Apenas houve uma redução dos valores dos desvios-padrão.

Na etapa inferencial, as técnicas foram utilizadas com o objetivo de avaliar se os valores das variáveis de estresse oxidativo e de inflamação apresentavam diferenças entre os instantes T1 e T0, considerando o fator reumatoide, DAS-28, genótipo e variáveis de alimentação (energia, carboidrato, proteína, lipídio e selênio) como covariáveis em modelos de regressão linear múltipla. Inicialmente, foram comparados, por meio do teste-t pareado, os valores nos instantes T1 e T0 das variáveis de alimentação, a fim de verificar se houve alguma diferença na dieta dos pacientes. Os ajustes dos modelos foram verificados, assim como foi verificada a normalidade por meio de envelope simulado e a homoscedasticidade por meio de gráficos de diagnóstico. Com relação à significância das covariáveis, utilizou-se o teste de Wald, com nível de significância de 5%. Para a análise multivariada de correlação canônica e de regressão linear múltipla, foi utilizado o programa R *for windows*®, versão 3.0.1.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO DA CASTANHA-DO-BRASIL

A castanha-do-brasil foi caracterizada quanto à concentração de selênio e composição centesimal. Amostras aleatórias do lote fornecido em julho de 2010, pela Agropecuária Aruanã (Amazonia), foram utilizadas para a realização das análises propostas com a finalidade de se determinar a quantidade de castanha a ser oferecida às participantes do estudo. Para tanto, essas determinações foram feitas antes do período de intervenção.

A concentração média ($\pm$ DP) de selênio por grama de castanha foi de $72,6 \pm 2,4$ μ g. Cada unidade pesava aproximadamente 5 gramas, resultando em uma quantidade aproximada de 363 μ g de selênio por unidade da nóz. Este valor é bem superior às recomendações diárias de ingestão (RDAs), que são de 55 μ g/dia (IOM, 2000). Entretanto, não ultrapassam os valores superiores toleráveis de ingestão (UL), os quais poderiam levar a riscos de toxicidade. Neste estudo, a concentração de selênio na castanha-do-brasil foi superior ao encontrado por Cominetti e colaboradores (2011) (58,1 μ gSe/g) e inferior ao encontrado por Pires (2012) (115,5 μ gSe/g) e Chunhieng e colaboradores (2004) (126 μ gSe/g). As castanhas analisadas nestes trabalhos foram todas provenientes da região amazônica, mas de diferentes safras. Variações ambientais e climáticas (GERLA; SHARIF; KOROM, 2011), assim como a maturidade da planta, a umidade e a posição da nóz na planta são fatores que podem ter afetado o teor de selênio na amêndoa (YANG, 2009).

A tabela 1 apresenta os dados referentes à composição centesimal observada no presente estudo e em outros trabalhos realizados em nosso laboratório, para efeito de comparação.

Tabela 1. Composição centesimal da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) proveniente de Itacotiara – AM.

Nutrientes (%) e energia (Kcal/100g)	Média ± desvio-padrão		
	Presente estudo	Pires (2012)*	Cominetti (2009)**
Energia	784,5	732	733,5
Umidade	2,39 ± 0,04	0,4	1,8 ± 0,2
Cinzas	3,2 ± 0,1	3,3	3,2 ± 0,05
Proteína	14,81 ± 0,37	15,9	15,14 ± 1,16
Lipídios	76,79 ± 0,06	69,4	70,71 ± 0,29
Carboidrato	8,5 ± 0,32	10,9	9,15

Resultados expressos em média e desvio padrão (±DP).

5.2. ESTUDO DA SUPLEMENTAÇÃO COM CASTANHA-DO-BRASIL EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE

5.2.1. PARTICIPANTES

As participantes com artrite reumatoide foram recrutadas no período de março de 2011 a outubro de 2012. O prontuário eletrônico das pacientes foi utilizado como uma pré-seleção, considerando os fatores de inclusão propostos no trabalho. Estas deveriam estar estáveis quanto ao tratamento medicamentoso em pelo menos três meses e não possuir doenças crônicas que comprometessem a biodisponibilidade de selênio, além da não utilização de suplementos vitamínico-minerais. Após a fase de pré-seleção, foi realizado um contato telefônico para confirmação dos dados e também o convite para a participação do estudo. Das 70 pacientes que se enquadraram nos critérios estabelecidos, 59 aceitaram fazer parte da pesquisa. Destas, 46 concluíram o protocolo experimental. Durante o período de avaliação, 14 participantes não compareceram após o período de suplementação com castanha-do-brasil. As razões foram: internação hospitalar cirúrgica (n=2); desistência (n=4), alta do setor de reumatologia da UNIFESP (n=1); possível intolerância intestinal (n=1, relatada pela paciente) e mudança de telefone (n=6) que dificultou o acompanhamento e a confirmação da data da coleta sanguínea. A tabela 2 mostra o perfil das participantes com artrite reumatoide.

Tabela 2. Distribuição das pacientes com artrite reumatoide, segundo os aspectos socioeconômicos e clínicos. São Paulo, 2013.

Variáveis	n	%
<u>Dados socioeconômicos</u>		
<i>Escolaridade (anos)</i>		
Ensino fundamental incompleto	19	47
Ensino fundamental completo	07	17
Ensino médio incompleto	01	3
Ensino médio completo	8	20
Ensino superior incompleto	3	8
Ensino superior completo	2	5
<u>Renda familiar</u>		
< 1 s.m	1	3
1-2 s.m	17	46
2-3 s.m	12	32
3-5 s.m	4	11
> 5 s.m	3	8
<u>Dados Clínicos</u>		
<i>Idade do diagnóstico (anos)</i>		
< 16	5	12
17-25	4	10
26-32	7	17
33-41	10	24
42-50	9	21
51-59	6	14
> 60	1	2
<u>Tempo da doença (anos)</u>		
0-10	14	32
11-20	13	30
21-30	10	23
31-40	4	9
41-50	1	2

51-60	2	4
<u>Fator reumatoide</u>		continua
Positivo	36	78
Negativo	6	13
AR não específica	4	09
<u>Grau de atividade da doença</u>		
Remissão	18	46
Atividade leve	9	23
Atividade moderada	10	26
Atividade intensa	2	5
<u>Classificação funcional (ACR, 1991)</u>		
Sem limitação	23	62
Limitação de atividades recreativas/lazer	13	35
Capaz de realizar higiene pessoal, mas limitado	1	3
<u>Erosões ósseas</u>		
Presença	31	70
Ausência	13	30
<u>Prática de atividade física</u>		
Sim	16	36
Não	29	64
<u>Modalidades de atividade física</u>		
Caminhada	11	69
Ginástica/musculação	1	6
Hidroginástica	1	6
Dança	2	6
Yoga	1	3

Os dados socioeconômicos apresentados na tabela 2 foram obtidos por meio da aplicação de questionário no dia da primeira coleta sanguínea. Apesar de uma prevalência de baixa escolaridade e de baixa renda familiar no grupo estudado, a artrite reumatoide é uma doença que atinge as mais diversas classes sociais e níveis

educacionais.

As participantes do estudo apresentaram média de idade de $55,2 \pm 10,9$ anos, tendo sido diagnosticadas, em sua maioria, entre a terceira e quinta década de vida. Esses dados são semelhantes ao constatado por Sukka e colaboradores (2009) em populações brasileiras (52,3 anos) e na média geral de idade (56,2 anos) de 25 países do mundo.

O diagnóstico da doença baseou-se nos critérios estabelecidos pelo colégio americano de reumatologia abrangendo uma associação de uma série de sintomas e sinais clínicos, achados laboratoriais e radiográficos, sendo o fator reumatoide um dos parâmetros utilizados (PINCUS & SOKKA, 2003). No presente trabalho, foi encontrado fator reumatoide positivo em 78% dos casos, condizente ao encontrado na literatura (SOKKA *et al.*, 2009). Por apresentar baixa especificidade, esse biomarcador não deve ser usado isoladamente mas, se presente em altos títulos, indica um pior prognóstico da doença reumática (SHMERLING & DELBANCO, 1991).

Outros marcadores são rotineiramente usados para avaliar o curso e a gravidade da doença e incluem: a idade do diagnóstico, a atividade da doença, a classificação funcional e a presença ou não de erosões ósseas (SOKKA *et al.*, 2009). O início precoce (< 16 anos) e a presença de erosões ósseas são indícios de mau prognóstico (PINCUS & SOKKA, 2003) e foram observados em 12% e 70% dos casos, respectivamente. A análise radiográfica permite identificar a presença de erosões ósseas e é considerada um dos métodos mais objetivos para avaliar a gravidade da AR, sendo capaz de detectar alterações ao longo do tempo (SILVA *et al.*, 2006).

Aplicando o *Disease Activity Score* (DAS28) e a classificação funcional proposta pelo ACR (2002), percebe-se que 46% das participantes estavam em remissão da doença; 62% não apresentavam limitação para a realização das atividades diárias e 63% conviviam com a doença dentro da faixa de 0-20 anos. Ainda, o valor médio do DAS-28 foi de $3,05 \pm 1,10$, semelhante ao observado em países como Dinamarca, Finlândia, Estados Unidos, Grécia e Espanha (SUKKA *et al.*, 2009). A prática de atividade física foi relatada por 36% das participantes, sendo a caminhada a modalidade mais frequente no grupo.

Dentre os medicamentos utilizados para o tratamento da artrite reumatoide, as drogas modificadoras do curso da doença (DMCD) sintéticas foram as mais frequentemente utilizadas e estavam, muitas vezes, associadas a outras drogas,

conhecidas como biológicas (abatecepte, inlixmabe, etanercepte, entre outras) e a agentes anti-inflamatórios como a prednisona. O ácido fólico foi bastante utilizado em pacientes em tratamento com metotrexato e leflunomida; assim como o carbonato de cálcio e o colecalciferol e vitamina D para aqueles indivíduos em uso de prednisona (Tabela 3).

Tabela 3. Medicamentos utilizados pelas pacientes com AR. São Paulo, 2013

Classe	n*	%
DMCD	41	100
<u><i>Sintético</i></u>		
Metotrexato	22	53,7
Leflunomida	21	51,2
Cloroquina	03	7,3
<u><i>Biológico</i></u>	13	31,7
Ácido fólico	13	31,7
Prednisona	15	36,6
Ciclobenzaprina	03	7,3
Carbonato de cálcio	18	43,9
Colecalciferol	19	46,3
Alendronato	15	36,6
Vitamina D	12	29,3

Legenda: *n= número de participantes; ∞DMCD- Drogas modificadoras do curso da doença. Dados obtidos dos prontuários eletrônicos de 41 participantes.

Além da AR, as pacientes deste estudo apresentaram outras co-morbidades, comprometendo ainda mais a qualidade de vida dessas pessoas. Nesta pesquisa, 82,6% das participantes eram hipertensas e 45,6% e 32,6% apresentaram diagnóstico de osteoporose e fibromialgia, respectivamente (Figura 2).

Figura 2. Distribuição percentual de doenças associadas em pacientes com AR. São Paulo, 2013.

5.2.2. AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

A avaliação nutricional é importante para a identificação de problemas e/ou inadequações do estado nutricional em qualquer fase da vida e, principalmente, nas enfermidades. O aumento da gordura corporal total e/ou visceral representa um fator de risco para o desenvolvimento da síndrome metabólica e de doenças cardiovasculares (MARTINS *et al.*, 2011) e, em se tratando da artrite reumatoide, é imprescindível analisar estes parâmetros de forma a reduzir o risco das complicações associadas à patologia.

Para este trabalho, utilizamos o IMC e a análise de Bioimpedância elétrica para verificar o estado nutricional das participantes. O IMC é um parâmetro bastante usado, por ser rápido e de fácil custo, no entanto apresenta alguns problemas, existindo diversos pontos de corte para classificá-lo na população adulta e idosa. No entanto, para este estudo utilizaremos pontos de corte para sobrepeso (IMC > 23) e obesidade (IMC > 28) específicos para indivíduos com artrite reumatoide e segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), para classificar as pacientes que se enquadravam abaixo do IMC de 23. Stavropoulos-Kalinoglu e colaboradores (2007) estabeleceram uma nova classificação para o IMC, baseada na caquexia reumatoide. Essa condição é caracterizada pela perda de massa magra e aumento da gordura corporal acompanhada de pouca ou nenhuma perda de peso (STAVROPOULOS-KALINOGLU, *et al.*, 2007).

Já a bioimpedância (BIA) tem sido demonstrada como um método alternativo para estimar a porcentagem de gordura corporal, apresentando resultados bastante semelhantes aos obtidos pela absorptometria por dupla emissão de raios x (DEXA - método padrão-ouro). Entretanto, a avaliação deve ser realizada em indivíduos que estejam dentro do intervalo de normalidade de gordura corporal total, uma vez que a BIA tende a superestimar a porcentagem de gordura corporal em torno de 4,40% em mulheres magras e subestimar em 2,71% em mulheres obesas. Consideramos o ponto de corte acima de 32% como fator de risco para a ocorrência de complicações associadas à obesidade (MARTINS *et al.*, 2011).

Os resultados da avaliação nutricional das pacientes com artrite reumatoide encontram-se na Tabela 4. De acordo com o teste t de Student para amostras pareadas, percebe-se que não houve diferença significativa entre as duas fases ($p > 0,05$).

Tabela 4. Dados antropométricos das pacientes com artrite reumatoide, segundo o tempo de avaliação. São Paulo, 2013.

Variável	T0	T1
Peso	65,5 ± 10,9	63,8 ± 10,9
Estatura	1,56 ± 0,10	1,56 ± 0,10
IMC	26,3 ± 3,8	26,1 ± 3,8
%GC	35,3 ± 6,0	34,3 ± 6,1
%MM	73,9 ± 3,1	74,1 ± 2,8

Legenda: IMC¹- índice de massa corporal; %GC²- gordura corporal; % MM³- massa muscular; T0- tempo inicial do estudo (antes da suplementação); T1- Tempo após a suplementação com 1 nóz de castanha-do-brasil. Dados apresentados em média ± desvio-padrão. Dados não significantes ($p > 0,05$). Valor de p calculado pelo teste *t-Student* para amostras pareadas.

Do total das participantes, 60% apresentaram % de gordura corporal (GC) acima de 32%. Para o IMC, 60% estavam com sobrepeso, 26,7% com obesidade e 13,3% com IMC adequado para a idade e condição de saúde e nenhuma delas encontrava-se na faixa de magreza (Tabela 4). Esses resultados devem ser usados com cautela devido à presença bastante comum de edemas o que pode superestimar os valores de massa muscular e, conseqüentemente, de peso corpóreo. Desse modo, determinou-se a albumina sérica. A albumina sérica, quando em baixa concentração, geralmente está associada à desnutrição devido a um déficit em sua produção (que pode ocorrer em doenças crônicas) ou pode ser decorrente da disfunção renal. A hipoalbuminemia

também pode refletir a existência de reação de fase aguda mediada por citocinas durante o estado inflamatório. No presente estudo, todas as participantes apresentaram concentrações adequadas de albumina, o que sugere a ausência de desnutrição e de caquexia reumatoide na população estudada. Os valores séricos médios foram $4,35 \pm 0,26$ e $4,05 \pm 0,22$ g de albumina/dL nos dois tempos do estudo (T0 e T1), respectivamente e estão dentro da faixa de referência (3,5 a 5,5 g/dL).

A caquexia reumatoide é uma complicação nutricional decorrente do processo inflamatório da artrite. Apesar de os mecanismos exatos que levam a esse quadro não estarem totalmente esclarecidos, alguns fatores parecem estar implicados e incluem a produção exacerbada de citocinas inflamatórias, a redução da ação da insulina periférica e a inatividade física. Uma das características da caquexia reumatoide é o elevado gasto energético de repouso, o qual pode ser causado pelo desbalanço entre a síntese e a degradação de proteínas decorrente da inflamação. A redução da ação da insulina ainda não tem sua causa bem definida, mas sugere-se que o TNF- α , produzido tanto pelo músculo esquelético como pelos adipócitos, possa interferir na via de sinalização desse hormônio. Sendo assim, o TNF- α promove a caquexia indiretamente, atuando como mediador da resistência à insulina na AR. A redução dos pontos de corte do IMC e a reclassificação de sobrepeso e obesidade em pacientes com AR baseada nestas possíveis alterações metabólicas podem ser importantes na investigação de fatores de risco para doenças cardiovasculares e levar a uma diminuição do número de casos de mortalidade entre esses indivíduos. (STAVROPOULOS-KALINOGLU, *et al.*, 2007).

5.2.3. AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR

Para avaliar a ingestão de macronutrientes e selênio, foi realizado o recordatório alimentar de 24h em três dias não consecutivos, sendo um dia de final de semana. A tabela 5 mostra os resultados referentes à ingestão de macronutrientes e energia em relação ao tempo de avaliação, calculados com o software *Nutwin*. Foram excluídas da avaliação as participantes que apresentaram apenas 1 ou 2 recordatórios alimentares. A adesão foi de 89,1%.

Tabela 5. Valores de ingestão de energia e macronutrientes, segundo o tempo de avaliação.

Variável	T0 (n=41)	T1 (n=41)
Energia (kcal)	1443,3 ± 520,3	1431,8 ± 390,1
Proteína (g)	65,75 ± 9,48	63,86 ± 5,71
Carboidrato (g)	211,97 ± 23,88	197,8 ± 14,8
Lipídio (g)	45,5 ± 4,8	46,3 ± 6,3

Legenda: T0: antes da suplementação; T1: após a suplementação com uma nóz de castanha-do- -brasil. Dados apresentados na forma de média ± desvio-padrão. Dados não significativos ($p>0,05$). Aplicado o teste t de *Student*-pareado.

De acordo com o *Institute of Medicine* (IOM, 2003), a EER (Necessidade Estimada de Energia) pode ser determinada por meio da fórmula: $EER \text{ (kcal)} = 354,1 - (6,91 \times \text{idade [a]}) + \text{coeficiente de atividade física} \times (9,36 \times \text{peso [kg]} + 726 \times \text{estatura [m]})$. Recomenda-se que o uso da equação para indivíduos eutróficos seja estendido para aqueles com sobrepeso e obesidade (IOM, 2003). Para os cálculos, considerou-se um coeficiente de atividade física de 1,0 para os indivíduos sedentários e de 1,12 para aqueles que praticam atividade física leve.

O valor energético total (VET) médio ($\pm DP$) antes e após a suplementação com castanha-do-brasil foi de $1438,2 \pm 511,3$ e $1417,0 \pm 391,8$ kcal, respectivamente. Já os do EER foram de $1883,4 \pm 141,7$ e $1881,1 \pm 143,6$ kcal. Aplicando o teste t de *Student*, observou-se que tanto os valores de VET quanto os de EER não diferiram estatisticamente entre ambas as fases do estudo (Figura 3). Entretanto, os valores médios de VET antes e após o período de intervenção foram menores do que a EER ($p<0,01$ e $p<0,05$; respectivamente).

Legenda: T0: antes da suplementação com castanha-do-brasil; T1: após a suplementação; VET- Valor Energético Total; EER – Necessidade Estimada de Energia. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio-padrão; *p-valor < 0,05: diferenças significativas do EER em relação ao VET no T0; **p-valor < 0,05: diferenças significativas do EER em relação ao VET no T1. Não foram observadas diferenças significativas entre os tempos T0 e T1, quanto ao VET e EER.

Figura 3. Valores médios de energia total obtidos dos recordatórios alimentares de 24h e de Necessidade Média estimada (EER) segundo as recomendações propostas pelo IOM (2003), antes e após a suplementação com castanha-do-brasil.

Os valores médios da ingestão de carboidratos, proteínas e lipídeos foram ajustados pela variabilidade intra e interpessoal. Os dados assim obtidos foram usados para o cálculo do % de adequação e comparados às referências preconizadas pelo IOM (2003), ou seja, 45 a 65% do VET para carboidratos, 10 a 35% para proteínas e, 20 a 35% para lipídeos.

A figura 4 mostra a contribuição dos macronutrientes em relação ao VET. Os percentuais de consumo de carboidratos, proteínas e lipídeos em relação ao VET nas duas fases do estudo (T0 e T1) foram de $64,68 \pm 19,7$ e $58,47 \pm 15,05\%$; $20,36 \pm 6,73$ e $14,97 \pm 1,35\%$; $31,95 \pm 12,67$ e $31,54 \pm 11,27\%$, respectivamente e estavam adequados de acordo com os valores de referência preconizada pelas DRIs (2005), embora a ingestão energética esteja abaixo das necessidades recomendadas. A diminuição da ingestão energética esteja abaixo das necessidades recomendadas. A diminuição da ingestão de calorias no caso das pacientes com AR pode estar associada aos sintomas relacionados à doença como perda da função motora, fadiga, dor e também às reações adversas da terapia medicamentosa que pode levar à ocorrência de náuseas, dispepsia

e alteração no paladar (DARLINGTON; RAMSEY, 1993). Além disso, a existência de sub-relatos no recordatório de 24h pode ter influenciado as estimativas de ingestão calórica e de macronutrientes.

Entre as duas fases do estudo apenas os valores médios de proteínas diferiram estatisticamente ($p < 0,01$) (Figura 4).

Legenda: T0: antes da suplementação com castanha-do-brasil; T1: após a suplementação. VET- Valor Energético Total. Dados apresentados como média $\pm$ desvio-padrão. * Diferença estatística observada entre os dois tempos apenas para os valores médios de proteínas ($p < 0,01$).

Figura 4. Valores médios de ingestão de carboidratos, proteínas e lipídeos (%) em relação ao VET, obtidos por meio dos recordatórios alimentares de 24h, antes e após a suplementação com castanha-do-brasil.

A ingestão de selênio pelas participantes do estudo também foi analisada. Os dados mostram que apenas 6 participantes apresentaram o consumo habitual de selênio superior ao recomendado pelas DRIs (EAR = 45 $\mu\text{g}/\text{dia}$) na fase inicial do estudo. Após a suplementação com castanha-do-brasil, os valores aumentaram de $35,1 \pm 18,8$ a $382,82 \pm 14,81$ $\mu\text{gSe}/\text{dia}$ ($p < 0,01$), sendo essa ingestão superior à EAR, mas inferior à UL (400 $\mu\text{g}/\text{dia}$).

A avaliação da ingestão alimentar de selênio não é uma tarefa fácil. O método de recordatório de 24 horas apresenta diversos vieses, tais como a falta de precisão na

estimativa das quantidades ingeridas dos alimentos; a ocorrência de sub-relatos e a ausência dos valores da concentração de selênio nas tabelas brasileiras de composição de alimentos. O *software* utilizado para o cálculo das dietas baseia-se nas tabelas norte-americanas. Desse modo, a tabela de composição de alimentos (TACO) foi usada para a formação de um banco de dados contendo os valores dos macronutrientes da alimentação habitual da população brasileira e, para o selênio, foram inclusos no programa os valores do mineral encontrados na pesquisa da Ferreira (2002) e também provenientes de análises realizadas em nosso laboratório (dados não publicados). A composição da dieta e as diferenças de selênio nos alimentos, devido à variabilidade de sua concentração no solo são outros fatores que explicam as diferenças na ingestão do mineral entre as pessoas (RESZKA *et al*; 2012; GROMADZINSKA *et al*, 2008).

O selênio é importante para a manutenção do *status* antioxidante celular, sendo também responsável pela modulação do sistema imune e do quadro inflamatório. Esse elemento-traço atenua a resposta inflamatória através da redução das EROs (ROMAN; JITARU; BARBANTE, 2014). No caso de deficiência da ingestão do mineral, as manifestações da doença pioraram após 6 e 12 semanas com dieta restrita em selênio, em um estudo cuja AR foi induzida em ratos (PARNHAM *et al.*, 1983). Por outro lado, a suplementação de selênio melhorou alguns dos sintomas da doença em indivíduos com AR (PERETZ; SIDEROVA; NÉVE, 2001). Outros estudos avaliaram o efeito da suplementação de selênio e de outros compostos antioxidantes sobre parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo, no entanto, serão abordados nos próximos tópicos.

5.2.4. DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO PRO198LEU NO GENE DA GPX1

Um dos fatores que podem influenciar o estado nutricional relativo ao selênio dos indivíduos e a atividade da GPx é a presença do polimorfismo Pro198Leu no gene da GPx1. Desse modo, para efeito didático, comentaremos a frequência desse polimorfismo anteriormente e, nos próximos tópicos, será analisado o efeito de diferentes genótipos sobre os parâmetros propostos.

Para avaliar a frequência do polimorfismo Pro198Leu no gene da GPx1 em pacientes com artrite reumatoide, realizou-se essa determinação em todas as participantes do estudo (n=59). Das 59 participantes, 34 apresentaram genótipo selvagem (homozigota para prolina); 21 eram do genótipo heterozigoto (prolina/leucina)

e apenas 4 eram homozigotas para leucina, possuindo os dois alelos variantes (Tabela 6). Os resultados da genotipagem estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A determinação da prevalência do polimorfismo no gene da GPx1 em todas as mulheres com artrite reumatoide participantes do estudo foi o primeiro passo do trabalho. Em seguida, todos os dados foram analisados separadamente para cada genótipo com a finalidade de estudar o efeito da presença de um ou dois alelos variantes sobre a concentração de selênio e sobre os parâmetros de estresse oxidativo e inflamação, na fase antes da suplementação isoladamente e entre as duas fases. Esse efeito foi avaliado em 46 participantes, uma vez que 13 delas não compareceram à segunda coleta sanguínea e será comentado no tópico de selênio, estresse oxidativo e inflamação.

Das 46 participantes, 26 tinham o genótipo selvagem (Pro/Pro); 17 eram heterozigotas (Pro/Leu) e 3 eram homozigotas para o alelo variante (Leu/Leu). As frequências gênicas observadas foram bastante semelhantes aos dados obtidos com as 59 participantes e, como era esperado, também estavam de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg ($X^2 = 0,09966$).

Tabela 6. Distribuição do polimorfismo Pro198Leu no gene que codifica para a GPx1 em mulheres com artrite reumatoide

Genótipos- códon 198 da GPx1*	n (%)
Pro/Pro	34 (57,63%)
Pro/Leu	21 (35,59%)
Leu/Leu	04 (6,78%)

Legenda: GPx1- glutathione peroxidase 1. *Valores observados em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As frequências genotípicas do SNP Pro198Leu no gene da GPx1 encontradas neste trabalho foram semelhantes às observadas por Fosberg, De Faire e Morgenstern (1999) em 25 indivíduos suecos saudáveis e similares também às obtidas em 101 indivíduos suecos infartados, cuja distribuição do genótipo foi de 55% homozigotos para prolina, 38% heterozigotos e 7% homozigotos para leucina. Já na população finlandesa, composta por 66 indivíduos, 35% eram homozigotos para prolina, 48% heterozigotos e

17% homozigotos para leucina (FOSBERG *et al.*, 2000). Suzen e colaboradores (2010) compilaram os dados de 10 estudos realizados em países da Europa ocidental e oriental, África, Estados Unidos e Canadá em indivíduos saudáveis, tendo sido verificada uma ampla variabilidade dos genótipos do referido SNP. O Japão foi o país que apresentou o menor % de indivíduos homozigotos para o alelo variante (0%), enquanto que na Turquia e na Finlândia os maiores percentuais de homozigotos mutantes foram observados (14,7% e 14,4%, respectivamente). Esses dados mostram que as frequências genotípicas do SNP Pro198Leu diferem entre as localidades.

A frequência do alelo T encontrada no presente trabalho foi de 0,24, não tendo sido incluídas no estudo participantes de origem asiática. Essa frequência alélica foi semelhante à observada em países como a Inglaterra, Suécia e Alemanha. Por outro lado, a presença do polimorfismo Pro198Leu tem sido associada a maior susceptibilidade para as doenças crônicas não transmissíveis (diversos tipos de câncer, Alzheimer, entre outras) (RAVN-HAREN *et al.*, 2006; RATNASINGHE *et al.*, 2000; HAMANSHI *et al.*, 2004).

No Brasil, o nosso grupo foi o pioneiro em estudar o SNP Pro198Leu no gene da GPx1 em diferentes localidades e estados de saúde (Tabela 7).

Tabela 7. Frequências genotípicas do SNP Pro198Leu no gene da GPx1 observadas neste estudo em outros grupos populacionais no Brasil. São Paulo, 2013.

	Presente estudo (2014) n= 46 AR (%)	Nishimura (2011) n= 175 CA (%)	Cominetti <i>et al</i> (2013) n= 37 OB (%)	Cardoso (2012) n= 35 ALZ (%)	Donadio (2011) n=124 SP (%)	Bezerra (2014) n= 76 SC (%)
Genótipo						
Pro/Pro	57,63	50	49	75	49	54,5
Pro/Leu	35,59	43	38	14	48	38,1
Leu/Leu	6,78	07	13	11	03	7,4

Legenda: AR- artrite reumatoide; CA- câncer de cavidade oral; OB- indivíduos obesos; ALZ- Alzheimer; SP- Indivíduos saudáveis residentes em São Paulo; SC- Indivíduos saudáveis residentes no Ceará.

Conforme comentado anteriormente, a AR aumenta o risco de desenvolvimento

de doenças cardiovasculares (DCV), as quais são influenciadas por diversos fatores como a dislipidemia, pressão arterial elevada, concentração de homocisteína, diabetes *melittus*, aterosclerose e altos títulos de marcadores inflamatórios. Indivíduos com síndrome metabólica, semelhantemente aos com AR, fazem parte do grupo de risco para DCV. Kuzuya e colaboradores (2008) observaram que indivíduos japoneses carreadores do alelo variante T no gene da GPx1 apresentavam maior predisposição para a síndrome metabólica. No presente estudo, indivíduos heterozigotos ou homozigotos para o alelo variante (Pro/Leu e Leu/Leu) podem ser ainda mais susceptíveis às DCV. Aliado a isso, diversos estudos também relatam a associação do polimorfismo à alteração na expressão da GPx1 e na atividade da GPx total, o que comprometeria ainda mais o sistema de defesa antioxidante nesse grupo (CHEN *et al.*, 2011; BRIGELIUS-FLOHE; KIPP, 2009; HU; DIAMOND, 2003).

5.2.5. AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL RELATIVO AO SELÊNIO DAS PARTICIPANTES E SUA RELAÇÃO COM O POLIMORFISMO PRO198LEU

O estado nutricional das participantes em relação ao selênio foi determinado por meio de marcadores sanguíneos, que refletem a curto e médio prazo a concentração corporal desse elemento-traço, e o urinário. Portanto, foram utilizadas as concentrações de selênio no plasma, eritrócito e urina, nos dois tempos de avaliação.

Inicialmente, as participantes do estudo foram alocadas de acordo com o grau de atividade da doença reumática para avaliar se a gravidade da doença interfere no estado nutricional relativo ao selênio das participantes. Foram formados três grupos: remissão, atividade leve e moderada/intensa, sendo que essa classificação foi obtida por meio do DAS28. Apenas 3 participantes apresentavam atividade intensa da AR e, desse modo, foram incluídas às de atividade moderada para possibilitar a realização da análise estatística. Os resultados dessa avaliação se encontram na tabela 8.

Tabela 8. Parâmetros bioquímicos para avaliação do estado nutricional relativo ao selênio, de pacientes com artrite reumatoide, segundo o grau de atividade da doença. São Paulo, 2013.

Atividade da doença*	Se plasmático (µg/L)	Se eritrocitário (µg/L)	Se urinário (µg/L)
Remissão [∞]	39,81±7,96	51,40±23,74	39,6±1,16
Leve ^Δ	38,00±9,35	48,92±12,19	55,8±6,9
Moderada/intensa [◇]	42,16±9,31	50,01±21,43	42,2±2,11

Legenda: * Classificação do grau de atividade da doença, por meio do DAS28 - *Disease Activity Score 28* (*Adaptado de BÉRTOLO et al., 2007*).[∞]Remissão (DAS28<2,6); ^ΔLeve (DAS 28<3,2); [◇]Moderada (DAS28<5,1) e Intensa (DAS28>5,1). Resultados apresentados como média ± desvio-padrão; p>0,05.

Poucas foram as pesquisas que analisaram a associação entre o estado nutricional relativo ao selênio na AR e a atividade da doença. Apesar do relato de que a gravidade da doença influencia o estado nutricional relativo ao mineral desses pacientes, os critérios de classificação adotados nos estudos foram diferentes, tendo sido utilizados a velocidade de hemossedimentação (VHS), a proteína C reativa (PCR) e o número de articulações edemaciadas. Nenhum trabalho associou o DAS28 com os parâmetros bioquímicos de selênio. A atual pesquisa mostrou que o estado nutricional das participantes em relação ao selênio não foi afetado pela gravidade da doença reumática. Tarp e colaboradores (1985) em um estudo realizado na Dinamarca com pacientes em atividade leve, moderada e grave da doença constataram que os valores séricos de selênio diferiram entre os grupos e estavam reduzidos quando comparados aos do grupo controle. Essa redução, no entanto, não foi igualmente pronunciada nos três diferentes grupos, tendo sido encontrada uma menor concentração de selênio nos indivíduos em atividade intensa, de longa duração e de pior prognóstico. No entanto, a concentração média de selênio de todo o grupo foi bastante superior (70,2 ± 13,3 µg/L) ao encontrado no presente estudo.

Na fase pré-suplementação, a concentração média (±DP) de selênio no plasma e eritrócito das participantes com AR foi de 40,5 ± 8,9 µgSe/L e 46,3 ± 13,3 µgSe/L, respectivamente. Esses resultados referentes ao Se plasmático (40,5 ± 8,9 µg/L) encontram-se reduzidos quando comparados aos obtidos por Yazar e colaboradores (2005) (64,4 ± 28,0 µgSe/L), e por Tarp e colaboradores (1985) (63,7 ± 14,1 µgSe/L) em

indivíduos com AR e também se comparado à população saudável ($111,8 \pm 67,7$ $\mu\text{gSe/L}$). Concentrações reduzidas do mineral foram observadas em soro, eritrócitos e até mesmo em leucócitos de indivíduos com AR (HEINLE *et al*, 1997; YASAR *et al*, 2005; KOSE *et al.*, 1996; BROWN *et al*, 2000) e artrite juvenil crônica (AKESSON *et al*, 1984), comparados à população saudável. Esses resultados corroboram com os aqui apresentados para o selênio plasmático e eritrocitário e indicam que a artrite leva a uma diminuição da concentração do mineral. Sugere-se que a essa diminuição seja não apenas um resultado inespecífico da inflamação, mas a uma depleção do estoque corpóreo do mineral ou de sua redistribuição para outros tecidos.

Na Literatura, existem vários intervalos de referência para analisar a concentração de selênio no plasma. Considerando os valores propostos por Vandaeel & Delstra (1993) - de 60 a 120 $\mu\text{g/L}$; e por Nève (1995) – 70 $\mu\text{g/L}$, percebe-se que apenas uma participante do nosso estudo apresentou concentrações adequadas do mineral. Utilizando-se os valores propostos por Alegría e colaboradores (1996) - 53 a 109 $\mu\text{g/L}$, três participantes estavam estado nutricional relativo ao selênio adequado.

Thomson (2004), por sua vez, sugeriu diversos pontos de corte baseados na determinação dos teores mínimos de Se suficientes para a não ocorrência da doença de Keshan, para a otimização da atividade das deiodinases, para a maximização da GPx e selenoproteína P e proteção contra alguns cânceres. Considerando que a concentração mínima plasmática para evitar a doença de Keshan é de 21 $\mu\text{g Se/L}$ e que 90 $\mu\text{g Se/L}$ é o suficiente para garantir a maximização da GPx, pode-se observar que nenhuma das participantes atingiu o ponto de corte de 90 $\mu\text{g Se/L}$ na fase inicial do estudo (Figura 5), embora tenham apresentado valores superiores a 21 $\mu\text{g/L}$. Para o compartimento eritrocitário, adotamos os pontos de corte sugeridos por Ortuño e colaboradores (1997), os quais variam de 90-190 $\mu\text{g Se/L}$ para a população saudável. Desse modo, antes do período de intervenção, todas as participantes estavam deficientes em Se (Figura 5). É possível afirmar, portanto, que a deficiência de selênio na fase inicial do estudo foi elevada. Estes dados podem ser confirmados pelas concentrações reduzidas de selênio encontradas na urina ($4,5 \pm 3,4$ $\mu\text{gSe/L}$).

Figura 5. Distribuição da adequação das pacientes com artrite reumatoide segundo as concentrações plasmáticas de selênio na fase inicial do estudo. São Paulo, 2013.

Figura 6. Distribuição da adequação das pacientes com artrite reumatoide segundo as concentrações eritrocitárias de selênio na fase inicial do estudo. São Paulo, 2013.

Por outro lado, na fase pós-suplementação, a concentração média ($\pm$ DP) de selênio no plasma e nos eritrócitos das participantes aumentou para $153,2 \pm 44,3 \mu\text{g Se/L}$ ($p < 0,01$) e $187,2 \pm 59,5 \mu\text{g Se/L}$, sendo 5x e 4x superior aos dados obtidos antes do

período de intervenção, respectivamente (Figura 7).

Legenda: Se- selênio; T0 – antes da suplementação; T1 – após a suplementação com uma unidade de castanha-do-brasil (5g).

Figura 7. Concentrações de selênio no plasma (A) e eritrócitos (B) antes e após a suplementação com uma unidade de castanha-do-brasil em pacientes com artrite reumatoide. São Paulo, 2013.

O selênio plasmático é o parâmetro mais utilizado para avaliar o estado nutricional relativo ao selênio dos indivíduos (VAN DAEL & DEELSTRA, 1993) a curto prazo, pois sofre rápidas mudanças em indivíduos expostos à baixa ou à moderada ingestão de selênio (50 a 200 µg/dia). No entanto, o grau de depleção nutricional de selênio do indivíduo, a concentração total de selênio no organismo e a sua especiação química do mineral dos alimentos ingeridos, são fatores que influenciam a resposta à normalização

dos valores plasmáticos do mineral (NÈVE, 1991). Já o selênio eritrocitário responde mais lentamente às mudanças devido à meia-vida dos eritrócitos, que é de 120 dias. É considerado um marcador de médio prazo estando distribuído principalmente na hemoglobina e, em menor extensão (10-15%) incorporado à GPx (VAN DAEL & DEELSTRA, 1993).

O Se urinário é outro marcador que auxilia na interpretação dos resultados referentes ao estado nutricional relativo ao selênio da população estudada. As concentrações médias ($\pm$ DP) de Se urinário foram de $4,5 \pm 3,4$ e $49,1 \pm 40,9$ $\mu\text{gSe/L}$ antes e após a suplementação, respectivamente. Houve uma diferença estatística significativa após o consumo da castanha ($p < 0,05$), porém essas concentrações apresentaram ampla variabilidade interpessoal, como demonstrado pelos altos desvios-padrão. A urina é a principal via de excreção quando a ingestão de selênio é adequada, podendo aumentar de maneira significativa se a ingestão de selênio for superior à recomendada (COMINETTI, 2013).

A ingestão de uma unidade de castanha-do-brasil por 60 dias foi eficaz em restaurar o estado nutricional da maioria das participantes do estudo em relação ao Se em todos os compartimentos corpóreos analisados e em otimizar a atividade da GPx em praticamente todas as participantes do estudo (Figura 8). Apenas quatro delas não conseguiram atingir o patamar de $90 \mu\text{g/L}$ para esse efeito (Figura 8A). Abaixo dessa concentração, o Se é incorporado de forma inespecífica como selenometionina na albumina e em outras proteínas e, como consequência, a concentração plasmática do mineral não reflete o aumento da atividade enzimática da GPx (WALCHULEWSKI & SUNDE, 1988), corroborando com a falta de correlação observada entre o Se e a atividade da GPx no instante T0 do presente estudo. Correlação positiva entre estes parâmetros foi apenas observada no T1 ($r = 0,54$; $p\text{-valor} < 0,05$). Brown e colaboradores (2000), avaliaram o efeito da suplementação de $50 \mu\text{gSe/dia}$, sob a forma orgânica e inorgânica, sobre a atividade de selenoenzimas em eritrócitos, linfócitos, granulócitos e plaquetas. A atividade da GPx aumentou gradualmente para ambos os tratamentos no decorrer dos 28 dias de intervenção. Apesar de o selênio plasmático ter sido aumentado, o mesmo não aconteceu para todos os indivíduos quanto à atividade da GPx.

Figura 8. Distribuição da adequação das pacientes com artrite reumatoide, segundo as concentrações plasmáticas (A) e eritrocitárias (B) de selênio na fase pós-suplementação. São Paulo, 2013.

Trabalhos recentes realizados em nosso laboratório com suplementação de selênio por meio da castanha-do-brasil, conduzidos com obesos mórbidos, pacientes renais crônicos e pacientes com diabetes *mellitus* tipo I mostraram que a ingestão de 290 µgSe foi efetiva em melhorar o estado nutricional dos sujeitos dos estudos, avaliados por meio do Se plasmático e eritrocitário, bem como pela atividade da GPx nos eritrócitos (COMINETTI *et al.*, 2012).

Thomson e colaboradores (2008) pontuou um aumento de 64,2% nas concentrações plasmáticas de selênio em indivíduos neozelandeses que consumiram 2

unidades de castanha-do-brasil (53 $\mu\text{g}/\text{Se}/\text{dia}$) por três meses. No presente estudo, esses valores percentuais foram bem maiores do que os encontrados por Thomson e colaboradores (2008), o que pode ser atribuído às maiores quantidades de Se obtidas pelo consumo da castanha (350 $\mu\text{g}/\text{Se}/\text{dia}$). Todos esses trabalhos corroboram para o fato de que o selênio contido na castanha-do-brasil seja bastante biodisponível para os indivíduos saudáveis ou enfermos.

Para avaliar o efeito do consumo da castanha-do-brasil em nível molecular, foi determinada, primeiramente, a expressão gênica da GPx1 entre o tempo T1 comparado à fase pré-suplementação (T0) (figura 9). Foi observado um aumento estatisticamente significativo entre os tempos de avaliação ($p\text{-valor}<0,05$). Esse resultado difere do encontrado por Lei e colaboradores (2009) em pacientes com risco cardiovascular suplementados com selenito de sódio. Esses pesquisadores observaram um aumento na concentração e atividade da GPx1, em células endoteliais de artérias coronarianas. É interessante observar, no presente estudo, que a suplementação da castanha-do-brasil como fonte de selênio orgânico (selenoisteína e selenometionina) levou ao aumento da GPx total, cuja forma predominante encontrada no eritrócito é a GPx1; e de sua expressão gênica.

Legenda: GPx1: glutathiona peroxidase 1; T0 e T1: grupos antes e após a suplementação com castanha-do-brasil (1 nóz, 5g). Resultados apresentados como média $\pm$ desvio-padrão. Foi observada diferença estatisticamente significativa ($p\text{-valor}<0,05$) entre os tempos (T0 e T1). A expressão do RNAm foi obtida pela razão entre a expressão do RNAm alvo e do RNAm de referência ($\beta\text{-actina}$).

Figura 9. Expressão gênica da GPx1, segundo o tempo de avaliação, de pacientes com artrite reumatoide. São Paulo, 2013.

Não existe consenso na literatura de que a avaliação da expressão de selenoproteínas seja um bom marcador do estado nutricional relativo ao selênio de populações com concentrações de selênio consideradas adequadas ou sub-ótimas (RESZKA *et al.*, 2009; SUNDE *et al.*, 2008). Estudos conduzidos com animais e humanos mostraram que, mesmo com a ingestão subótima de selênio, esta parece ser eficaz em manter a expressão dos genes de selenoproteínas. Desse modo, segundo Reszka e colaboradores (2012), as necessidades nutricionais do mineral parecem ser menores do que as estabelecidas para indivíduos saudáveis (55 µg/dia) (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2008; ESTADOS UNIDOS, 2000). No entanto, esses estudos foram baseados na população não enferma, não tendo sido conduzidos trabalhos que avaliaram o impacto do selênio sobre a expressão da GPx1 em indivíduos com AR. Conforme comentado anteriormente, as participantes do presente estudo apresentaram estado nutricional relativo ao selênio altamente deficiente e esses dados estão de acordo com os encontrados na literatura de pacientes com AR residentes em diversos países (TARP *et al.*, 2005; JASWAL *et al.*, 2005; YAZAR *et al.*, 2005; TARP *et al.*, 1985; KNEKT *et al.*, 2000; AASETH *et al.*, 1978). Existe ainda a hipótese de que indivíduos submetidos a um elevado quadro de estresse oxidativo prolongado necessitem de uma maior ingestão de selênio (HAGFORS *et al.*, 2003) para garantir a atividade ótima da GPx, bem como para manutenção de sua expressão gênica. Para tanto, sugere-se a realização de estudos clínicos com um maior número de participantes com AR, sendo os mesmos categorizados segundo o grau de atividade da doença.

A expressão da GPx1 mostrou-se também bastante variável no grupo estudado. Reszka e colaboradores (2012) afirmam que os marcadores bioquímicos e moleculares utilizados para avaliar o estado nutricional relativo ao Se dos indivíduos podem ser influenciados por fatores ambientais (fumo, exposição ao ambiente, dieta) e por parâmetros de saúde, sexo, idade e pelos sistemas imunológicos e endócrinos. O tratamento farmacológico e a biodisponibilidade do selênio entre os indivíduos da presente pesquisa são outros fatores que podem ter contribuído para os resultados observados.

A incorporação da selenocisteína em selenoproteínas acontece durante o processo de tradução por um mecanismo que usa o códon UGA e a formação de um complexo envolvendo uma estrutura em haste/laço do RNA e uma sequência de inserção da selenocisteína, localizada na região 3'UTR do RNAm. A presença de SNPs nesta

região do gene pode comprometer a expressão dessas selenoproteínas, influenciando no sistema antioxidante e a resposta inflamatória (MOCICHEGANI *et al.*, 2014).

O SNP Pro198Leu no gene da GPx1 foi avaliado em pacientes com AR com a finalidade de verificar se o estado nutricional relativo ao selênio das pacientes é afetado pela presença do alelo variante T. Os valores da diferença entre os instantes T1 e T0, referentes à concentração plasmática, eritrocitária e urinária de Se foram agrupados de acordo com o genótipo do indivíduo para o SNP Pro198Leu (Tabela 9).

Tabela 9. Efeito da suplementação com castanha-do-brasil sobre as concentrações plasmáticas, eritrocitárias e urinárias de selênio, categorizadas de acordo com o genótipo para o SNP Pro198Leu no gene da GPx1 em indivíduos com artrite reumatoide. São Paulo, 2013.

Genótipos	Se plasma (µg/L) Diferença (T1-T0)		Se eritrócito (µg/dL) Diferença (T1-T0)		Se urina (µg/g creatinina) Diferença (T1-T0)	
	Média ± DP	IC (-95%-95%)	Média ± DP	IC (-95%--+95%)	Média ± DP	IC (-95%--+95%)
Pro/Pro	122,2 ± 43,2	(104,4 - 140,8)	159,8 ± 55,3	(136,5-183,2)	82,8 ± 60,4	(54-111)
Pro/Leu	118,4 ± 38,6	(96,1 - 140,7)	131,5 ± 57,4	(96,1-166,1)	98,5 ± 89,0	(138,7-158,4)
Leu/Leu	54,1 ± 4,1	(17,3 - 90,9)	131,5 ± 4,0	(96-166)	nd	nd

Legenda: Pro- prolina; Leu- Leucina. Resultados baseados na diferença de selênio entre os instantes T1 e T0. Dados não significativos.

Os resultados mostram que a resposta à suplementação não diferiu entre os genótipos. No entanto, apesar de em reduzido número (n=3), indivíduos com os dois alelos variantes tenderam a apresentar menor aumento da concentração de selênio plasmático. O mesmo não foi observado para o selênio eritrocitário. Esses dados sugerem que este polimorfismo poderia estar interferindo no aproveitamento de selênio. Um maior número de indivíduos é necessário para avaliar esse efeito.

Outro fato relevante quando se estuda o polimorfismo Pro198Leu é o efeito do alelo Leu na atividade da enzima GPx, que se apresenta reduzida nos indivíduos com alelo variante (HANSEN *et al.*, 2009; RAVN-HAREN *et al.*, 2006).

Jablonska e colaboradores (2009) não observaram diferenças significativas quanto às concentrações de Se plasmáticas entre os diferentes genótipos relacionados ao

polimorfismo Pro198Leu, em indivíduos saudáveis. Cominetti e colaboradores (2011) também não demonstraram diferenças nas concentrações de Se plasmático, Se eritrocitário e atividade da GPx entre os genótipos em ambas as fases de seu estudo (pré e pós suplementação de castanha-do-brasil). Ainda, Cominetti e colaboradores (2011) e Cardoso e colaboradores (2012) observaram correlação entre o Se eritrocitário e a atividade da GPx para o grupo Pro/Pro, tanto nos doentes quanto nos controles. A mesma correlação foi apontada pelos estudos de Jablonska e colaboradores (2009), Hu & Diamond (2003) e Karunashinghe e colaboradores (2011), diferentemente do encontrado no presente estudo. A falta de correlação entre estes parâmetros pode ter acontecido devido a influência de variáveis como o fator reumatoide, o grau de atividade da doença e a ingestão alimentar sobre o estado nutricional relativo ao selênio das participantes com AR e sobre a atividade da GPx total e concentração da GPx1. Para tanto, foi realizada a análise de regressão linear múltipla para o Se (plasmático e eritrocitário), GPx e GPx1.

Para a análise de regressão, utilizou-se a diferença de Se entre os tempos T1 e T0 como parâmetro de avaliação com o objetivo de realizar uma análise exploratória dos dados de forma a identificar quais as possíveis variáveis contribuintes e qual a relação existente entre elas. Os dados foram ajustados pelos: fator reumatoide, DAS 28, genótipo e variáveis de alimentação (Energia, Carboidrato, Proteína, Lipídio e Se) como covariáveis em Modelos de Regressão Linear Múltipla. As covariáveis foram selecionadas pela pesquisadora, no entanto, as mesmas só entrariam no modelo se interferissem significativamente.

Para a variável Se eritrocitário, percebe-se que o fator reumatoide e o genótipo do SNP Pro198Leu influenciam as concentrações do mineral. Avaliando a Tabela 10, observa-se que a diferença média entre os instantes T1 e T0 da variável selênio eritrocitário é de 166,11 ug/L para pacientes do perfil padrão (grupo com fator reumatoide soro negativo ou não especificado, valor médio de DAS 28 de 3,05 e genótipo CT ou TT). Além disso, pacientes classificadas como soro positivo no fator reumatoide possuem diferença média 48,5 ug/L menor que a diferença média de pacientes classificados como soro positivo ou não especificados, mantendo-se constantes as demais variáveis. Considerando-se as pacientes na mesma categoria de fator reumatoide e genótipo, o aumento de uma unidade do DAS 28 acarretou um aumento médio de 21,33 ug/L na diferença de Se, apesar de marginalmente significativo. Com relação ao genótipo, tem-se

que pacientes do tipo CC apresentaram diferença média 35,23 ug/L maior quando comparados a pacientes de outros genótipos, mantendo-se constantes as demais variáveis. Esses resultados indicam que pacientes com fator reumatoide positivo e do grupo CT/TT apresentaram concentrações mais reduzidas de selênio eritrocitário após a suplementação com a castanha-do-brasil quando comparados às participantes CC, de fator reumatoide negativo e DAS28 médio de 3,05. Sugere-se que a demanda de selênio para esses grupos seja maior, sendo o selênio mais utilizado para combater o estresse oxidativo por meio de sua incorporação às selenoproteínas. Ainda, os resultados apontam que as participantes com genótipo CT ou TT sejam menos responsivas à intervenção alimentar com selênio, sendo esse resultado semelhante ao encontrado por Bezerra (2014), Jablonska e colaboradores (2009) e Hu & Diamond (2003).

Tabela 10. Modelo ajustado para a diferença entre os instantes T1 e T0 da variável selênio eritrócito (ug/L).

Variável	Estimativa	Erro padrão	Valor p
Perfil padrão*	166,11	19,34	< 0,001
Fator reumatoide (Soro positivo)	-48,50	20,81	0,026
DAS 28	21,33	7,45	0,007
Genótipo (CC)	35,23	17,23	0,049

(*) **Perfil padrão:** Paciente com fator reumatoide soro negativo ou não especificado, com valor médio de DAS 28 (3,05) e genótipo CT/TT.

Avaliando a Tabela 11, observa-se que a diferença média entre os instantes T1 e T0 da variável selênio plasma é de 100.14 ug/L para pacientes com genótipo CT/TT. Para pacientes com genótipo CC, essa diferença média é 23,07 ug/L maior. De forma semelhante ao observado para o Se eritrocitário, as participantes com genótipo CT ou TT tendem a apresentar menor concentração do mineral.

Tabela 11. Modelo ajustado para a diferença entre os instantes T1 e T0 da variável selênio plasma (ug/L).

Variável	Estimativa	Erro padrão	Valor p
Perfil padrão*	100,14	9,68	< 0,001
Genótipo (CC)	23,07	13,13	0,086

(*) **Perfil padrão:** Paciente com genótipo outros.

Considerando os modelos de regressão linear múltipla para as enzimas antioxidantes, tem-se que a atividade eritrocitária da GPx total é influenciada principalmente pelo fator reumatoide (Tabela 12).

Tabela 12. Modelo ajustado para a diferença entre os instantes T1 e T0 da variável GPx eritrócito (U/gHb).

Variável	Estimativa	Erro padrão	Valor p
Perfil padrão*	32.36	8.61	< 0.001
Fator reumatoide (Soro positivo)	-22.97	9.84	0.024
Escala de proteína x carboidrato	-10.40	5.46	0.063

(*) **Perfil padrão:** Paciente com fator reumatoide soro negativo ou não especificado e escala de proteína x carboidrato nula.

Os resultados sugerem que as participantes do estudo com fator reumatoide positivo provavelmente apresentem menor atividade da GPx após a intervenção com uma nóz de castanha-do-brasil do que aquelas com fator reumatoide negativo. Esse resultado está de acordo com o esperado, uma vez que essas pacientes com fator reumatoide positivo também tenderam a apresentar menor concentração de selênio após o período de intervenção. Esses dados apontam para a hipótese de que a redução da atividade da GPx deve-se a uma menor ingestão de selênio. Pela correlação de Pearson,

esses dois parâmetros estão positivamente relacionados ($r=0,56$; $p<0,05$). Em contrapartida, a atividade da enzima antioxidante não diferiu entre os genótipos após o ajuste das covariáveis. A variabilidade dos dados pode ter mascarado os efeitos positivos da intervenção nutricional sobre a atividade da enzima antioxidante.

Quanto à expressão da GPx1 e comparando os valores obtidos entre os instantes T1 e T0, observa-se que o efeito da suplementação foi menor para o grupo Pro/Leu e Leu/Leu (Figura 10). Esses resultados estão de acordo com o observado para o Se eritrocitário, em que os indivíduos carreadores do alelo variante tenderam a apresentar um menor aumento da concentração do mineral se comparados aos com genótipo Pro/Pro.

Legenda: GPx1: glutathiona peroxidase 1; T0 e T1: grupos antes e após a suplementação com castanha-do-brasil (1 nóz, 5g); Pro/Pro: prolina/prolina; Pro/Leu: prolina/leucina; Leu/Leu: leucina/leucina. Resultados apresentados como média±desvio-padrão. Foi observada diferença estatisticamente significativa (p -valor $<0,05$) entre os genótipos. A expressão do RNAm foi obtida pela razão entre a expressão do RNAm alvo e do RNAm de referência (β -actina).

Figura 10. Efeito da suplementação com castanha-do-brasil sobre a expressão gênica da GPx1, segundo o tempo de avaliação e genótipo (Pro/Pro; Pro/Leu; Leu/Leu), em pacientes com artrite reumatoide. São Paulo, 2013.

Por meio da Tabela 13, pode-se inferir que, em média, a concentração da GPx1 aumenta 341,65 U/mL em pacientes com perfil padrão. Além disso, um aumento de uma unidade no DAS28 acarreta, em média, uma diminuição de 138,82 U/mL na diferença

entre os instantes T1 e T0. A variável Escala de Alimentação foi incluída no modelo como controle.

Tabela 13. Modelo ajustado para a diferença entre os instantes T1 e T0 da variável GPx1.

Variável	Estimativa	Erro padrão	Valor p
Perfil padrão*	341.65	88.77	0.001
DAS 28	-138.82	76.29	0.080
Escala de Alimentação	-77.75	54.07	0.162

(*) **Perfil padrão:** Pacientes com 3.05 de DAS 28 e Escala de Alimentação nula.

O estado nutricional relativo ao selênio das participantes foi avaliado por meio das concentrações plasmáticas, eritrocitárias e urinárias e pela atividade da enzima GPx. A resposta à suplementação com castanha-do-brasil foi analisada de acordo com os genótipos do SNP Pro198Leu no gene da GPx1 e relacionada à expressão e concentração da referida enzima.

Pela análise univariada dos dados, a intervenção alimentar levou à melhora do estado nutricional relativo ao Se dos indivíduos com AR. Esse fato pode ser comprovado pelo aumento da atividade da GPx total, bem como da expressão e concentração da GPx1, a qual apresenta função antioxidante por meio de sua ação direta sobre os peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) e hidroperóxidos de lipídio. Neste trabalho, o IMC, o %GC, a ingestão calórica e de macronutrientes não diferiram entre os dois tempos do estudo, não sendo correlacionados com o grau de atividade da doença e com o estado nutricional relativo ao Se das participantes da pesquisa.

O efeito de diferentes tratamentos farmacológicos sobre as concentrações de selênio nos fluidos biológicos não foi avaliado neste trabalho, no entanto, o estudo realizado por Önal e colaboradores (2011) mostrou que a ingestão de metotrexato, salasopirina, corticosteroides, NSAIDS e cloroquina não têm influência sobre o *status* de Se. No presente estudo, o metotrexato e a leflunomida foram os medicamentos mais utilizados pelas pacientes com AR. Por outro lado, Honkanen (1991) mostrou que pacientes em uso de sulfazalasina apresentaram maior atividade da GPx se comparados

aos tratados com NSAIDs, hidroxicloroquina e glucocorticoides. Além da atividade da GPx ser influenciada pelo tratamento farmacológico, baixas concentrações de Se diminuem a síntese e a atividade dessa selenoproteína e o aumento da ingestão do mineral leva a uma maior atividade da enzima, até atingir um *plateau*, correspondente ao patamar plasmático de 90 µg Se/L (THOMSON, 2008). Alterações na atividade da GPx foram observadas em pacientes com elevado grau de estresse oxidativo se comparados à população saudável. Vijayalakshmi e colaboradores (1997) evidenciaram, na AR, baixa atividade da enzima no fígado, rins e coração, suportando os resultados do presente estudo. Sarban e colaboradores (2005) observaram uma diminuição significativa na atividade da GPx entre os pacientes com AR e o grupo controle pela inativação da enzima pelo H₂O₂.

Os resultados obtidos por meio da análise multivariada dos dados indicam que as participantes da pesquisa com fator reumatoide positivo, tendem a apresentar um menor aumento de Se eritrocitário, menor atividade da GPx e menor concentração da GPx1. Indivíduos com fator reumatoide positivo apresentam um desequilíbrio ou uma resposta imune exacerbada dos linfócitos B e T, levando à formação do complexo imune e à consequente inflamação e distúrbio no balanço oxidativo celular (BURMESTER; FEIST; DÖRNER, 2014).

De forma semelhante, altos títulos de DAS-28 estão associados a uma diminuição da capacidade antioxidante celular, por meio da redução do Se eritrocitário. O DAS28 avalia a gravidade da doença reumática por meio de um cálculo matemático que, dentre outros fatores, utiliza a proteína C reativa ou o VHS para a determinação do *score* da doença. Quanto maior o valor, maior a gravidade e mais intenso é o tratamento farmacológico. A PCR (proteína C reativa) é um marcador de resposta rápida e reflete atividade inflamatória aguda. Já o VHS (velocidade de hemossedimentação), indica o aumento de proteínas de fase aguda, como o fibrinogênio, e reflete a atividade da doença de algumas semanas. Alguns fatores podem influenciar nos níveis destes biomarcadores como a idade, sexo e anemia (NETO, CARVALHO, 2008). O uso do VHS ou da PCR para o cálculo do DAS28 foi um dos fatores limitantes do trabalho.

Já para os genótipos carreadores de alelo variante, a intervenção alimentar com 350 µg de Se, levou a um menor aumento da concentração de Se eritrocitário e plasmático. Esse resultado sugere que o referido grupo apresente uma menor resposta com a suplementação, indicando uma maior dificuldade do organismo em obter e manter

o selênio corpóreo. O menor aumento da concentração de selênio nas participantes com genótipo CT ou TT corrobora com o menor aumento da expressão gênica da GPx1, embora não tenha sido detectada influência do genótipo na concentração da GPx1 e na atividade da GPx total. Segundo Hesketh (2008), a recomendação da ingestão de selênio deve ser individualizado uma vez que pode ser influenciado pela presença de polimorfismos genéticos.

5.2.6. EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM CASTANHA-DO-BRASIL SOBRE OS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

O comprometimento do sistema de defesa antioxidante leva à produção descontrolada de EROs , levando à perpetuação da inflamação em indivíduos com AR. Neste trabalho, avaliamos o sistema de defesa antioxidante (GPx, GPx1 e SOD) e oxidante (ORAC, 8-isoprostano) com a finalidade de caracterizar a população estudada quanto ao nível de estresse oxidativo.

Primeiramente, os dados resultantes da análise dessas determinações foram separados de acordo com o grau de atividade da doença para verificar se existia relação entre estes parâmetros. Observou-se que não existe diferença estatística entre os grupos, considerando os marcadores de estresse oxidativo (Tabela 14). Esses resultados estão de acordo com o esperado, uma vez que o estado nutricional relativo ao selênio não variou entre os grupos das participantes. No entanto, estes resultados diferiram do encontrado por Sarban e colaboradores (2005). Os pesquisadores analisaram 24 pacientes com AR, de ambos os sexos e estáveis quanto ao tratamento medicamentoso por pelo menos 3 meses e observaram que a velocidade de hemossedimentação (VHS) esteve fortemente correlacionada à capacidade antioxidante total plasmática e à concentração de malondialdeído (MDA). O VHS é um marcador de inflamação e é comumente usado para o cálculo do DAS-28 de forma a categorizar os indivíduos segundo o grau de atividade da doença reumática. Já o MDA é um marcador de peroxidação lipídica. Por outro lado, a análise de regressão linear destes parâmetros mostra que o DAS-28 parece ter influência sobre a concentração de GPx1 e selênio. Conforme comentado anteriormente, o fator reumatoide também pode ter influenciado esses resultados.

Tabela 14. Marcadores bioquímicos de estresse oxidativo em pacientes com AR na fase inicial do estudo (T0), segundo o grau de atividade da doença. São Paulo, 2013.

Variáveis	Grau de atividade da doença		
	Remissão	Leve	Moderada/intensa
Antioxidantes			
GPx eritrócito (U/gHb)*	42,8 ± 18,9	43,4 ± 10,8	47,1 ± 26,1
GPx1 eritrócito [◊]	893,6 ± 653,7	741,0 ± 484,7	926,0 ± 528,6
SOD eritrócito(U/gHb)*	1211,9 ± 420,7	1291,3 ± 659,8	1196,6 ± 224,7
Oxidantes			
ORAC no plasma (μmol Trolox/mL) [◊]	245,5 ± 94,3	211,5 ± 46,2	235,0 ± 47,0
8-isoprostano na urina (ng/mM creatinina) [∞]	187,7 ± 95,5	87,0 ± 27,1	128,51 ± 85,4

Valores de referência: SOD: 1102 a 1601 U/gHb. Legenda: ◊ n=30; * n= 37; ∞ n=24; ◊ n= 38. GPx: glutathione peroxidase; GPx1: glutathione peroxidase 1; SOD: superóxido dismutase; MDA: malondialdeído; ORAC: *oxygen radical absorbance capacity*- (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio). Resultados apresentados como média ± desvio-padrão. p>0,05; não houve diferença entre os grupos.

Após o período de intervenção, foram observadas alterações significativas nas concentrações da GPx1 e 8-isoprostano e na atividade da GPx e SOD, em relação ao período pré-suplementação. A tabela 15 ilustra esses dados.

Tabela 15. Marcadores bioquímicos do estresse oxidativo, segundo o tempo de avaliação, em pacientes com AR. São Paulo, 2013.

Parâmetros	T0	T1	p-valor*
Antioxidantes			
GPx eritrócito (U/gHb) [◦]	43,4 ± 30,7	57,8 ± 39,2*	<0,01
GPx1 eritrócito [∞]	764,0 ± 280,8	1134,6 ± 646,9*	<0,01
SOD (U/gHb) [◦]	1249,6 ± 985,2	1566,8 ± 1316,07*	<0,01
Oxidantes			
ORAC no plasma(μM eq. Trolox/mL) [·]	228,2 ± 72,7	240,3 ± 97,6	0,53
8-isoprostano na urina (ng/mM creatinina)**	122,2 ± 73,7	58,8 ± 47,1*	<0,01

Valores de referência: SOD nos eritrócitos: 102 a 1601 U/gHb Legenda: ◦ n=46; * n=25; ∞ n=37; ◊ n= 41; ·n=39. GPx: glutathione peroxidase; GPx1: glutathione peroxidase 1; SOD: superóxido dismutase; MDA: malondialdeído; ORAC: *oxygen radical absorbance capacity*- (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio). Resultados apresentados como média ± desvio-padrão.* p<0,05: diferenças significativas em relação ao T0.

Na região sinovial de pacientes com AR, macrófagos e neutrófilos ativados liberam agentes oxidantes que, em grande quantidade, levam ao quadro de estresse oxidativo causando danos a lipídios, proteínas, carboidratos e DNA (SWEENEY, 2004). Importantes alvos para os oxidantes são os ácidos graxos insaturados das membranas celulares. O 8-isoprostano e o malondialdeído (MDA) são produtos da peroxidação lipídica, sendo o primeiro considerado um biomarcador sensível do estresse oxidativo. Outros marcadores têm sido utilizados e incluem a atividade de enzimas antioxidantes (GPx e SOD), a capacidade antioxidante total plasmática (FRAP, TAC, ORAC) e outros métodos que dosam individualmente alguns compostos antioxidantes presentes no plasma (ácido úrico, albumina, α-tocoferol e γ-tocoferol; vitamina C e vitamina E).

O quadro de estresse oxidativo é instalado quando o organismo não consegue mais deter a produção elevada de radicais livres. Isso acontece devido a uma diminuição dos parâmetros antioxidantes. Existem marcadores antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Dentre os marcadores enzimáticos, analisamos a GPx total e a SOD como parâmetros antioxidantes intracelulares e o ORAC, para a determinação da capacidade antioxidante total plasmática.

Os dados aqui apresentados indicam que a ingestão de uma unidade de castanha-do-brasil por 60 dias, foi suficiente para melhorar o quadro de estresse oxidativo, característico da doença reumática. Houve um aumento da atividade da GPx e

da concentração da GPx1, o que já era esperado, uma vez que o selênio faz parte do centro ativo da enzima. Além disso, a concentração urinária de 8-isoprostano foi reduzida, indicando uma diminuição do dano oxidativo nas pacientes com AR.

Esses resultados estão de acordo com o observado em modelos animais. A atividade da GPx em ratos deficientes em selênio encontrava-se marcadamente diminuída (HUANG *et al.*, 2002) e a concentração sanguínea de peróxidos lipídicos estava bastante aumentada quando comparados com os ratos que receberam uma dieta adequada em Se (WU & HUANG, 2006). Além disso, células endoteliais dos ratos que receberam dieta adequada em selênio mostraram-se menos vulneráveis aos danos oxidativos pelos produtos da oxidação do colesterol do que os animais deficientes no mineral (WU & HUANG, 2004). Em humanos saudáveis, a suplementação com selênio levou ao aumento da atividade da GPx no plasma e eritrócitos (XIA *et al.*, 2005; DUFFIELD & THOMSON, 1999; MONGET *et al.*, 1996) e reduziu a peroxidação lipídica comparados com o placebo (NYSSONEN *et al.*, 1994; BROWN *et al.*, 2001).

Um estudo prospectivo de 27 anos de duração e realizado com 615 indivíduos saudáveis residentes na Suécia mostrou que aqueles com concentração sérica de selênio superior a 85 µg/L tinham valores diminuídos de 8-iso-prostaglandina F2α (HELMERSSON *et al.*, 2005). Este é um marcador de estresse oxidativo e reflete a suscetibilidade à oxidação (NAVAS-ACIEN *et al.*, 2008). No presente estudo, após a intervenção alimentar, os valores médios de Se plasmático foram de 155 ± 44 µg/L.

Estudos que avaliem o efeito da suplementação de selênio sobre marcadores de estresse oxidativo relacionados à AR são escassos na literatura. Hagfors e colaboradores (2003) avaliaram o efeito adjuvante da terapia antioxidante sobre os marcadores de estresse oxidativo nessa população. Neste estudo, houve uma melhora da concentração plasmática desses antioxidantes e uma redução do malondialdeído. Em indivíduos saudáveis da Nova Zelândia com idades entre 18 e 23 anos, a suplementação com selenato e selenometionina foi eficaz em aumentar a atividade da enzima antioxidante GPx (THOMSON, 2008).

No entanto, a capacidade antioxidante total plasmática do presente estudo não foi alterada com a ingestão de 350 µgSe/dia, indicando que outros fatores presentes no plasma possam ter contribuído para esse resultado. Este último resultado difere do encontrado na literatura em pacientes com atividade intensa da doença (ISIK & SELEK, 2007). No presente trabalho, as participantes estavam em sua maioria em remissão ou

atividade leve, indicando uma menor produção de compostos oxidantes e um quadro inflamatório mais ameno. Além disso, a amostra pode não ser representativa dos pacientes com AR, uma vez que indivíduos com atividade intensa da doença possivelmente não puderam participar do protocolo devido aos critérios de inclusão. Desse modo, o método do ORAC não foi capaz de detectar diferenças entre os dois tempos do estudo.

Observa-se ainda uma ampla variabilidade quanto aos parâmetros analisados, o que pode ser decorrente dos diferentes tipos de tratamento farmacológico aos quais as pacientes são submetidas. Essa variabilidade pode também ter mascarado possíveis resultados da intervenção com a castanha-do-brasil.

Os valores da diferença entre os instantes T1 e T0, referentes aos marcadores de estresse oxidativo foram categorizados de acordo com o genótipo do indivíduo para o SNP Pro198Leu (Tabela 16).

Tabela 16. Marcadores bioquímicos do estresse oxidativo, segundo o genótipo e o tempo de avaliação, de pacientes com artrite reumatoide. São Paulo, 2013.

Parâmetros	Pro/Pro		Pro/Leu		Leu/Leu		p-valor
<i>Antioxidantes</i>	Média ± DP	IC	Média ± DP	IC	Média ± DP	IC	
	Diferença		Diferença		Diferença		
	(t1-t0)	(-95%----+95%)	(t1-t0)	(-95%----+95%)	(t1-t0)	(-95%----+95%)	
GPx							
(U/gHb) °	14 ± 27	(2,5---25,5)	8,2 ± 16,1	(-0,6-----17)	11,2 ± 7,4	(-225----248)	0,76
GPx1∞						(-1623,5---	
(U/mL)	555,7 ± 154,5	(739---731)	303,5 ± 154,5	(111,7 ----495)	852 ± 1623	3327,2)	0,08
SOD							
(U/gHb) °	360 ± 627	(101----619)	186,2 ± 486,8	(-83----456)	-413 ± 1900	(17521---16693)	0,24
ORAC							
(µM eq. Trolox/mL)	-0,68 ± 1,29	(-1,2-----0,14)	0,28 ± 1,38	(-0,5-----1,1)	(0,22 ± 6,29)	(-15,4----15,8)	0,30
8-isoprostano							
(ng/mM creatinina) **	(-56 ± 81,5)	(-98----14)	-143,9 ± 205,4	(-301--- 139)	x	x	0,13

Valores de referência: SOD nos eritrócitos: 1102 a 601 U/gHb Legenda: ° n=46; * *n=25; ∞ n=37; ◇ n=41; ·n=39. GPx: glutathiona peroxidase; GPx1: glutathiona peroxidase 1; SOD: superóxido dismutase; MDA: malondialdeído; ORAC: *oxygen radical absorbance capacity*- (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio). Resultados apresentados como media ± desvio-padrão.* p<0,05: diferenças significativas em relação ao T0 para cada genótipo. Dados não significativos entre os genótipos (p>0,05).

Os resultados mostram que o efeito da suplementação não foi diferente entre os genótipos quanto aos parâmetros antioxidantes e oxidantes. Conforme comentado anteriormente, a atividade da GPx total, assim como a concentração da GPx1 não diferiu entre os genótipos, sendo esses dados semelhantes aos observados por Cominetti e colaboradores (2011). Quanto ao selênio eritrocitário, as participantes do genótipo Leu/Leu tenderam a apresentar menores concentrações do mineral, no entanto essas diferenças não foram significantes devido ao pequeno número de participantes. A falta de poder estatístico pode ter coprometido esse resultado.

O marcador de peroxidação lipídica 8-isoprostano não diferiu entre os genótipos após a suplementação com castanha-do-Brasil. Cominetti e colaboradores (2011) analisaram o efeito da suplementação com 290 µg de Se por meio da castanha-do-brasil em 37 mulheres obesas do estado de São Paulo. Das participantes, 48,7% (n=18) eram do genótipo Pro/Pro para o SNP Pro198Leu, 37,8% (n=14) eram do genótipo Pro/Leu e 5% (n=5) do genótipo Leu/Leu. A concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), um marcador de peroxidação lipídica, não diferiu entre os genótipos; semelhantemente ao encontrado para o 8-isoprostano do presente estudo. No entanto, no estudo da Cominetti (2012), foi observada diferença estatisticamente significativa para o ensaio do cometa. Participantes homozigotas para o alelo selvagem apresentaram redução no índice de danos ao DNA, o que não ocorreu naquelas carreadoras de um ou dois alelos variantes. Além disso, estas últimas apresentaram valores de danos significativamente maiores em relação às homozigotas selvagens. Este fato também foi observado quando as participantes foram agrupadas àquelas com genótipo heterozigoto. As participantes homozigotas para a variante apresentaram valores de danos em DNA correlacionados negativamente com a atividade da GPx na fase após a suplementação ($r=-0,9379$, $p<0,02$).

É importante considerar também que a distribuição das participantes quanto ao genótipo da GPx1 do presente estudo (Pro/Pro: 56,5%; Pro/Leu : 36,9%; Leu/Leu: 6%) foi similar à da pesquisa realizada por Cominetti e colaboradores (2011).

Os resultados da análise multivariada indicaram que, após o ajuste pelas covariáveis, os parâmetros de estresse oxidativo (GPx, GPx1, SOD, 8-isoprostano e ORAC) não foram influenciados pelo genótipo. Ainda, as variáveis SOD eritrócito e 8-isoprostano apresentaram diferença entre os instantes T1 e T0, mas esta diferença não foi afetada pelas covariáveis estudadas. A variável ORAC não apresentou diferença entre os instantes T1 e T0.

Considerando que as participantes homozigotas selvagens (Pro/Pro) foram mais responsivas à intervenção alimentar com castanha-do-brasil, levanta-se a hipótese de que as mesmas teriam menores danos no DNA.

5.2.7. EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM CASTANHA-DO-BRASIL SOBRE OS MARCADORES INFLAMATÓRIOS

A AR é uma doença crônica caracterizada por um desequilíbrio dos sistemas antioxidante/oxidante, conduzindo a um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e ao estado inflamatório crônico. Para esta avaliação, foram determinadas as concentrações circulantes de fibrinogênio, proteína C reativa, IL-6, IL-10, TNF- α , IL-1 β , IL-2, bem como das moléculas de adesão (VCAM e ICAM) e PAI-1; importantes marcadores inflamatórios em eventos cardiovasculares. A tabela 17 apresenta os dados desses parâmetros em pacientes com AR, separadas pelo grau de atividade da doença.

Tabela 17. Concentração das substâncias inflamatórias (fibrinogênio, proteína C reativa, IL-6, IL-10, TNF- α , IL-1 β , IL-2, VCAM, ICAM, PAI-1), segundo o grau de atividade da doença. São Paulo, 2013.

Parâmetros	Grau de atividade da doença		
	Remissão	Leve	Moderada/intensa
Fibrinogênio (ng/mL)	5020,5 $\pm$ 2729,2	5435,2 $\pm$ 3295,4	4530,9 $\pm$ 2341,3
PCR (ng/mL)	13,0 $\pm$ 11,6	7,5 $\pm$ 6,1	9,8 $\pm$ 4,9
IL-6 (pg/mL)	3,1 $\pm$ 4,1	7,1 $\pm$ 6,0	9,8 $\pm$ 8,5
IL-10 (pg/mL)	3,9 $\pm$ 3,4	4,6 $\pm$ 3,2	23,1 $\pm$ 12,5*
TNF- α (pg/mL)	19,5 $\pm$ 16,3	21,3 $\pm$ 17,7	9,8 $\pm$ 4,7
IL-1 β (pg/mL)	2,1 $\pm$ 1,1	4,55 $\pm$ 5,8	1,3 $\pm$ 0,6
IL-2 (pg/mL)	4,27 $\pm$ 3,8	6,8 $\pm$ 6,0	9,5 $\pm$ 8,8
VCAM (ng/mL)	1038,7 $\pm$ 405,6	799,6 $\pm$ 363,3	657,9 $\pm$ 337,2
ICAM (ng/mL)	336,8 $\pm$ 522,9	172,3 $\pm$ 62,3	185,3 $\pm$ 62,3
PAI-1 (ng/mL)	141,5 $\pm$ 54,5	117,6 $\pm$ 40,9	146,0 $\pm$ 98,9

Legenda: PCR: proteína C reativa; IL-6: interleucina-6; IL-10: interleucina-10; TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa; IL-1 β : interleucina-1beta; IL-2: interleucina-2; VCAM: molécula de adesão vascular; ICAM: molécula de adesão celular intercelular; PAI-1: inibidor de plasminogênio-1. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio-padrão; *p-valor<0,05: diferenças significativas entre os grupos; p-valor>0,05: não houve diferença entre os grupos.

As citocinas pró-inflamatórias estão envolvidas no desenvolvimento da AR e são responsáveis por mediar a inflamação na região sinovial das junções articulares. Concentrações elevadas de IL-6 séricas e nos fluidos sinoviais têm sido encontradas nesses pacientes (HOUSLAU *et al.*, 1988), sendo esse parâmetro correlacionado com a atividade da doença e com danos radiográficos observados nessas junções (USON *et al.*, 1997). A proteína C reativa (PCR) é produzida no fígado em resposta à IL-6, sendo também relacionada à atividade da doença (YILDIRIM *et al.*, 2004). Apesar de elevações modestas da PCR estarem presentes em situações crônicas e inflamatórias (FRANCISCO *et al.*, 2006) e seus níveis praticamente triplicarem na presença de risco de doenças vasculares periféricas (ABDELLAOUI; AL-KHAFFAFH, 2007), esse é um marcador agudo de inflamação sendo passível de grandes flutuações pela presença de infecções (FRANCISCO *et al.*, 2006). Pemberton e colaboradores (2009) mostraram uma associação desses biomarcadores com o DAS-28, assim como Teixeira e colaboradores (2007) observaram uma correlação positiva entre o ICAM-1 e parâmetros de atividade da doença (VHS, DAS 28) em pacientes com AR. A produção da ICAM-1 é induzida por citocinas na disfunção do endotélio e está envolvida no início da inflamação, mantendo-se presente na sinovite reumatoide (KLIMIUK *et al.*, 2002).

No presente estudo, citocinas anti-inflamatórias, pró-inflamatórias, e moléculas de adesão não diferiram entre os grupos por atividade da doença. Esses resultados foram diferentes do observado na literatura. Para este trabalho, o score obtido pelo DAS-28 foi utilizado para classificar as participantes quanto à atividade da doença, sendo usados: o número de articulações edemaciadas, a concentração da PCR, a avaliação global de saúde (AGS) e a escala visual analógica (EVA). Esses dois últimos parâmetros são bastante subjetivos e dependem da informação relatada pelo paciente. Desse modo, a classificação dos pacientes segundo o nível de atividade da doença é influenciável pelos parâmetros subjetivos. Além disso, estudos mostram que o VHS é um parâmetro mais sensível de avaliação da atividade da doença do que a PCR. Esses fatores, aliados à ampla variabilidade interpessoal, muitas vezes decorrente da individualização do tratamento medicamentoso, podem ter mascarado possíveis diferenças entre os graus de atividade da doença.

O efeito da suplementação com castanha-do-brasil como fonte de selênio sobre os marcadores inflamatórios está ilustrado na figura 11.

Os dados mostram que a ingestão de uma noz da castanha-do-brasil não foi capaz

de atenuar o quadro inflamatório em pacientes com AR, apesar de melhorar o estado nutricional relativo ao selênio e o *status* antioxidante do grupo estudado.

Bae e colaboradores (2009) realizaram um estudo clínico *crossover* no qual os sujeitos da pesquisa foram randomicamente categorizados em três grupos, para receberem a seguinte suplementação: quercetina+vitamina C e ácido α -lipóico ou placebo, por 4 semanas seguido de um período de *wash out* de 2 semanas. Os resultados mostraram que os marcadores de inflamação (PCR, TNF- α , IL-6, IL-1 β) estavam inalterados. Segundo os pesquisadores, diversos foram os fatores que levaram a falta de eficácia da suplementação antioxidante e incluíram: o baixo grau de atividade da doença (DAS-28= $2,6 \pm 0,8$), a baixa dosagem dos componentes oferecidos às participantes e o pequeno número de participantes. Tarp e colaboradores (1987) observaram que a suplementação com selênio foi eficaz em restaurar o estado nutricional relativo ao Se de pacientes com AR, por meio da determinação das concentrações séricas e eritrocitárias. No entanto, a suplementação do mineral não foi eficaz em melhorar a atividade enzimática da GPx nos leucócitos.

Em cultura de células, Kim e colaboradores (2004) verificaram que o Se atenuou as concentrações das EROs e NO induzidas pelo LPS em macrófagos. Os efeitos protetores do Se foram dependentes da ativação da p38 e do fator de transcrição NF- κ B. Em macrófagos deficientes em Se, a atividade da GPx mostrou-se reduzida e o estresse oxidativo aumentado se comparadas às células suplementadas com o mineral. Ao serem estimuladas com LPS, as células ativaram o fator de transcrição NF- κ B nos macrófagos deficientes em Se, culminando com o aumento da inflamação.

A ação anti-inflamatória do Se está relacionada ao seu efeito nas células do sistema imune, atuando especialmente em vias de transdução de sinal nos macrófagos (MAP quinases). Além disso, o aumento da concentração de Se pode inibir o fator de transcrição NF- κ B por meio da GPx e, desse modo, atenuar a inflamação (DUNTAS, 2009).

Na AR, ocorre um desequilíbrio na resposta imune celular, com a produção aumentada de EROs liberados dos leucócitos circulantes. Nesses pacientes, as vias do NF- κ B e das MAP-quinases encontram-se ativadas pelo excesso de EROs e de citocinas (SWEENEY; FIRESTEIN, 2004). No presente estudo, as participantes apresentaram altas concentrações dos marcadores inflamatórios, apesar da média do DAS-28 ser de 3,05 e indicar atividade leve da doença. Além disso, as participantes apresentaram duração da doença superior a 5 anos que, segundo a literatura, é condizente com o quadro

inflamatório crônico (TEIXEIRA, 2007). O exame físico dessas pacientes mostrou sinais de atividade clínica da doença associados a sinais de cronicidade como a presença de alterações radiográficas importantes nas junções articulares. Esses achados foram confirmados pelas altas concentrações de citocinas de fase aguda de inflamação, corroborando com os dados encontrados na literatura em indivíduos com AR.

Legenda: Legenda: PCR: proteína C reativa; IL-6: interleucina-6; IL-10: interleucina-10; TNF-α: fator de necrose tumoral-alfa; IL-1β: interleucina-1beta; IL-2: interleucina-2. Grupo T0: participantes antes da suplementação com castanha-do-brasil; Grupo T1: participantes após a suplementação com castanha-do-brasil. Resultados apresentados como média ± desvio-padrão; *p-valor<0,05: diferenças significativas entre os tempos T0 e T1.

Figura 11. Concentração das substâncias inflamatórias (fibrinogênio, proteína C reativa, IL-6, TNF-α, IL-1β, IL-2) e anti-inflamatória (IL-10), segundo o tempo de avaliação, de pacientes com AR. São Paulo, 2013.

Estudos realizados por Pemberton e colaboradores (2209), Wallberg-Jonsson e colaboradores (2001) e Teixeira e colaboradores (2007) mostram que, de fato, pacientes com AR apresentam níveis elevados de citocinas inflamatórias quando comparados à população saudável. Por outro lado, neste trabalho, as moléculas de adesão VCAM, ICAM e sE-selectina tiveram suas concentrações aumentadas após a intervenção com castanha-do-brasil ($p\text{-valor}<0,01$, para ambas as substâncias). A ingestão da nóz também promoveu um incremento no PAI-1 ($p\text{-valor}<0,05$) (figura 12).

Legenda: VCAM: molécula de adesão vascular; ICAM: molécula de adesão celular intercelular; PAI-1: inibidor de plasminogênio-1. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio-padrão; * $p\text{-valor}<0,05$ e $p\text{-valor}<0,01$: diferenças significativas entre os tempos.

Figura 12. Concentração de moléculas de adesão (VCAM e ICAM e sE-selectina) e do inibidor de plasminogênio ativado-1 (PAI-1), segundo os tempos de avaliação, de pacientes com AR. São Paulo, 2013.

Segundo Gedeit (1996), concentrações elevadas das moléculas de adesão (em especial selectina) podem resultar do aumento de sua expressão em pacientes com AR, comparados aos indivíduos saudáveis. Em pacientes com doença coronariana ou com aterosclerose incidente, esses valores podem ainda ser mais elevados (HUANG *et al.*, 1997). Pemberton e colaboradores (2009) avaliaram as concentrações de VCAM e selectina em pacientes com AR, tendo sido encontrados valores similares e aumentados, respectivamente, comparados aos obtidos no presente estudo. Já os valores de ICAM foram inferiores e considerados negativos (<306 ng/mL) se comparados aos observados por Wallberg-Jonsson (2001) (364ng/mL) e Teixeira (2007) (330 ng/mL). Ainda, esses valores indicam que as participantes do presente estudo não apresentam comprometimento da função endotelial sob a forma de vasculite.

Na AR, o risco para desenvolver doenças cardiovasculares é elevado, devido à expressão aumentada de moléculas de adesão. Em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC-s) pré-tratadas com selenito de sódio (0-2 mM) por 24 horas e, em seguida, tratadas com 0 ou 50 mM U/mL de TNF- α ; o selenito inibiu significativamente a expressão 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 eficaz em inibir a translocação desse fator para o núcleo. Desse modo, os autores concluíram que o selênio pode modular a expressão da ICAM-1, VCAM-1 e selectina-E por meio da indução das citocinas em HUVECs, e esta modulação não é realizada pela inibição do NF- κ B (ZHANG *et al.*, 2002).

Um fator que pode ter exercido influência sobre este parâmetro foi o tratamento farmacológico na qual as pacientes são submetidas. A estabilidade dos medicamentos em pelo menos 3 meses antes do início do protocolo experimental foi um dos fatores de inclusão das participantes. A manutenção da terapia medicamentosa também foi verificada por meio dos prontuários eletrônicos, no entanto alterações no seguimento do tratamento podem ter contribuído para os resultados obtidos.

Os valores da diferença entre os instantes T1 e T0, referentes aos marcadores inflamatórios, foram categorizados de acordo com o genótipo do indivíduo para o SNP Pro198Leu (Tabela 18). Não houve diferença estatística entre os grupos de genótipos, considerando a interleucina pró-inflamatória, as anti-inflamatórias e as moléculas de adesão.

Tabela 18. Diferença da concentração de substâncias inflamatórias (fibrinogênio, proteína C reativa, IL-6, TNF- α , IL-10, IL-1 β , IL-2, VCAM, ICAM, PAI-1, sE-selectina) entre os instantes T1 e T0 e separadas por genótipo, em pacientes com artrite reumatoide. São Paulo, 2013.

Parâmetros	Pro/Pro		Pro/leu		Leu/Leu		p-valor
	Média $\pm$ DP (T1-T0)	IC	Média $\pm$ DP (T1-T0)	IC	Média $\pm$ DP (T1-T0)	IC	
Fibrinogênio	1644 $\pm$ 2688	(534---2754)	1182 $\pm$ 2886	(521,8---2886)	370 $\pm$ 1673	(-3787---4527)	0,68
PCR	-5,3 $\pm$ 7,5	(-8,4---2,1)	-2,4 $\pm$ 9,6	(-7,7---2,87)	-8,8 $\pm$ 12,4	(-39,7 ---22,1)	0,42
IL-6	-7,6 $\pm$ 717,6	(-15---0,1)	-1,2 $\pm$ 15,8	(-10---15)	3,6 $\pm$ 8,3	(-16,9---24,1)	0,35
IL-10	0,76 $\pm$ 3,45	(-0,66---2,18)	-0,5 $\pm$ 10,4	(-6,2---5,3)	1,35 $\pm$ 1,40	(-2,1---4,8)	0,80
TNF-α	-0,3 $\pm$ 12,8	(-5,6---4,9)	34,1 $\pm$ 59,1	(-34,1--- -68,7)	-1,3 $\pm$ 5,3	(-14,5---11,9)	0,10
IL-1β	-1,5 $\pm$ 5,3	(-3,7---0,8)	-1,15 $\pm$ 3,85	(-3,2---0,9)	0,7 $\pm$ 1,1	(-2,0---3,5)	0,74
IL-2	-2,3 $\pm$ 9,5	(-6,2---1,6)	-4,7 $\pm$ 19,3	(-15,3---5,9)	0,1 $\pm$ 0,5	(-1,1---1,3)	0,81
VCAM	111,8 $\pm$ 329,1	(-24,3---248,5)	276,5 $\pm$ 384,1	(63,8---489,1)	197,6 $\pm$ 524,9	(-1106---1501)	0,38
ICAM	21,2 $\pm$ 63,3	(-4,9---47,4)	85,5 $\pm$ 43,5	(1,1---169,1)	709 $\pm$ 1208	(-229,2---3711)	0,10
PAI-1	8,37 $\pm$ 60,5	(-16,6---33,4)	43,3 $\pm$ 136,7	(-32,3---119,2)	59,3 $\pm$ 99,7	(-188,5---307,1)	0,43
sE-selectina	8,2 $\pm$ 26,7	(-2,8---19,2)	16,2 $\pm$ 38,7	(-116---158,9)	21,1 $\pm$ 55,5	(-116---158,9)	0,73

Legenda: PCR: proteína C reativa; IL-6: interleucina-6; IL-10: interleucina-10; TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa; IL-1 β : interleucina-1beta; IL-2: interleucina-2; VCAM: molécula de adesão vascular; ICAM: molécula de adesão celular intercelular; PAI-1: inibidor de plasminogênio-1. Resultados apresentados como média $\pm$ desvio-padrão e intervalo de confiança IC (-95%---95%). Não houve diferença entre os grupos, $p > 0,05$.

Na literatura, tem sido encontrada diversas pesquisas buscando entender a relação gene-nutriente (DA COSTA *et al.*, 2012; CURTI *et al.*, 2011). Nesse sentido, diversos trabalhos analisaram e continuam associando o estado nutricional relativo aos micronutrientes de pessoas saudáveis (BEZERRA, 2014) e enfermas com a presença de polimorfismos (CURTI *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2011; ZHUO; DIAMOND, 2009; RAVNHARREN *et al.*, 2006; GOERLITZ *et al.*, 2011; COMINETTI *et al.*, 2012) e expressão gênica (RNAm) e proteica (LEI *et al.*, 2009).

A presença de SNPs no gene da GPx1, enzima dependente de selênio, aumenta o risco de desenvolvimento de câncer de bexiga, pulmão e mama (MOCCHEGIANI *et al.*, 2014). No entanto, essa susceptibilidade é ainda mais intensa quando na presença de outro SNP na enzima antioxidante MnSOD ou CuZnSOD e pela presença de fatores ambientais, como o consumo exagerado de álcool (TSENG *et al.*, 2013; RAASCHOU-NIELSEN *et al.*, 2007) e o fumo (RAASCHOU-NIELSEN *et al.*, 2007).

A mudança do aminoácido prolina para leucina também foi encontrada na região 3'UTR de outras isoformas da GPx, tais como da GPx₂, GPx₃ e GPx₄ (VOETSH *et al.*, 2007). Entre essas isoformas, SNPs na GPx₃ e na GPx₄ parecem ocasionar alteração funcional das enzimas (VOETSH *et al.*, 2007; KIM; MILNER, 2001). Tem sido relatado que pessoas homozigotas para o alelo variante da GPx₃ têm risco aumentado de infarto do miocárdio (VOETSH *et al.*, 2007) e que a suplementação de selênio foi mais efetiva para os indivíduos CC para o gene da GPx₄ (MEPLAN *et al.*, 2008), semelhante ao observado no presente estudo para o gene da GPx1. Além disso, a presença de SNP na selenoproteína P, por exemplo, pode alterar o transporte do mineral para o fígado e sua consequente distribuição para os tecidos (SCHOMBURG *et al.*, 2003). Além disso, para estudar o impacto da presença de alelos variantes sobre o metabolismo do selênio e sobre sua ação anti-inflamatória e antioxidante; é importante considerar que existe uma hierarquia e competição entre as selenoproteínas (HESKETH, 2008), uma vez que mudanças na síntese de uma selenoproteína pode alterar outra selenoproteína. Desse modo variações genéticas de um SNP podem ser contrabalanceadas por alelos variantes de outros genes (HESKETH, 2008; HESKETH; MEPLAN, 2011).

No presente estudo, não houve diferença entre os genótipos quanto aos marcadores de estresse oxidativo e inflamação. Por outro lado, os dados obtidos por meio da análise de regressão linear múltipla mostraram que os indivíduos CC foram mais responsivos à melhora do estado nutricional relativo ao selênio. A avaliação de polimorfismos em outros

genes (GPx3, SePP e TNF- α , IL-6, IL-1 β) seria importante para avaliar o efeito da suplementação com castanha-do-brasil em pacientes com AR.

Um maior número de participantes, principalmente do genótipo TT, é também importante para tentar explicar se a tendência dos indivíduos TT em apresentar menores concentrações de selênio após a intervenção aconteceu devido a uma alteração no transporte do mineral ou pela presença do polimorfismo Pro198Leu.

6. CONCLUSÕES

As participantes deste estudo apresentam estado nutricional deficiente em selênio, estresse oxidativo e quadro inflamatório exacerbado.

A suplementação com 350 µg/dia de selênio durante 60 dias por meio da castanha-do-brasil foi eficiente para melhorar o estado nutricional das participantes do estudo em relação a este mineral, assim como uma redução do estresse oxidativo.

A presença do polimorfismo Pro198Leu modificou as respostas dos indivíduos CT e TT em relação à suplementação, sendo inferior a dos indivíduos CC.

Embora os resultados não tenham possibilitado conclusões mais contundentes, a suplementação com uma nóz de castanha-do-brasil por dia mostra-se promissora para estes pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASETH, J.; MUNTHE, E.; FORRE, O.; STEINNES, E. Trace elements in serum and urine of patients with rheumatoid arthritis. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 7, p.237-240, 1978.

ACR Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines: Guidelines for the Management of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheumatology**, v. 46:, p.28-46, 2002.

ALARMANOS, Y.; DROSOS, A.A. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. **Autoimmunity Reviews**. v.4, n.3, p.130-136, 2005.

ALEGRÍA, A.; BARBERÁ, R.; CLEMENTE, G.; FARRÉ, R.; GARCÍA, M. J.; LAGARDA, M. J. Selenium and glutathione peroxidase reference values in whole blood and plasma of a reference population living in Valencia, Spain. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 10, n. 4, p. 223-228, 1996.

ALETAHA. Rheumatoid Arthritis Classification Criteria. An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative. **Arthritis & Rheumatism**, v. 62, n.9, p.2569–2581, 2011.

ALTINDAG, O.; KARAKOC, M.; KOCYIGIT, A.; CELIK, H.; SORAN, N. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. **Clinical Biochemistry**, v.40, p.167-171, 2007.

AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY. Subcommittee on Rheumatology Arthritis Guidelines. Guidelines for the management of rheumatoid Arthritis. **Arthritis Rheumatology**, v.46, p.328-346, 2002.

ANGSTWURM, M.W.; ENGELMAN, I.; ZIMMERMANN, T.; LEHMANN, C.; SPES, C.H.; ABEL, P.; STRAN, R.; MEIER-HELLMAN, A.; INSEL, R.; RADKE, J.; GARTNER, R. Selenium in intensive care (SIC): Results of a prospective randomized placebo-controlled, multiple-center study in patients with severe systemic inflammatory response syndrome, sepsis and septic shock. **Critical Care Medicine**, v.35, p.118-126, 2007.

ARSOVA-SARAFINOVSKA, Z.; MATEVSKA, N.; EKEN, A.; PETROVSKI, D.; BANEV, S.; DZIKOVA, S.; et al. Glutathione peroxidase 1 (GPX1) genetic polymorphism, erythrocyte GPX activity, and prostate cancer risk. **International Urology and Nephrology**, v. 41, n. 1, p. 63-70, 2009.

ASHOUR, M.; SALEM, S.; HASSANEEN, H. ET AL. Antioxiant status in children with juvenile rheumatoid arthritis(JRA) living in Cairo, Egypt. **Int J Food Sci Nutr**, v.51, p.85-90, 2000.

BAE, S.C.; KIM, S.J.; SUNG, M.K. Inadequate antioxidant nutrient intake and altered plasma antioxidant status of rheumatoid arthritis patients. **Journal of American College of Nutrition**, v.22, p. 311-315, 2003.

BARCELOUX, G.D. Selenium. **Clinical Toxicology**, v.37, n.2, p.145-172, 1999.

BARNES, K.M.; EVENSON, J.K.; RAINES, A.M.; SUNDE, R.A. Transcript Analysis of the Selenoproteome Indicates That Dietary Selenium Requirements of Rats Based on Selenium-Regulated Selenoprotein mRNA Levels Are Uniformly Less Than Those Based on Glutathione Peroxidase Activity¹. . **Biochemical, Molecular, and Genetic Mechanisms**, p.199-206, 2009.

BÉRTOLO, MB. et al. Atualização do Consenso Brasileiro de Diagnóstico e Tratamento da Artrite Reumatóide. **Revista Brasileira de Reumatologia** v.47, n.3, p.151-159, 2007.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. **Free Radical Biology & Medicine**, v.27, n.9/10, p.951-965, 1999.

BRIGELIUS-FLOHE, R.; KIPP, A. Glutathione peroxidases in diVerent stages of carcinogenesis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1790, n.11, p.1555– 1568, 2009.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; MAIORINO, M. Glutathione peroxidases. **Biochimica et Biophysica Acta**, p.3289-3303, 2013.

BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, v. 234, n. 2, p. 177-186, 1999.

BROWN, B.G.; ZHAO, X.Q.; CHAIT, A.; et al. Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease. **New England Journal Medicine**, v. 345, p.1583–1592, 2001.

BROWN, K.M.; PICKARD, K.; NICOL, F.; BECKETT, G.J.; DUTHIE, G.G.; ARTHUR, J.R. Effects of organic and inorganic selenium supplementation on selenoenzyme activity in blood lymphocytes, granulocytes, platelets and erythrocytes. **Clinical Science**, v.98, p.593-599, 2000.

BURKE, R.F.; HILL, K.E. Selenoprotein P. An extra cellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. **Annu. Ver. Nutr.**, Bethesda, v.25, p.215-235, 2005.

BURMESTER, G.R.; EUGEN, F.; DÖRNER, T. Emerging cell and cytokine targets in rheumatoid arthritis. *Nature review of Rheumatology*, v.10, p.77-88, 2014.

CANNON, G.W.; OPENSHAW, S.J.; HIBBS, J.B, JR.; HODIAL, J.R.; HUECKSTEADT, T.P.; GRIFFITHS, M.M. Nitric oxide production during adjuvant-induced and collagen-induced arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v.39, 1677-1684, 1996.

CANTER, P.H.; WIDER, B.; ERNST, E. The antioxidant vitamins A, C, E and selenium in the treatment of arthritis: a systematic review of randomized clinical trials. **Rheumatology**, V.46, P.1223–1233, 2007.

CARDOSO, B. R.; ONG, T. P.; JACOB-FILHO, W.; JALUUL, O.; FREITAS, M.; COMINETTI, C.; COZZOLINO, S. M. F. Glutathione peroxidase 1 polymorphism in Brazilian Alzheimer's disease patients: relations to the enzyme activity and to selenium status. **Journal of Nutrigenetic and Nutrigenomics**, v. 5, n. 2, p. 72-80, 2012.

CASTRO, M.W. Selênio en los pacientes críticos con respuesta inflamatoria sistémica: Revisión. **Nutrición Hospitalaria**, v.3, n.22, , p.295-306, 2007.

CHEN, J.; CAO, Q.; QIN, C.; SHAO, P.; WU, Y.; WANG, M.; ZHANG, Z.;- YIN, C. *GPx-1* polymorphism (rs1050450) contributes to tumor susceptibility: evidence from meta-analysis. **J Cancer Res Clin Oncol**, v.137, p.1553–1561, 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, *Bethotia excelsa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.13, p.4318-4322, 2004.

CIMEN, M.Y.B.; CIMEN, O.B.; KACMAZ, B.; OZTURK, H.S.; YORGANCIOGLU, R.; DURAK, I. Oxidant/antioxidant status of the erythrocytes from patients with rheumatoid arthritis. **Clin Rheumatol**, v.19, p.275-277, 2000.

COGALSIL, S.; TAYSI, S. Levels of Antioxidant Proteins and Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1 in Serum of Patients with Rheumatoid Arthritis. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, vol. 32, no. 3, 2002.

COMBS, J.R, G.F. Selenium in global food systems. **British Journal of Nutrition**, v.85, p.517-547, 2001.

COMINETTI, C.; BORTOLI, M. C.; ABDALLA, D. S. P.; COZZOLINO, S. M. F. Considerações sobre estresse oxidativo, selênio e nutrigenética. **Nutrire**. v. 36, n. 3, p. 131-153, 2011b.

COMINETTI, C.; BORTOLI, M. C.; PURGATTO, E.; ONG, T. P.; MORENO, F. S.; GARRIDO JR, B. G.; 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**, v. XXX, p. 1–6, 2011a.

COMINETTI, C.; BORTOLI, M.C.; GARRIDO, A.B.; COZZOLINO, S.M. Brazil 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.; PURGATO, 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.

COSTA, E. V. Da escravidão ao trabalho livre. In: **Da monarquia à república: momentos decisivos**. São Paulo: UNESP, 1997. p. 345-384.

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**. 2003. 175f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

CUNNANE, G.; HUMMEL, K. M.; MULLER-LADNER, U.; GAY, R. E.; GAY, S. Mechanism of joint destruction in rheumatoid arthritis. **Arch. Immunology. Ther. Exp.**, v.46, 1–7, 1998.

CURTI, M.L.R.; JACOB, P.; BORGES, M.G.; ROGERO, M.M.; FERREIRA, S.R.G. Studies of Gene Variants Related to Inflammation, Oxidative Stress, Dyslipidemia, and Obesity: Implications for a Nutrigenetic Approach. **Journal of Obesity**, V.2011, p.1-32, 2011.

CUSH, J.J.; ROTHLEIN, R.; LINDSLEY, H.B.; MAINOLFI, E.A.; LIPSKY, P.E. Increased levels of circulating intercellular adhesion molecule 1 in the sera of patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheumatology**, v. 36, p.1098–1102, 1993.

CUTOLO, M.; SULLI, A.; BARONE, A.; SERIOLO, B.; ACCARDO, S. Macrophages, synovial tissue and rheumatoid arthritis. **Clinical Experimental Rheumatology**, v. 11, p. 331–339, 1993.

DA COSTA; L.A.; BADAWI, A.; EL-SOHEMY, A. Nutrigenetics and modulation of oxidative stress. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v.60, n.3, p.27-36, 2012.

DARLINGTON, L.G.; RAMSEY, N.W. Review of dietary therapy for rheumatoid arthritis. **Br J Rheumatol**. v.32, p. 507-514, 1993.

DARLINGTON, L.G.; STONE, T.W. Antioxidants and Fatty Acids in the amelioration of Rheumatoid Arthritis and Related Disorders. **British Journal of Nutrition**, v.85, p. 251-269, 2001.

DONADIO, J. L. S. **Polimorfismos nos genes da enzima glutathione peroxidase e biomarcadores do estado nutricional relativo ao selênio em população adulta de São Paulo**. 2011. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

DUFFIELD AJ, THOMSON CD, HILL KE, et al. An estimation of selenium requirements for New Zealanders. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.70, p.896-903, 1999.

DUMONT, E.; DE PAUW, L.; VANHAECKE, F.; CORNELIS, R. Speciation of selenium in *Bertholletia excelsa* (Brazil nut): a hard nut to crack. **Food Chemistry**, v. 95, p. 684-692, 2006.

DUNTAS, L. H. Selenium and inflammation: underlying anti-inflammatory mechanisms. **Hormonal Metabolic Research**, v. 41, p. 443-447, 2009.

ERDEM, O.; EKEN, A.; AKAY, C.; Arsova-Sarafinovska, Z.; Matevska, N.; Suturkova, L.; Erten, K.; O'zgok, Y.; Dimovski, A.; Sayal, A.; Aydin, A. Association of GPX1 polymorphism, GPX activity and prostate cancer risk. **Human and Experimental Toxicology** 31(1) 24–31, 2012.

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: Acesso em 10 novembro de 20013.

ESTADOS UNNIDOS. INTITUTE OF MEDICINE. Nutrient assessment of individuals: statistical foundations. In: Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. Disponível em: <http://www.nap.edu/openbook>. 2001, cap 1, p.21-34.

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 comission on selenium-enriched yeast as a source of selenium**. EFSA Journal, v.766, p.1-43, 2008.

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.1337-1367, 2011.

FERNANDES, V.; ASSIS, T.M.; QUEIROZ, C.C.; FIGUEIREDO, P.P.R.; OLIVEIRA, R.U.; SILVA, N.A. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 51, n. 3, p.220-230, 2011.

FERRARI, C. K. B. Minerals: From Basic Aspects to Newly Discovered Physiological and Nutritional Actions. **Evidence-Based Integrative Medicine**, v. 2, n.3, p. 123-131, 2005.

FINLEY, J.W. Bioavailability of selenium from foods. **Nutrition Reviews**, v.64, p.146-151, 2006.

FIRESTEIN, G.S. Evolving Concepts of Rheumatoid Arthritis. **Nature**, v.423, p.356-361, 2003.

FOSBERG, L.; De FAIRE, U.; MORGENSTERN, R. Low Yield of Polymorphisms from EST Blast Searching: Analysis of Genes Related to Oxidative Stress and Verification of the P197L Polymorphism in GPX1. **Human Mutation**, v. 13, p. 294-300, 1999.

GAMBHIR, J.K.; LALI, P.; JAIN, A.K. Correlation between blood antioxidant levels and lipid peroxidation in rheumatoid arthritis. **Clinical Biochemistry**, v.30, n.4, p.351-355, 1997.

GARTNER, R.; ALBRICH, W.; ANGSTWURM, M. W. The effect of a selenium supplementation on the outcome of patients with severe systemic inflammation, burn and trauma. **Biofactors**, v. 14, p. 199-204, 2001.

GEARING, A.J.H, NEWMAN W. Circulating adhesion molecules in disease. **Immunology Today**,v.14, p.506-512, 1993.

GEDEIT, R.G. Tumor necrosis factor induces E-selectin expression on vascular endothelial cells. **Critical Care Medicine**, v. 24:1543-6, 1996.

GELDERMAN, K.A.; HULTQVIST, M. OLSSON, L.M.; BAUER, K.; PIZZOLA, A.; OLOFSSON, P.; HOLMDAHL, R. Rheumatoid Arthritis: the Role of Reactive Oxygen Species in Disease Development and Therapeutic Strategies. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 9, n.10, p.1541-1561, 2007.

GERLA, P.J.; SHARIF, M.U.; KOROM, S.F. Geochemical process controlling the spatial distribution of selenium in soil and water, West central South Dakota, USA. **Environmental Earth Sciences**, v.62, p.1551-1560, 2011.

GOERLITZ, D.S, et al. GSTM1, GSTT1 null variants and GPX1 single nucleotide polymorphism are not associated with bladder cancer risk in Egypt. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 2011.

GONZAGA, I. B. **Avaliação nutricional relativa ao selênio em crianças com dieta enriquecida de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K)**. 2002. 115f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

GRABOWSKI, P.S.; ENGLAND, A.J.; DYKHUIZEN, R.; COPLAND, M.; BENJAMIN, N.; REID, D.M. Elevated nitric oxide production in rheumatoid arthritis: Detection using the fasting urinary nitrate: creatinine ratio. **Arthritis and Rheumatism**, v.39, p.643-647, 1996.

GROMADZINSKA, J.; RESZKA, E.; BRUZELIUS, K.; WASOWICS, W.; AKESSON, B. Selenium and câncer: biomarkers of selenium status and molecular action of selenium supplements. **European Journal of Nutrition**, v. 47, suppl 2, p.S29-S50, 2008.

HAAN, J.B.; CRACK, P.J.; FLENTJAR, N.; IANELLO, R.C.; HERTZOG, P.J.; KOLA, I. An imbalance in antioxidant defense affects cellular function: the pathophysiological consequences of a reduction in antioxidant defense in the glutathione peroxidase-1 (Gpx1) knockout mouse. **Redox Report**, Vol. 8, No. 2, p.69-79., 2003.

HAAN,J.B.; BLADIER, C., GRIFFITHS, P.; KELNER, M.; O'SHEA, R.D. et al. Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress- inducing agents paraquat and hydrogen peroxide, **J. Biol. Chem.**, v.273, p. 22528–22536,1998.

HAGFORS, L.; LEANDERSON, P.; SKOLDSTAM, L.;ANDERSSON, J.; JOHANSSON, G. Antioxidant intake, plasma antioxidants and oxidative stress in a randomized, controlled, parallel, mediterranean, dietary intervention study on patients with rheumatoid arthritis. **The journal of Nutrition**, v. 2, p.5, 2003.

HAMANASHI, T.; FURUTA, H.; KATO, H.; DOI, A.; TAMAI, M.; SHIMOMURA, H.; SAKAGASHIRA, S.; NISHI, M.; SASAKI, H.; SANKE, T.; NA, K. Functional variants in the GPX1 gene are associated with increased intima media thickness of carotid arteries and risk of macrovascular disease. **Diabetes**, v. 53, n. 9, p. 2455-2460, 2004.

HANDS, E. S. **Nutrient in Foods**. Philadelphia: Lippincott Williams & Williams, 1999.

HANSEN, R.D, et al. GPX1 Pro(198)Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, interaction with alcohol consumption and smoking, and risk of colorectal cancer. **Mutat Res**, v. 664, n.1–2, p.13–19, 2009.

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.

HASSAN, M.Q.; HADI, R.A.; AL-RAWI, Z.S.; PADRON, V.A.; STOHS, S.J. The Glutathione Defense System in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **Journal of Applied Toxicology**, v.21, p.69-73, 2001.

HEINLE, K.; ADAM, A.; GRADL, M.; WISEMAN, M.; ADFAM, O. Selenium concentration in erythrocytes of patients with rheumatoid arthritis. Clinical and laboratory chemistry injection markers during administration of selenium. **Medicine. Clinical Journal**, v.92, n.3, p.29-31, 1997.

HELMERSSON, J.; ARNLOV, J.; VESSBY, B.; et al. Serum selenium predicts levels of F2-isoprostanes and prostaglandin F2alpha in a 27 year follow-up study of Swedish men. **Free Radical Research**, v. 39, p.763–770, 2005.

HESKETH, J. Nutrigenomics and selenium: gene expression patterns, physiological targets, and genetics. **Annual Review of Nutrition**, v. 28, 157–177, 2008.

HESKETH, J.; MEPLAN, C. Transcriptomics Q4 and functional genetic polymorphisms as biomarkers of micronutrient function: focus on selenium as an exemplar. **The Proceedings of the Nutrition Society**, p. 1–9, 2011.

HIRAGI, C. O.; MIRANDA-VILELA, A. L.; ROCHA, D. M. S; OLIVEIRA, S. F.; HATAGIMA, A.; KLAUTAU-GUIMARÃES, M. N. Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferases M1 and T1 gene polymorphisms in three Brazilian population Groups. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, n. 1, p. 11-18, 2011.

HITCHON, C.A.; EL-GABALAWY, H.S. Oxidation in Rheumatoid arthritis. **Arthritis research & Therapy**, v.6, n.6, p.265-278, 2004.

HONKANEN, V.E.A. The factors affecting plasma glutathione peroxidase and selenium in rheumatoid arthritis: a multiple linear regression analysis. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, v. 20, p. 385-391, 1991.

HONKANEN, V.E.A. The factors affecting plasma glutathione peroxidase and selenium in rheumatoid arthritis: a multiple linear regression analysis. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 20, p. 385-391, 1991.

HOUSIAU, F.A.; DEVOGELAER, J.P.; VAN DAMME, J.; DE DEUXCHAISNES, C.N.; VAN SNICK, J. Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. **Arthritis Rheumatology**, v.31, p.784-788, 1988.

Hu YJ, Diamond AM (2003) Role of glutathione peroxidase 1 in breast cancer: loss of heterozygosity and allelic differences in the response to selenium. *Cancer Res* 63(12):3347–3351.

HUANG, K.; LIU, H.; CHEN, Z.; et al. Role of selenium in cytoprotection against cholesterol oxide-induced vascular damage in rats. **Atherosclerosis**, v.162:137–144, 2002.

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

IIDA, R.; TSUBOTA, E.; YUASA, I.; TAKESHITA, H.; YASUDA, T. Simultaneous genotyping of 11 non-synonymous SNPs in the 4 glutathione peroxidase genes using the multiplex-single base extension method. **International Journal of Clinical Chemistry and Diagnostic Laboratory Medicine**, v. 402, p. 79-82, 2009.

INSTITUTE OF MEDICINE. FOOD AND NUTRITION BOARD. **Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids**. Washington, DC: National Academy Press: 2002.

INSTITUTE OF MEDICINE. NATIONAL ACADEMIES PRESS. **Dietary reference intakes form vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids**. Washington: National Academy Press, 2000. p.284-324.

INSTITUTE OF MEDICINE. NATIONAL ACADEMIES PRESS. **Dietary reference intakes: applications in dietary planning**. Washington: National Academy Press, 2003.

ISIK, A.; SELEK, S. Total Antioxidant Response and Oxidative Stress in Patients with Rheumatoid Arthritis. **Arastirm**, v.21, n.2, p.67-73, 2007.

JABLONSKA, E.; GROMADZINSKA, J.; RESZKA, E. et al. Association between GPx1 activity and plasma selenium concentration in humans. **Eur J Nutr**, v.48, p.383–386, 2009.

JABLONSKA, E.; GROMADZINSKA, J.; RESZKA, E.; WASOWICZ, W.; SOBALA, W.; SZESZENIA-DABRONSKA, N.; BOFFETTA, P. Association between GPx1Pro198Leu polymorphism, GPx1 activity and plasma selenium concentrations in humans. **European Journal of Clinical Nutrition**., (*in press*), 2009.

JANTTI, J.; VAPAATALO, H.; SEPPALA, E.; RUUTSALO, H-M.; ISOMAKI, H. Treatment of reumatoid arthritis with fish oil, selenium, vitamins A and E and placebo. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v.20, p.225, 1991.

JASIN, H.E. Mechanisms of Joint Destruction in Rheumatoid Arthritis. **Journal of Orthopedic Science**, v.5, p.178-181, 2000.

JASVINDER, K.; GAMBHIR, PRAMOD; LALI. Blood Selenium Levels in Healthy Indian Subjects and Patients with Rheumatoid Arthritis. **Clinical biochemistry**, Vol. 32, No. 8, 665–666, 1999.

JASWAL, S.; MEHTA, H.C.; SOOD, A.K.; KAUR, J. Antioxidant status in Rheumatoid arthritis and role of antioxidant therapy. **Clinica Chimica Acta**, v.338, p.123-129, 2003.

KALPAKCIOGLU, B.; SENEL, K. The Interrelation of Glutathione Reductase, Catalase, Glutathione Peroxidase, Superoxide Dismutase, and Glucose-6-Phosphate in The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **Clinical Rheumatology**, v.27, p.141-145, 2008.

KAMANLI, A.; NAZIROGLU, M.; AYDILEK, N.; HACIEVLIYAGIL, C. Plasma lipid peroxidation and antioxidant levels in patients with rheumatoid arthritis. **Cell Biochem Funct**, v.22, p. 53–57, 2004.

KANNAMKUMARATHA, S.S.; WROBEL, K.; WROBEL, K.; VONDERHEIDE, A.; CARUSO, J.A. HPLC-ICP-MS determination of selenium distribution and speciation in different types of nuts. **Talanta**, v.66, p.153-159, 2005.

KAPLANSKI, G.; CACOUB, P.; FARNARIER, C. et al. Increased soluble vascular cell adhesion molecule-1 concentrations in patients with primary or systemic lúpus erythematosus-related antiphospholipid syndrome, correlations with the severity of thrombosis. **Arthritis Rheum**, v. 43, p.55-64, 2000.

KAUWELL, G. P. A. Emerging concepts in nutrigenomics: a preview of what is to come. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 20, n. 1, p. 75-87, 2005.

KERIMOVA, A.A.; ATALAY, M.; YUSIFOV, E.Y.; KUPRIN, S.P.; KERIMOV, T.M.; Antioxidant enzymes: possible mechanism of gold compound treatment in rheumatoid arthritis. **Patophysiology**, v.7, p.209-213, 2000.

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.

KIM, Y.S., MILNER, J. Molecular targets for selenium in cancer prevention. **Nutrition and Cancer**, v. 40, p. 50–54, 2001.

KLIMIUK, P.A.; SIERAKOWSKI, S.; LATOSIEWICZ, R.; CYLWIK, J.P.; CYLWIK, B.; SKOWRONSKI, J.; CHIWIECKO, J. Soluble adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with variants of rheumatoid synovitis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 61, p. 804-9, 2002.

KNEKT, P.; HELIOVAARA, M.; AHO, K.; ALFTHAN, G.; MARNIEMI, J.; AROMAA, A. Serum selenium, serum alpha-tocopherol, and the risk of rheumatoid arthritis. **Epidemiology**, v.11, p.402-405, 2000.

KOSE, K.; DOGAN, P.; KARDAS, Y.; SARAYMEN, R. Plasma selenium levels in rheumatoid arthritis. **Biological Trace Element Research**, v.53, p.51-56, 1996.

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.

KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. Autoimmunity and oxidatively modified autoantigens. **Autoimmune Review**, v. 7, n. 7, p. 567-573, 2008.

KURIEN, B.T.; HENSLEY, K.; BACHMANN, M.; SCOFIELD, R.H. Oxidatively modified autoantigens in autoimmune diseases. **Free Radical and Biological Medicine**, v.41, p. 549-556, 2006.

KUZUYA, M.; ANDO, F.; IGUCHI, A.; SHIMOKATA, H. Glutathione peroxidase 1 Pro198Leu variant contributes to the metabolic syndrome in men in a large Japanese cohort1–3. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.87, p.1939-1944, 2008.

KWOH, C.K. American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis. Guidelines for the Management of Rheumatoid Arthritis. **Arthritis Rheumatology** v.46, p.328-346, 2002.

LAUCELLA, S.A.; GADDI, E.; BALBARYSKI, J.; GIRAUDI, V.; CUTTICA, R.J. Soluble intracellular adhesion Molecule- 1 in pediatric connective tissue diseases. **Acta Pediatrica**, v.88, p.399-403, 1999.

LEI, C.; NIU, X.; WEI, J.; ZHU, J.; ZHU, Y. Interaction of glutathione peroxidase 1 and selenium in endemic dilated cardiomyopathy. **Clinica Chimica Acta**, v.399, p.102-108, 2009.

LEI, X.G.; EVENSON, J.K. THOMPSON, K.M.; SUNDE, R.A. Glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase are differentially regulated in rats by dietary selenium. **Journal of Nutrition**, v.125, p.1438–46, 1995.

LEWIN, M. H.; ARTHUR, J. R.; RIEMERSMA, R. A.; NICOL, F.; WALKER, S. W.; MILLAR, E. M.; HOWIE, A. F.; BECKETT, G. J. Selenium supplementation acting through the induction of thioredoxin reductase and glutathione peroxidase protects the human endothelial cell line EAhy926 from damage by lipid hydroperoxides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1593, p. 85-92, 2002.

LITTLER, A.J.; BUCKLEY, C.D.; WORDSWORTH, P.; COLLINS, I.; MARTINSON, J. SIMMONS DL. A distinct profile of six soluble adhesion molecules (ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1, E-selectin, L-selectin, and P-selectin) in rheumatoid arthritis. **British Journal of Rheumatology**, v.36, p.164- 169, 1997.

MAEHIRA, F.; LUYO, G.A.; MIYAGI, I.; OSHIRO, M.; YAMANEB, N.; KUBA, M.; NAKAZATO, Y. Alterations of serum selenium concentrations in the acute phase of pathological conditions. **Clinica Chimica Acta**, v.316, p.137-146, 2002.

MANSOUR, R. B.; LASSOUED, S. Increased levels of autoantibodies against catalase and superoxide dismutase associated with oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erithematosus. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v.37, n. 2, p. 103-108, 2008.

MARTINS, K.A.; MONEGO, E.T.; PAULINELLI, L.L.; FREITAS-JUNIOR, R. Comparação de métodos de avaliação da gordura corporal total e sua distribuição. **Rev Bras Epidemiol**, v.14, n.4, p.677-87, 2011.

MASON, J.C.; KAPAHI, P.; HASKARD, D.O. Detection of increased levels of circulating intercellular adhesion molecule 1 in some patients with rheumatoid arthritis but not in patients with systemic lupus erythematosus. Lack of correlation with levels of circulating vascular cell adhesion molecule 1. **Arthritis Rheumatology**, v.36, p.519–527, 1993.

MAURICE, M. M.; NAKAMURA, H.; VAN DER VOORT, E. A. M.; VAN VLIET, A. I.; STAAL, F. J. T.; TAK, P. P.; BREEDVELD, F. C.; VERWEIJ, C. L. Evidence for the role of an altered redox state in hyporesponsiveness of synovial T cells in rheumatoid arthritis. **Journal of Immunology**, v. 158, p. 1458–1465, 1997.

MEPLAN, C., CROSLEY, L.K., NICOL, F., HORGAN, G.W., MATHERS, J.C., ARTHUR, J.R., HESKETH, J.E. Functional effects of a common single-nucleotide polymorphism (GPX4c718t) in the glutathione peroxidase 4 gene: interaction with sex. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, 1019–1027.

MÉPLAN, C.; PAGMANDITS, V.; HESKETH, J. E. Advances in Selenoprotein Expression: Patterns and Individual Variations. In: BRIGÉLIUS-FLOHÉ, R.; JOOST, HG. **Nutritional Genomics: Impact in Health and Disease**. Weiheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & C. KGaA, p. 132-158, 2006.

MÉPLAN, C.; PAGMANDITS, V.; HESKETH, J. E. Advances in Selenoprotein Expression: Patterns and Individual Variations. In: BRIGÉLIUS-FLOHÉ, R.; JOOST, HG. **Nutritional Genomics: Impact in Health and Disease**. Weiheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & C. KGaA, p. 132-158, 2006.

MIESEL, R.; HARTUNG, R.; KROEGER, H. Priming of NADPH oxidase by tumor necrosis factor alpha in patients with inflammatory and autoimmune rheumatic diseases. **Inflammation**, 20, 427-438, 1996a.

MIESEL, R.; KURPISZ, M.; KROGER, H. Suppression of inflammatory arthritis by simultaneous inhibition of nitric oxide synthase and NADPH oxidase. **Free Radical Biology and Medicine**, v.20, p. 75-81, 1996b.

MISSO, N. L.; POWERS, K. A.; GILLON, R. L. Reduced platelet glutathione peroxidase activity and serum selenium concentration in atopic asthmatic patients. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 26, p. 836-847, 1996.

MOCCHEGIANI, E.; COSTARELLI, L.; GIACCONI, R.; MALAVOLTA, M.; BASSO, A.; PIACENZA, F.; OSTAN, R.; CEVENINI, E.; GONOS, E.S.; MONTI, D. Micronutrient–gene interactions related to inflammatory/immune response and antioxidant activity in ageing and inflammation. A systematic review. **Mechanisms of Ageing and Development**, xxx (2014) xxx–xxx.

MONGET, A.L.; RICHARD, M.J.; COURNOT, M.P, ET AL. Effect of 6 months supplementation with different combinations of an association of antioxidant nutrients on biochemical parameters and markers of the antioxidant defence system in the elderly. The Geriatrie/Min Vit Aox Network. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.50, p.443– 449, 1996.

MONTENEGRO, R.; ROCHA, A. Manifestações extra-articulares da artrite reumatóide. **Temas de Reumatologia Clínica**, v.10, n.3, p.74-83, 2009.

MOTA, L.M.H.M., et. al. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.52, n.2, p.135-174, 2012.

MUNTHE, E.; AESETH, J.; JELLUM, E. Trace elements and rheumatoid arthritis (RA)-pathogenic and therapeutic aspects. **Acta Pharmacologica Toxicologica**, v. 59, Suppl. 1365-373, 1986.

NAVARRO-ALARCON, M.; CABRERA-VIQUE, C. Selenium in food and the human body: A review. **Science of the Total Environment**, v.400, p.115-141, 2008.

NAVAS-ACIEN, A.; BLEYS, J.; GUALAR, E. Selenium intake and cardiovascular risk: what is new? **Current opinion in Lipidology**, v.19, p. 43-49, 2008.

NETO, N.S.R.; CARVALHO, J.F. O uso de provas de atividade inflamatória em reumatologia. **Rev. Bras. Reumatol.** v.49, n. 4, p.413-430, 2009.

NÈVE, J. Human selenium supplementation as assessed by changes in blood selenium concentration and glutathione peroxidase activity. **Journal of the Trace Element Medicine Biology**, v.9, p.65-73, 1995.

NISHIMURA, L. S. **Polimorfismo Pro198Leu no gene para a enzima antioxidante dependente de selênio glutathione peroxidase 1 e risco de câncer epidermoide da cavidade oral e orofaringe.** 2010. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

NYSSONEN, K.; PORKKALA, E.; SALONEN, R.; ET AL. Increase in oxidation resistance of atherogenic serum lipoproteins following antioxidant supplementation: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 48, p.633–642, 1994.

O'DELL J.; LEMLEY-GILLESPIE, S.; PALMER, W.; WEAVER, A.; MOORE, G.; KLASSEN, L.; Serum selenium concentrations in rheumatoid arthritis. **Annals of Rheumatology Diselênioase**, v.50, p.376-8, 1991.

OLIVIERI, O.; GIRELLI, D.; TREVISAN, M.T.ET AL. Red blood cell susceptibility to lipid peroxidation, membrane lipid composition and antioxidant enzymes in patients with rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**, v.18, p.1263-1264, 1991.

ÖNAL, S.; NAZIROGLU, M.; ÇOLAK, M.; BULUT, V.; FLORES-ARCE, M.F. Effects of Different Medical Treatments on Serum Copper, Selenium and Zinc Levels in Patients with Rheumatoid Arthritis. **Biol Trace Elem Res**, V.142, P.447-455, 2011.

ORTUÑO, J. et al. Importancia nutricional del selênio. **Archives. Latino-americanos Del. Nutrición.**, Caracas, v.47, n. 1, p. 6-13, 1997.

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.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **Journal Lab. & Clinical Medicine**, v. 70, n.1, p. 159-169, 1967.

PAGMANTIDIS, V.; MEPLAN, C.; VAN SCHOTHORST, E.M.; KEIJER, J.; HESKETH, J.E. Supplementation of health 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.

PAPP, L. V.; LU, J.; HOLMGREN, A.; KHANNA, KK. From Selenium to Selenoproteins: Synthesis, Identity, and their role in human Health. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 9, n. 7, p. 775-806, 2007.

PARNHAM, M.J.; WINKELMANN, J .; LEYCK, S . Macrophage, lymphocyte and chronic inflammatory responses in selenium deficient rodents. Association with decreased glutathione peroxidase activity. **Int J Immunopharmacol**, v. 5, p.455–461, 1983.

PASTERNAK, J. J. genetic and physical mapping of the human genome. In: PASTERNAK, J. J. **An introduction to human molecular genetics**, p. 158-169, 2005.

PATTINSON, D.J.; SYMMONS, D.P.M.; YOUNG, A. Does Diet have a role in the etiology of Rheumatoid Arthritis? **Proceedings of the Nutrition Society**, v.63, p.137-143, 2004.

PEDERSEN, M.; STRIPP, C.; KLARLUND, M.; OLSEN, S.F.; TJONNELAND, A.M.;FRISCH, M. Diet and risk of rheumatoid arthritis in a prospective cohort. **The journal of rheumatology**, v.32, n.7, p.1249-1252, 2005.

PEMBERTON, P. W.; AHMAD, Y.; BODILL, H.; LOKKO, D.; DIDER, S. L.; YATES, A. P.; WALKER, M. G.; LAING, I.; BRUCE, I. N. Biomarkers of oxidant stress, insulin sensitivity and endothelial activation in rheumatoid arthritis: a cross-sectional study of their association with accelerated atherosclerosis. **Biomedical Research**, v. 2, n. 83, p. 1-7, 2009.

PEREIRA, I.A. Aterosclerose na artrite reumatoide e sua associação com auto-imunidade humoral. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2006.

PERETZ, A.; NEVE, J.; DUCHATEAU, J.; FAMAHEY, J.P. Adjuvant treatment of recent onset rheumatoid arthritis by selenium supplementation: preliminary observations. **Br J Rheumatol** 1992;31:281–2.

PERETZ, A.; SIDEROVA, V.; NEVE, J. Selenium supplementation in rheumatoid arthritis investigated in a double blind, placebo controlled trial. **Scandinavia Journal of Rheumatology**, v.30, p.208-12, 2001.

PETERSSON, I.; MAJBERGER, E.; PALM, S.; LARSEN, A.; SPENSHULT, S. Treatment of rheumatoid arthritis with selenium and Vitamin E. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, v.20, p.218, 1991.

PINCUS, T. SOKKA, T. Quantitative measures for assessing rheumatoid arthritis in clinical trials and clinical care. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, Vol. 17, N. 5, p. 753–781, 2003.

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 I.** Tese (doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

PRIOR, R.L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIACA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, B. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p.3273-3279, 2003.

PROJETO DIRETRIZES, **Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina.** Artrite Reumatóide: Diagnóstico e tratamento, p. 1-15, 2003.

RAASCHOU-NIELSEN, O.; SORENSEN, M.; HANSEN, R.D.; FREDERIKSEN, K.; TJONNELAND, A.; OVERVAD, K.; VOGEL, U. GPX1 Pro198Leu polymorphism, interactions with 2219 smoking and alcohol consumption, and risk for lung cancer. *Cancer Letters*, v. 247, 2220 293–300.

RAVN-HAREN, G.; BUGEL, S.; KRATH, B.N.; HOAC, T.; STAGSTED, J.; JORGENSEN, 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.

RAVN-HAREN, G.; OLSEN, A.; TJONNELAND, A.; DRAGSTED, L. O.; NEXO, B. A.; WALLIN, H.; OVERVAD, K.; RASCHOU-NIELSEN, O.; VOGEL, U. Associations between GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study. *Carcinogenesis*, v. 27, n. 4, p. 820-825, 2006.

RAYMAN, M. P. Selenoproteins and human health: Insights from epidemiological data. *Biochimica et Biophysica Acta*, p. 1-7, 2009.

RESZKA, E.; GROMADZINSKA, J.; JABLONSKA, E.; WASOWICS, W.; JABLONOWSKI, Z.; SOSNOWSKI, M. Level of selenoprotein transcripts in peripheral leukocytes of patients

with bladder câncer and helth individuals. **Clinical Chemistry & Laboratory medicine**, v.47, p.1125-1132, 2009.

RESZKA, E.; JABLONSKA, E.; GROMADZINSKA, J.; WASOWICS, W. Relevance of selenoprotein transcripts for selenium status in humans. **Genes & Nutrition**, v.7, p.127-137, 2012.

RODRIGUEZ, S.; GAUNT, T.R.; DAY, N.M. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for mendelian randomization studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.169, n.4, p.505-514, 2009.

ROMAN, M.; JITARU, P.; BARBANTE, C. Selenium biochemistry and its role for human health. **Metallomics**, v.6, n.25, p.25-54, 2014.

ROMERO, D.C.; BLANCO, L.F.; SÁNCHEZ, P.H.; RODRÍGUES, 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.

ROSENBERGER, A. et al. Do genetic factors protect for early onset lung cancer? A case control study before the age of 50 years. **BMC Cancer**, 2008.

RYAN-HARSHMAN, M.; ALDOORI, W. The Relevance of Selenium to Immunity, Cancer, and Infectious/Inflammatory Diseases. **Canadian Journal of Dietetic Practice and Research**, v. 66, n.2, p. 98-102, 2005.

SABÉ, A.R.; RUBIO, A.; GARCÍA-BELTRAN, L. Determination of selenium in human blood specimens by electrothermal atomic absorption. **Analytica Chimica Acta**, v.419, p.121-135, 2000.

SAED, M.S.; SMITH, C.G.; FRAMPTON, J.; CHAMBERS, I.; HARRISON, P.R.; SUNDE, R.A. Effect of selenium status on mRNA levels for glutathione peroxidase in rat liver. **Biochem Biophys Res Commun**, v.153, p.855–61, 1988.

SANMARTÍN, C.; PLANO, D.; FONT, M.; PALOP, J.A. Selenium and Clinical Trials: New Therapeutic Evidence for Multiple Diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v.11, p.4635-4650, 2011.

SARBAN, S.; KOCYIGIT, A.; YAZAR, M.; ISIKAN, U. E. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Clin. Biochem.**, v.38, p.981-986, 2005.

SCHNABEL, R.; MESSOW, C. L.; 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, n. 6, p. 1201e1 – 1201e11, 2008.

SCHOMBURG, L.; SCHWEIZER, U.; HOLTMANN, B.; FLOHE, L.; SENDTNER, M.; KOHRLE, J. Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. **The Biochemical Journal**, v. 370, 397–402, 2003.

SCHWARZ, K.; FOLTZ, C.M. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. **Journal of American Chemical Society**, v.79, p.3292-3293, 1957.

SEKEROGLU, M. R.; SAHIN, H.; DÜLGER, H.; ALGUN, E. The Effect of Dietary Treatment on Erythrocyte Lipid Peroxidation, Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase, and Serum Lipid Peroxidation in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. **Clinical Biochemistry**, v. 33, n.8, p. 669-674, 2000.

SHINKAI, T.; MÜLLER, D. J.; DE LUCA, V.; SHAIKH, S.; MATSUMOTO, C.; HWANG, R.; KING, N.; TRAKALO, J.; POTAPOVA, N.; ZAI, G.; HORI, H.; OHMORI, O.; MELTZER, H. Y.; NAKAMURA, J.; KENNEDY, J. L. Genetic association analysis of the glutathione peroxidase (GPX1) gene polymorphism (Pro198Leu) with tardive dyskinesia. **Psychiatry Research**, v. 141, p. 123-128, 2006.

SHMERLING, R.H.; DELBANCO, T.L. The rheumatoid factor, an analysis of clinical utility. **American Journal of Medicine**, v. 91, p. 528-34, 1991.

SHOMBURG, L.; SCHWEIZER, U. Hierarchical regulation of selenoprotein Expression and sex-specific effects of selenium. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1790, p.1453-1462, 2009.

SHOMBURG, L.; SCHWEIZER, U. Hierarchical regulation of selenoprotein Expression and sex-specific effects of selenium. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1790, p.1453-1462, 2009.

SILVA, A.F.; MATOS, A.N.; LIMA, A.M.S.; LIMA, E.F.; CORREA, M.I.C.C.; CARVALHO, E.M. Associação do Anticorpo Anticitrulina e Gravidade da Artrite Reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia** v. 46, n.3, p. 165-173, mai/jun, 2006.

SOLOMON, D. H.; KARLSON, E. W.; RIMM, E. B.; CANNUSCIO, C. C.; MANDL, L. A.; MANSON, J. E.; STAMPFER, M. J.; CURHAN, G. C. Cardiovascular morbidity and mortality in women diagnosed with rheumatoid arthritis. **Circulation**, v. 107, p. 1303-1307, 2003.

SPRINGER, T.A. Adhesion receptors of the immune system. **Nature** 1990;346:425-434.

STAUNTON, D.E.; MERLUZZI, V.J.; ROTHLEIN, R.; BARTON, R.; MARLIN, S.D.; SPRINGER, T.A. A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses. **Cell**, v.56, p.849-853, 1989.

STAVROPOULOS-KALINOGLU, A.; METSIOS, G.S.; KOUTEDAKIS, Y.; NEVIL, A.M.; DOUGLAS, K.M.; JAMURTAS, A.; ZANTEN, J.J.S.S.V.; LABIB, M.; KITAS, G.D. Redefining overweight and obesity in rheumatoid arthritis patients. **Annals of the Rheumatic Disease**, v. 66, p. 1316–1321, 2007.

STEGEMAN, C.A.; TERVAERT, J.W.; HUITEMA, M.G.; DE JONG, P.E.; KALLENBERG, C.G. Serum levels of soluble adhesion molecules intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin in patients with Wegener's granulomatosis: Relationship to disease activity and relevance during followup. **Arthritis Rheum**, v.37, p.1228-1235, 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.1065-1069, 2010.

STONE, J.; DOUBE, A.; DIUDSON, D.; WALLACE, J. Inadequate calcium, folic acid, vitamin E, zinc and selenium intake in rheumatoid arthritis patients: results of a dietary survey. **Semin Arthritis Rheum**, v.27, p.180-5, 1997.

SUKKAR, S.G.; ROSSI, E. Oxidative Stress and Nutritional Prevention in Autoimmune Rheumatic Diseases. **Autoimmunity Reviews**, v.3, p.199-206, 2003.

SUNDE, R. **A handbook of nutritionally essential mineral elements**. Nova York, Dekker, p. 493-557, 1997.

SUNDE, R.A.; EVENSON, J.K.; THOMPSON, K.M.; SACHDEV, S.W. Dietary selenium requirements based on glutathione peroxidase-1 activity and Mrna levels and other selenium parameters are not increased by pregnancy and lactation in rats. **Journal of Nutrition**, v.135, p.2144–50, 2005.

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, n. 3, p.S37-S47, 2008.

SUZEN, H.S.; GUCYNENER, E.; SAKALLI, O.; UCKUM, Z.; KOSE, G.; USTEL, D.; DUYDU, Y. CAT C-262T and GPx1 Pro198Leu polymorphisms in a Turkish population. **Molecular Biology Report**, v.37, p.87-92, 2010.

SWEENEY, S.E.; FIRESTEIN, G.S. Rheumatoid Arthritis: Regulation of Synovial Inflammation. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.36, p.372-378, 2004.

TAISY, S.; POLAT, F.; GUL, M.; SARI, R.A.; BAKAN, E. Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatology International**, v.21, p.200-204, 2002.

TARP, U.; HANSEN, J.C.; OVERRAD, K.; THORLING, E.B.; TARP, B.D.; GRAUDAL, H. Glutathione peroxidase activity in patients with rheumatoid arthritis and in normal subjects: effects of long term selenium supplementation. **Arthritis and Rheumatism**, v.30, n.10, p. 1162-1166, 2005.

TARP, U.; OVERVAD, K.; HANSEN, J.C.; THORLING, E.B. Low selenium level in severe rheumatoid arthritis. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v.14, p.97-101, 1985.

TARP, U.; STENGAARD-PEDERSEN, K.; HANSEN, J.C.; THORLING, E.B. Glutathione redox cycle enzymes and selenium in severe rheumatoid arthritis: lack of antioxidative response to selenium supplementation in polymorphonuclear leucocytes. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.51, p.1044-1049, 1992.

TAYSI, S.; POLAT, F.; GUL, M.; SARI, R.A.; BAKAN, E. Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidants enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatol Int**, v.21, p.200-204, 2002.

TEIXEIRA, R.C.A; JUNIOR, A.G.; DE MARTINO, M.C.; MARTINS, L.C.; LOPES, A.C.; TUFIK, S. Marcadores de Ativação Endotelial e Auto-Anticorpos na Artrite Reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 47, n.6, p. 411-417, nov/dez, 2007.

THOMSON, C. D.; CHISHOLM, A.; McLachlan, S. K.; CAMPBELL, J. M. Brazil nuts: an effective way to improve selenium status. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, p. 379-384, 2008.

THOMSON, C.D. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.58, p.391- 402, 2004.

THOMSON, C.D. Selenium: Its role in health and disease. **Asia Pac J Clin Nutr.**, v.15, n. suppl 3, p. 25-30, 2006.

TIKU, M.L.; LIESCH, J.B.; ROBERTSON, F.M. Production of hydrogen peroxide by rabbit articular chondrocytes. Enhancement by cytokines. **Journal of Immunology**, v.145, p. 690-696, 1990.

TINCANI, A.; ANDREOLI, L.; BAZZANI, C.; BOSISO, D.; SOZZANI, S. Inflammatory molecules: A target for treatment of systemic autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**, v.7, p.2-7, 2007.

TSENG, Y-M.; TSAI, S-M.; LIN, C-C.; JIN, Y-R.; YEH, W-H.; HISIAO, J-K.; CHEN, C-F.; LAN, W-H.; TSAI, L-Y. Oxidative Stress-Related Enzyme Polymorphisms Associated

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 polysaturated fatty acids in breast cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.43522-43529, 2004.

VAN DAEL, P.; DEELSTRA, H. Selenium. **International Journal of Vitamins and Nutrition Research**, v.63, n.4, p.312-316, 1993.

VIJAYAKUMAR, D.; SURESH, K.; MANOHARAN, S. Lipid peroxidation and antioxidant status in blood of rheumatoid Arthritis patients. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v.21, n.1, p.104-108, 2006.

VOETSCH, B.; JIN, R.C.; BIERL, C.; BENKE, K.S.; KENET, G.; SIMIONI, P.; OTTAVIANO, F.; DAMASCENO, B.P.; ANNICHINO-BIZACCHI, J.M.; HANDY, D.E.; LOSCALZO, J. Promoter polymorphisms in the plasma glutathione peroxidase (GPx-3) gene: a novel risk factor for arterial ischemic stroke among young adults and children. **Stroke**, v. 38, 41–49, 2007.

VONDERHEIDE, A.P.; WROBEL, K.; KANNAMKUMARATH, S.S.; B'HYMER, C.; MONTES-BAYOA, M.; DE LEOA, 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.

WALCHULEWSKI, I. H.; SUNDE, R..A. Effect of dietary methionine on utilization of tissue selenium from dietary selenomethionine for glutathione peroxidase in the rat. **The Journal of Nutrition**, v.. 118, 36-374, 1988.

WALLABERG-JONSSON, S.; CVETKOVIC, J.T.; SUNDQVIST, K-G.; LEFVERT, K.; RANTAPAA-DAHLQVIST, S. Activation of the Immune System and inflammatory Activity in Relation to Markers of Atherothrombotic Disease and Atherosclerosis in Rheumatoid Arthritis. **Journal of Rheumatology**, v. 29, p.875–882.

WANG, L.; FENG, G. Rheumatoid arthritis increases the risk of coronary heart disease via vascular endothelial injuries. **Medical Hypotheses**, v.63, p.442-445, 2004.

WEISS, S.L.; EVENSON, J.K.; THOMPSON, K.M.; SUNDE, R.A. The selenium requirement for glutathione peroxidase mRNA level is half of the selenium requirement for glutathione peroxidase activity in female rats. *Journal of Nutrition*, v.126, p.2260–7, 1996.

WEISS, S.L.; EVENSON, J.K.; THOMPSON, K.M.; SUNDE.; R.A. Dietary selenium regulation of glutathione peroxidase mRNA and other seleniumdependent parameters in male rats. *J Nutr Biochem*, v. 8, p.85–91, 1997.

WILLET, W.C. Issues in analysis and presentation of dietary data. In:_____. **Nutritional epidemiology**. 2 ed. New York: Oxford University Press, 19998. P.321-345. (monographs in epidemiology and biostatistics, v.30).
with the Immunological Biomarkers Levels in Heavy Drinkers in Taiwan. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 27, p.494–503, 2013.

WOLF, F.; FREUNDLICH, B.; STRAUS, W. L. Increase in cardiovascular and cerebrovascular disease prevalence in rheumatoid arthritis. **Journal of Rheumatology**, v. 30, p. 36-40, 2003.

WU Q, HUANG K. Effect of long-term Se deficiency on the antioxidant capacities of rat vascular tissue. **Biological Trace Element Research**, v. 98:73–84, 2004.

WU, Q.; HUANG.; K. Effect of selenium compounds on the damage induced by oxysterol on rat arterial walls. **Biological Trace Element Research**, v. 112, p. 273–282.

XIA, Y.; HILL, K.E.; BYRNE, D.W, et al. Effectiveness of selenium supplements in a low-selenium area of China. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.81, p.829-834, 2005.

YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. **Food Science and Technology**, v.42, p.1573-1580, 2009.

YANG, Y.H.; HUTCHINSON, P.; SANTOS, L.L.; MORAND, E.F. Glucocorticoid inhibition of adjuvant arthritis synovial macrophage nitric oxide production: Role of lipocortin I. **Clinical and Experimental Immunology**, v.111, p. 112-122, 1998.

YAZAR, M.; SARBAN, S.; KOCYIGIT, A.; ISIKAN, I.E. Synovial Fluid and Plasma Selenium, Copper, Zinc, and Iron Concentrations in Patients with Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis. **Biological Trace Element Research**, v.106, p.123-132, 2005.

YILDIRIM K, KARATAY S, MELIKOGLU MA, GURESER G, UGUR M, SENEL K.
Associations between acute phase reactant levels and disease activity score (DAS28) in patients with rheumatoid arthritis. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v.34, p.423-426, 2004.

YOUNG, A.; VAN DER HEIJDE, D.M. Can we predict aggressive disease? **Baillieres Clinical Rheumatology**, V.11, P.27-48, 1997.

ZACHARA, B.A.; SZEWCZYK-GOLEC, K.; TYLOCH, J.; WOLSKI, Z. et al. Blood and tissue selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in patients with prostate cancer and benign prostate hyperplasia. **Neoplasma** v.52, n.3, p.248–254, 2005.

ZAMAMIRII-DAVIS, F.; J.; 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, H.; COMBS, G.F. Jr. Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.19, p.1-7, 2008.

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.

ZHUO, P.; DIAMOND, A.M. Molecular mechanisms by which selenoproteins affect cancer risk and progression. **Biochim Biophys Acta**, v. 1790, n.11, p.1546–1554, 2009.

ANEXOS

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

9132 - 5843372/1 - Kátia Rau de Almeida Callou

Email:	katia.callou@usp.br
Data de Nascimento:	23/10/1979
Cédula de Identidade:	RG - 5714659 - PE
Local de Nascimento:	Estado de Pernambuco
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Nutricionista - Universidade Federal de Pernambuco - Pernambuco - Brasil - 2005
Mestrado:	Mestre em Ciência dos Alimentos - Área: Bromatologia - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2009

Curso:	Doutorado
Programa:	Ciência dos Alimentos
Área:	Nutrição Experimental
Data de Matrícula:	03/11/2009
Início da Contagem de Prazo:	03/11/2009
Data Limite para o Depósito:	06/03/2014
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Sílvia Maria Franciscato Cozzolino - 03/11/2009 até o presente. E.Mail: smfcozzo@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 21/10/2010
Prorrogação:	120 dias Período de 03/11/2013 a 03/03/2014
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 13/01/2012
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Ingressou no Doutorado em 03/11/2009 Prorrogação em 15/08/2013 Matrícula de Acompanhamento em 10/02/2014

Aluno matriculado nas normas vigentes a partir de 01/07/2009

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

9132 - 5843372/1 - Kátia Rau de Almeida Callou

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBA5712-5/2	Fisiologia da Nutrição I	01/03/2010	11/04/2010	90	0	0	-	N	Pré-matricula indeferida
HEP5800-1/1	Bioestatística (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	02/03/2010	11/05/2010	90	6	100	A	N	Concluída
FBA5712-5/3	Fisiologia da Nutrição I	19/04/2010	30/05/2010	90	6	100	A	N	Concluída
FBA5728-2/11	Aprimoramento Didático	20/04/2010	17/05/2010	60	0	0	-	N	Pré-matricula indeferida
EDM5791-5/5	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	18/08/2010	30/11/2010	120	8	83,3	A	N	Concluída
FBA5897-1/1	Nutrigenômica do Câncer	30/08/2010	05/09/2010	30	2	100	A	N	Concluída
BIO5787-3/2	Radicais Livres em Sistemas Biológicos (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	28/09/2010	09/11/2010	60	0	0	-	N	Pré-matricula indeferida
HNT5760-1/1	Marcadores Bioquímicos em Estudos de Nutrição e Alimentação (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	04/11/2010	09/12/2010	30	0	0	-	N	Matricula cancelada
HNT5732-8/2	Métodos para Avaliação do Consumo Alimentar de Populações (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	16/08/2011	27/09/2011	60	4	92	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	26
Estágios:			
Total:	0	20	26

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 10/02/2014

Impresso em: 06/03/14 12:59:44

**RESOLUÇÃO CoPGr 5401, DE 17 DE ABRIL DE 2007.
(D.O.E. - 18.04.2007)**

Regulamenta a disponibilização de dissertações e teses no Portal da Universidade de São Paulo.

O Pró-Reitor de Pós-Graduação da Universidade de São Paulo, de acordo com aprovação do Conselho de Pós-Graduação, em Sessão de 06.12.2006 e, da Comissão de Legislação e Recursos, em Sessão de 10.04.2007 do Conselho Universitário, baixa a seguinte

RESOLUÇÃO:

Artigo 1º - Todos os alunos da Pós-Graduação da Universidade de São Paulo, no momento do depósito da dissertação ou tese, deverão entregar, obrigatoriamente, na Secretaria de Pós-Graduação de sua Unidade, uma versão eletrônica do seu trabalho, em formato .pdf, ficando o mesmo automaticamente disponibilizado para sua inclusão na Biblioteca Digital de Dissertações e Teses da USP.

Artigo 2º - Os alunos que tiverem interesse em resguardar patentes, direitos autorais e outros direitos, relativos aos seus trabalhos, poderão solicitar à Comissão de Pós-Graduação (CPG) de sua Unidade, mediante requerimento devidamente justificado, a não disponibilização de versão integral de sua dissertação ou tese no Portal da USP.

§ 1º - Colhido o parecer de um de seus membros, a CPG analisará o pedido, deferindo-o, se o julgar conveniente.

§ 2º - Caso a CPG defira o pedido, o aluno deverá entregar a versão eletrônica completa de sua dissertação ou tese, acompanhada de uma outra, simplificada, que contenha apenas o título, o resumo, a introdução, a conclusão e a bibliografia do trabalho, versão esta que será disponibilizada na Biblioteca Digital pelo prazo de 02 (dois) anos.

§ 3º - Transcorrido o prazo supramencionado, e presentes as circunstâncias contempladas no caput deste artigo, o aluno poderá solicitar novamente a não disponibilização da versão eletrônica completa do trabalho, por novo período de 02 (dois) anos, findo o qual a sua dissertação ou tese passará a ser veiculada integralmente na Biblioteca Digital.

Artigo 3º - Os casos omissos nesta Resolução serão resolvidos pelo Conselho de Pós-Graduação.

Artigo 4º - Esta Resolução entrará em vigor na data de sua publicação, ficando revogadas as disposições em contrário.

Pró-Reitoria de Pós-Graduação da Universidade de São Paulo, aos 17 de abril de 2007.

RESOLUÇÃO CoPGr Nº 6018, DE 13 DE OUTUBRO DE 2011.
(D.O.E. - 1º.11.2011 e retificada em 24.11.2011)

Dispõe sobre a correção de Teses e Dissertações.

O Pró-Reitor de Pós-Graduação da Universidade de São Paulo, usando de suas atribuições legais e de acordo com a deliberação do Conselho de Pós-Graduação, em Sessão de 24/08/2011 e da Comissão de Legislação e Recursos do Conselho Universitário, em Sessão de 05/10/2011, e, considerando a necessidade de preservar o padrão de qualidade das Teses e Dissertações depositadas, sempre em caráter definitivo, e publicadas na USP, seguindo as “Diretrizes para apresentação de Teses e Dissertações da USP” - padrão SIBI/USP, bem como preservá-las nos acervos das Bibliotecas das Unidades que alojam os Programas de Pós-Graduação e da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD) como documentos de prova apresentados, decide baixar a seguinte

RESOLUÇÃO:

Artigo 1º - Fica permitida, a critério do orientador e do orientado, a correção da Tese ou Dissertação aprovada, de modo a valorizar a participação dos membros das comissões julgadoras, que poderão sugerir alterações que melhorem a qualidade dos documentos publicados.

Artigo 2º - O prazo máximo para a entrega da versão corrigida e definitiva será de 60 (sessenta) dias, a contar da data da defesa. A versão corrigida deverá ser encaminhada, com o aval do orientador, ao Serviço de Pós-Graduação e deste, posteriormente, à Biblioteca da Unidade sede do programa e à Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Artigo 3º - Após o prazo estabelecido no art 2º, caso a Tese ou Dissertação corrigida não seja encaminhada ao Serviço de Pós-Graduação, o documento originalmente depositado será enviado à Biblioteca da Unidade e à Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD), ficando publicamente disponível nos seus acervos públicos.

Artigo 4º - Nos casos em que forem apresentadas as versões corrigidas das Teses ou Dissertações, as Bibliotecas das Unidades e a Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD) deverão manter em seus acervos as duas versões, original e corrigida, sendo a original mantida em acervo reservado e a corrigida em acervo público.

Artigo 5º - A página de rosto da Tese ou Dissertação deverá indicar explicitamente que se trata da versão original ou corrigida. Caso seja a versão corrigida deverá, também, ser indicado que o original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa. Estas informações deverão ser inseridas seguindo as “Diretrizes para apresentação de Teses e Dissertações da USP” - padrão SIBI/USP.

Artigo 6º - Será permitida a mudança do número de páginas da Tese ou Dissertação, porém, sem a alteração do título.

Artigo 7º - Os demais interessados, que já tiveram o depósito realizado antes da vigência desta resolução, poderão também gozar dos mesmos benefícios, dentro do prazo de 180 dias a partir da data de sua publicação.

Artigo 8º - Esta Resolução entrará em vigor na data de sua publicação, ficando revogada a Resolução CoPGr 5890/2010 (Processo 2009.1.27411.1.0).

Pró-Reitoria de Pós-Graduação da Universidade de São Paulo, aos 13 de outubro de 2011.

VAHAN AGOPYAN
Pró-Reitor

RUBENS BEÇAK
Secretário Geral

PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer CEP/FCF/46/2011
Protocolo CEP/FCF/567
CAAE: 0031.0.018.174-10

I – Identificação:

Projeto de Pesquisa:	Efeito da suplementação com castanha-do-brasil (Bertholletia excelsa H.B.K.) como fonte de selênio sobre marcadores de estresse oxidativo, citocinas inflamatórias e sua relação com o polimorfismo Pro198Leu do gene da glutathione peroxidase 1 em pacientes com artrite reumatóide.
Pesquisador Responsável:	Profa. Dra. Silvia Maria Franciscato Cozzolino
Aluna de Pós-Graduação:	Kátia Rau de Almeida Callou
Instituição:	Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP e UNIFESP

II - Sumário Geral do Protocolo:

A artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória crônica, caracterizada por inflamação das articulações e se manifesta por inchaço e incapacidade funcional das mesmas, o que a torna um importante problema de saúde pública. Apesar de a etiologia da doença não estar totalmente esclarecida, é fato que envolve a produção excessiva de radicais livres como resultado do desequilíbrio do sistema de defesa antioxidante. Nesse sentido, o selênio (principal fonte é a castanha-do-brasil) é um importante fator para diminuir o estresse oxidativo, uma vez que está relacionado à atividade de enzimas antioxidantes, tais como a glutathione peroxidase. No entanto, estudos que avaliem a associação do estado nutricional relativo ao selênio em pacientes com AR com os biomarcadores do estresse oxidativo e de inflamação são escassos na literatura. Desse modo, a avaliação do efeito potencial in vivo da suplementação com castanha-do-brasil, como fonte de selênio, sobre os parâmetros descritos anteriormente e sua relação com o polimorfismo Pro198Leu no gene da glutathione peroxidase 1, em pacientes com artrite reumatóide, vêm a suprir essa lacuna.

Os objetivos do presente estudo são:

Geral: Avaliar o efeito da suplementação com castanha-do-brasil como fonte de selênio sobre os marcadores de estresse oxidativo, citocinas inflamatórias e sua relação com o polimorfismo Pro198Leu no gene da glutathione peroxidase 1 de pacientes com artrite reumatóide.

Específicos: Avaliar o efeito da suplementação com castanha-do-brasil como fonte de selênio sobre os parâmetros bioquímicos e atividade da enzima glutathione peroxidase no plasma e eritrócitos; Estudar a associação entre os marcadores de estresse oxidativo, citocinas inflamatórias e o estado nutricional relativo ao selênio; Correlacionar estes parâmetros com o polimorfismo Pro198Leu no gene da glutathione peroxidase 1 em pacientes com artrite reumatóide.

Tipo de estudo: Caso-controle.

Casuística: Este projeto envolve a realização de duas etapas de estudo. Para ambas as etapas do estudo, serão recrutados pacientes com artrite reumatóide, de ambos os sexos, diagnosticados segundo os critérios de classificação do colégio americano de reumatologia.

A primeira etapa do estudo será do tipo caso-controle. Serão constituídos 2 grupos de indivíduos, com idades entre 20 e 59 anos e de ambos os sexos. O grupo 1 (n= 30) será constituído por pacientes com artrite reumatóide que fazem acompanhamento médico no ambulatório de Reumatologia da UNIFESP. O grupo 2 (n=30) será representado por indivíduos saudáveis de ambos os sexos, com idade pareadas ao grupo caso e na faixa

etária de 20 a 59 anos de idade. Esta etapa do estudo incluirá a realização de duas coletas de sangue, uma no início do estudo (tempo t0) e a outra após três meses (tempo t1). Também serão realizadas aferições de peso, estatura, circunferência da cintura e análise da composição corporal por bioimpedância para a avaliação antropométrica. Além disso, serão coletadas informações sobre o consumo alimentar, através de registro alimentar de 3 dias, sendo 1 dia de final de semana.

A segunda etapa consistirá em um estudo do tipo cross-over, sendo utilizados alguns dos indivíduos anteriormente selecionados na primeira etapa deste estudo, e recrutados mais pacientes, totalizando 70 indivíduos. Serão selecionados pacientes com artrite reumatóide de ambos os sexos, com idades entre 20 e 59 anos, voluntários, que fazem acompanhamento clínico no setor de reumatologia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP e diagnosticados segundo os critérios estabelecidos pelo Colégio Americano de Reumatologia e citado anteriormente neste trabalho.

Será aplicado um questionário, a fim de se obter informações sócio-econômicas, antecedentes familiares para doenças crônicas não-transmissíveis, e também quanto ao uso de medicamentos e a presença de doenças. Então, será feita a seleção dos participantes utilizando os seguintes critérios de inclusão: a presença de artrite reumatóide na faixa etária acima citada. Serão adotados cuidados especiais para evitar que indivíduos subordinados ou diretamente ligados ao pesquisador se sintam obrigados a participarem do estudo. Já os fatores de exclusão serão: presença de doenças que interfiram no estado nutricional relativo ao selênio (câncer, insuficiência renal crônica, disfunções da tireóide, pacientes com doença arterial coronariana); utilização de suplementos vitamínico-mineral e de medicamentos que interfiram no perfil bioquímico do selênio.

III – Situação do Protocolo: APROVADO em reunião de 29/03/2011.

O pesquisador deverá:

- 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 relatório parcial em abril/2013 e relatório final em abril/2015.

São Paulo, 04 de abril de 2011.

Prof. Dra. Mariza Landgraf
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/FCF/USP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Etapa I do projeto

1. Informações do Sujeito da Pesquisa

Nome:			
Documento de Identidade nº:		Sexo: ( ) M ( ) F	
Data de Nascimento: / /			
Endereço:		Nº	Complemento:
Bairro:	Cidade:		Estado:
CEP:	Telefones:		

2. Informações do Responsável Legal

Nome:			
Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.)			
Documento de Identidade nº:		Sexo: ( ) M ( ) F	
Data de Nascimento: / /			
Endereço:		Nº	Complemento:
Bairro:	Cidade:		Estado:
CEP:	Telefones:		

3. Título do Projeto de Pesquisa:

“Efeito da suplementação com castanha-do-brasil (*Bertholetia excelsa* H.B.K) como fonte de Selênio sobre os marcadores de estresse oxidativo, citocinas inflamatórias e sua relação com o polimorfismo Pro198Leu no gene da glutathione peroxidase 1 em pacientes com artrite reumatóide”

“Estado Nutricional relativo ao Zinco de pacientes com Artrite Reumatóide e sua relação com o Estresse Oxidativo e o Polimorfismo Arg213Gly presente no gene da SOD3”

4. Duração da Pesquisa: 3 meses

5. Nome do pesquisador responsável: Sílvia Maria Franciscato Cozzolino

Cargo/ Função: Professor titular   Nº do Registro do Conselho Regional: CRN 0621

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo (FCF-USP)

Convidamos /o(a) Sr.(a) a participar das pesquisas, cujos títulos são **“Efeito da suplementação com castanha-do-brasil (*Bertholetia excelsa* H.B.K) como fonte de Selênio sobre os marcadores de estresse oxidativo, citocinas inflamatórias e sua relação com o polimorfismo Pro198Leu no gene da glutathione peroxidase 1 em pacientes com artrite reumatóide”** e **“Estado Nutricional relativo ao Zinco de pacientes com Artrite Reumatóide e sua relação com o Estresse Oxidativo e o Polimorfismo Arg213Gly presente no gene da SOD3”**. Este estudo será conduzido pela Profa. e pesquisadora responsável, Sílvia Maria Franciscato Cozzolino. Participarão como colaboradores deste projeto a aluna de doutorado da FCF-USP, Kátia Rau de Almeida Callou; a aluna de mestrado da FCF-USP, Graziela Biude Silva; o professor adjunto da Disciplina de Reumatologia da Universidade Federal de São Paulo e coordenador do setor de artrite reumatóide do Hospital São Paulo, Daniel Feldman Pollak e José Alexandre Pimentel, técnico da FCF-USP e responsável pela coleta de sangue. A sua participação terá duração estimada de três meses e esta pesquisa é considerada de risco mínimo.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

A artrite reumatóide é uma doença que causa bastante dor nas articulações do corpo (como às das mãos, pé, ombros, etc) e pode ainda levar a complicações nos ossos, dificultando a realização de atividades domésticas. Você deve seguir as orientações médicas e/ou de nutricionista para o controle de medicamentos e da alimentação. Entre os nutrientes mais importantes para o nosso organismo estão o selênio e o zinco. Estes minerais podem diminuir a inflamação, e são encontrados em alimentos como castanhas, nozes, carnes bovinas e carnes de aves.

Através dessa pesquisa será possível verificar as quantidades desses minerais no sangue dos participantes e se a alimentação está adequada. Ao final da pesquisa, os resultados serão entregues e os participantes serão orientados quanto à alimentação. Esta é a Etapa I do projeto, que será constituída de dois grupos: 1. Grupo caso (pacientes com artrite reumatóide diagnosticados segundo os critérios do colégio americano de reumatologia), 2. Grupo controle (constituído por indivíduos saudáveis). Cada grupo será constituído de 30 indivíduos.

Você será submetido a exames clínicos e laboratoriais, com coleta de sangue. No dia da coleta de sangue, você deverá vir em jejum de 12h. Serão realizadas duas coletas de sangue, sendo cada uma de 20 mL. A primeira coleta será feita no momento inicial do estudo e a segunda após três meses, a fim de verificar se alterações na dosagem ou no tipo do remédio utilizado irão interferir nos exames que faremos. No sangue, nós iremos avaliar a quantidade de selênio e zinco, e se há um desequilíbrio entre as substâncias boas e prejudiciais ao corpo (quantidade de selênio e zinco, quantidade de malondialdeído e atividade das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase, superóxido dismutase e superóxido dismutase 3). Além disso, iremos avaliar nesta primeira etapa se esses resultados são influenciados pela sua característica individual (DNA – análise do polimorfismo Arg213Gly no gene da superóxido dismutase 3). Seu sangue não será armazenado para a realização de estudos futuros.

Um dia antes da primeira coleta de sangue, você deverá coletar e armazenar toda a urina de um dia inteiro em um frasco que será fornecido pelo pesquisador. Esse frasco deverá ser guardado na geladeira e entregue no mesmo dia da coleta de sangue. A urina será utilizada para avaliar a quantidade de zinco.

No mesmo dia da coleta de sangue, você deverá trazer preenchido o registro alimentar. Neste registro, você precisará anotar tudo o que comeu durante três dias não consecutivos de uma semana, sendo um dia de final de semana. Também serão feitas medidas de peso, altura e outra medida para avaliação da quantidade de gordura do seu corpo (bioimpedância elétrica).

O material utilizado para a coleta de sangue será descartável e a coleta será feita no setor de reumatologia da Universidade Federal de São Paulo, por um técnico especializado. Durante a coleta de sangue, você poderá sentir tonturas por estar em jejum e leve dor devido à picada da agulha. Poderá também surgir uma mancha um pouco arroxada no local da picada. Você receberá um lanche, após a coleta, para diminuir esses desconfortos.

Em qualquer etapa do estudo, você poderá falar com os responsáveis pela pesquisa para ter informações sobre a mesma. Sua participação no estudo não acarretará custos ao participante e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional, porém em caso de haver gastos com transporte e/ou alimentação, e você não puder pagar, poderá ser oferecida a quantia referente a estes gastos, com recursos próprios do pesquisador. Os resultados desta pesquisa serão divulgados apenas em revistas e congressos científicos, e o seu nome será mantido em segredo. Você poderá desistir do estudo a qualquer momento, sem nenhum constrangimento, e sem nenhum prejuízo à continuidade do seu tratamento.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Em caso de dúvidas, entrar em contato com:

Kátia Rau de Almeida Callou - (11) 8303-8881 / (11) 3091-3625

Email: katia.callou@usp.br

Graziela Biude Silva – (11) 8288-1473 / (11) 3091-3625

E-mail: gbiude@usp.br

End: Av. Prof. Lineu Prestes, 580 – Bloco 14 05508-900 São Paulo SP

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/responsável

_____
Assinatura do pesquisador responsável
Prof. Sílvia Maria F. Cozzolino

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Etapa II do projeto

1. Informações do Sujeito da Pesquisa

Nome:			
Documento de Identidade nº:		Sexo: ( ) M ( ) F	
Data de Nascimento: / /			
Endereço:		Nº	Complemento:
Bairro:	Cidade:		Estado:
CEP:	Telefones:		

2. Informações do Responsável Legal

Nome:			
Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.)			
Documento de Identidade nº:		Sexo: ( ) M ( ) F	
Data de Nascimento: / /			
Endereço:		Nº	Complemento:
Bairro:	Cidade:		Estado:
CEP:	Telefones:		

3. Título do Projeto de Pesquisa: “Efeito da suplementação com castanha-do-brasil (<i>Bertholetia excelsa</i> H.B.K) como fonte de Selênio sobre os marcadores de estresse oxidativo, citocinas inflamatórias e sua relação com o polimorfismo Pro198Leu no gene da glutathione peroxidase 1 em pacientes com artrite reumatóide”	
4. Duração da Pesquisa: 7 meses	
5. Nome do pesquisador responsável: Sílvia Maria Franciscato Cozzolino	
Cargo/ Função: Professor titular	Nº do Registro do Conselho Regional: CRN3 0621
Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP)	

Convidamos o(a) Sr.(a) a participar de uma pesquisa, cujo título é **“Efeito da suplementação com castanha-do-brasil (*Bertholetia excelsa* H.B.K) como fonte de Selênio sobre os marcadores de estresse oxidativo, citocinas inflamatórias e sua relação com o polimorfismo Pro198Leu no gene da glutathione peroxidase 1 em pacientes com artrite reumatóide”**. Este estudo será conduzido pela profa. e pesquisadora responsável da FCF-USP, Sílvia Maria Franciscato Cozzolino. Participarão como colaboradores deste projeto a aluna de doutorado em Ciência dos Alimentos e Nutrição Experimental da FCF-USP, Kátia Rau de Almeida Callou; o professor da Disciplina de Reumatologia da Universidade Federal de São Paulo e coordenador do setor de artrite reumatóide do Hospital São Paulo, Daniel Feldman Pollak e José Alexandre Pimentel, técnico da FCF-USP e responsável pela coleta de sangue. A participação do paciente terá duração estimada de sete meses e esta pesquisa é considerada risco mínimo.

A artrite reumatóide (AR) é uma doença que causa bastante dor nas articulações do corpo (como às das mãos, pé, ombros, etc) e pode ainda levar a complicações nos ossos, dificultando a realização de atividades domésticas. Você deve seguir as orientações médicas e/ou de nutricionista para o controle de medicamentos e da alimentação. Um dos

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

nutrientes mais importantes para o nosso organismo é o selênio. Este mineral pode diminuir a inflamação, e é encontrado em alimentos como castanhas, nozes, carnes bovinas e carnes de aves.

Através dessa pesquisa será possível verificar as quantidades desse mineral no sangue dos participantes e se a alimentação está adequada.

Ao final da pesquisa, os resultados serão entregues e os participantes serão orientados quanto à alimentação. Esta é a etapa II do estudo e será constituída de dois grupos com artrite reumatóide: 1. Indivíduos com AR que receberão a suplementação com castanha-do-brasil no momento inicial do estudo; 2. Indivíduos com AR que receberão a suplementação com castanha-do-brasil em uma etapa posterior do estudo. Cada grupo será constituído de 35 indivíduos.

Você será submetido a exames clínicos e laboratoriais, com coleta de sangue e de urina. No dia da coleta de sangue, você deverá vir em jejum de 12h. Serão realizadas quatro coletas de sangue, sendo cada uma de 15 mL. A primeira coleta será feita no momento inicial do estudo e a segunda, terceira e quarta coleta com intervalos de dois a três meses. Você ainda deverá ingerir diariamente, durante dois meses, 1 unidade de castanha-do-brasil 1 dia depois da primeira coleta de sangue (grupo I) ou 1 dia após a segunda coleta de sangue (grupo II). Você será orientado pela pesquisadora responsável. No sangue, nós iremos avaliar a quantidade de selênio e se há um desequilíbrio entre as substâncias boas e prejudiciais ao corpo (teor de selênio, teor de malondialdeído, atividade da enzima antioxidante glutathione peroxidase e superóxido dismutase, vitamina E, ORAC e DPPH, teor de 8-oxoDG, dosagem do autoanticorpo anti-LDL eletronegativo, quantidade de interleucinas). Seu sangue não será armazenado para a realização de estudos futuros. Todos estes testes bioquímicos serão avaliados após cada coleta de sangue.

Para este estudo, serão avaliados 70 indivíduos com artrite reumatóide. Os indivíduos do estudo serão suplementados com uma noz de castanha-do-brasil durante 8 semanas para verificar se o selênio presente nesse alimento foi capaz de diminuir a inflamação em todos os pacientes e se essa diminuição depende do DNA do indivíduo, principalmente da atividade de algumas enzimas.

Durante a pesquisa, serão realizadas quatro coletas de sangue (15 mL), com material descartável, antes do café da manhã (jejum de 12 hs), no ambulatório de reumatologia da Universidade Federal de São Paulo. Durante a coleta de sangue, o participante poderá sentir tonturas por estar em jejum para fazer o exame e leve dor devido à picada da agulha. Poderá também surgir uma mancha um pouco arroxada no local da picada. Porém, o exame será feito por uma pessoa experiente e, depois da coleta, o participante receberá um lanche, o que minimizará ainda mais estes desconfortos. O sangue coletado será utilizado para a realização de testes bioquímicos, tais como: análise do teor de selênio, atividade da enzima antioxidante glutathione peroxidase, teor de malondialdeído, teor de 8-oxo-DG, dosagem do autoanticorpo anti-LDL eletronegativo, quantificação de interleucinas e determinação do polimorfismo Pro198Leu no gene da glutathione peroxidase 1.

Além disso, um dia antes da coleta de sangue, os indivíduos irão coletar e armazenar toda a urina de um dia inteiro, em um frasco que será fornecido pelo pesquisador. Este frasco deverá ser mantido em geladeira após a coleta da urina e entregue no mesmo dia da coleta de sangue. A urina será utilizada para a determinação do teor de

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

selênio e de isoprostano. As amostras de sangue e de urina não serão armazenadas para a realização de pesquisas futuras.

O participante precisará ainda responder algumas perguntas sobre sua alimentação habitual, no mesmo dia da seleção para a pesquisa, e, anotar tudo o que comeu durante três dias aleatórios de uma semana, sendo um dia de final de semana, em um formulário que será fornecido para levar para casa. Este deverá ser entregue no mesmo dia da entrega da urina. Também serão feitas medidas de peso, altura e outras medidas de avaliação da distribuição da gordura do seu corpo, sendo esta última chamada de bioimpedância elétrica.

Em qualquer etapa do estudo, o participante e/ou seu responsável terão acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para ter informações sobre a mesma. A participação no estudo não acarretará custos ao participante e não haverá nenhuma compensação financeira adicional, porém em caso de haver gastos com transporte e/ou alimentação, e o participante não puder pagar, poderá ser oferecida a quantia referente a estes gastos, com recursos próprios do pesquisador. Os resultados desta pesquisa serão divulgados apenas em revistas e congressos científicos, e o nome e identidade do participante serão mantidos em segredo. O participante poderá desistir do estudo a qualquer momento, sem nenhum constrangimento, e sem nenhum prejuízo a continuidade do seu tratamento.

Em caso de dúvidas, entrar em contato com:

Kátia Rau de Almeida Callou (11) 8303-8881/(11) 3091-3625

End: Av. Prof. Lineu Prestes, 580 – Bloco 14 05508-900 São Paulo SP

Email: katia.callou@usp.br

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/responsável

_____
Assinatura do pesquisador responsável
Sílvia Maria F. Cozzolino

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 - 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:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

FICHA CLÍNICA

Nº: _____

Nome: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Data de Nascimento: ____/____/____ Data da Avaliação: ____/____/____

Idade: _____ Sexo: ( ) F ( ) M

Renda Familiar: ( ) < 1sm ( ) 1 - 2 sm ( ) 2 - 3 sm ( ) 3 - 5 sm ( ) > 5sm

Escolaridade do entrevistado: _____

Escolaridade da mãe: _____

DADOS CLÍNICOS

Número de articulações Inflamadas : _____

Fator reumatóide: _____

Data diagnóstico AR: ____/____/____ Idade (anos): _____

Hb/Ht = _____ Leucócitos = _____ Neutrófilos = _____

Linfócitos = _____ Granulócitos = _____ Monócitos = _____

Plaquetas = _____ PCR = _____ AST = _____ ALT = _____

Creatinina = _____

Presença doenças: N ( ) S ( )

( ) Obesidade ( ) Hipertensão arterial ( ) Diabetes mellitus

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

( ) Doença cardiovascular ( ) Dislipidemia ( ) Outras: _____

Antecedentes familiares:

Origem da família: _____

Obesidade: N ( ) S ( )

Hipertensão arterial: N ( ) S ( )

Diabetes mellitus: N ( ) S ( )

Doença cardiovascular: N ( ) S ( )

Dislipidemia: N ( ) S ( )

Câncer: N ( ) S ( )

Artrite reumatóide : N ( ) S ( )

Fibromialgia : N ( ) S ( )

Se sim, qual o tipo: _____

Medicações:

Suplemento vitamínico/mineral: N ( ) S ( )

Se sim, qual: _____

Prática de exercício físico:

N ( ) S ( ). Se sim, qual: _____