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

Estudo dos polimorfismos Pro198Leu no gene da glutathione peroxidase 1 e -617C/A no gene do fator de transcrição Nrf2 com relação ao estresse oxidativo e ao estado nutricional relativo ao selênio de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1

Luciane Luca de Alencar

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Tit. Silvia M. F. Cozzolino

São Paulo
2014

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

Estudo dos polimorfismos Pro198Leu no gene da glutathione peroxidase 1 e -617C/A no gene do fator de transcrição Nrf2 com relação ao estresse oxidativo e ao estado nutricional relativo ao selênio de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1

Luciane Luca de Alencar

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Tit. Silvia M. F. Cozzolino

São Paulo
2014

Ficha Catalográfica

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

A368e	<p>Alencar, Luciane Luca de</p> <p>Estudo dos polimorfismos Pro198Leu no gene da glutathione peroxidase 1 e -617C/A no gene do fator de transcrição Nrf2 com relação ao estresse oxidativo e ao estado nutricional relativo ao selênio de pacientes com diabetes <i>mellitus</i> tipo1 / Luciane Luca de Alencar. -- São Paulo, 2014.</p> <p>126p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.</p> <p>Orientador: Cozzolino, Silvia Maria Franciscato</p> <p>1. Selênio : Avaliação nutricional : Ciência dos alimentos 2. Expressão gênica 3. Nutrigenômica I. T. II. Cozzolino, Silvia Maria Franciscato, orientador.</p> <p>641.17 CDD</p>
-------	--

Estudo dos polimorfismos Pro198Leu no gene da glutathione peroxidase 1 e -617C/A no gene do fator de transcrição Nrf2 com relação ao estresse oxidativo e ao estado nutricional relativo ao selênio de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1

COMISSÃO EXAMINADORA

Examinador I - Presidente

Examinador II

Examinador III

Data da defesa:

DEDICATÓRIA

À Deus, que por seu infinito amor me permite realizar sonhos e a alcançar voos que não ousei imaginar. Sou grata por este amor, que perscruta o meu coração e que vai além de tudo e que me surpreende a cada dia.

“Coisas que os olhos não viram, nem os ouvidos ouviram, nem o coração humano imaginou” - 1Cor 2,9.

Ao meu maior tesouro: Leticia, Rafaela e Henrique, não haverá no mundo alegria que se compare a estar com vocês a cada dia. Por vocês eu levantei nos dias tristes e superei os momentos mais difíceis. Obrigada por darem sentido a minha vida. Obrigada por entenderem a falta de tempo e toda a correria, inclusive nos finais de semana. Vocês dão cor e alegria a minha vida, dão sentido a tudo e fazem tudo valer a pena. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À professora *Silvia Maria Franciscato Cozzolino*, por sua acolhida, orientação e por permitir a realização deste sonho. Muito obrigada por proporcionar meu crescimento profissional e pessoal, e permitir ainda a alegria de conhecer pessoas tão especiais, que tornaram minha vida melhor. A você professora querida, minha eterna gratidão, respeito e carinho.

Aos professores *Thomas Prates Ong, Cristiane Cominetti e Ana Mara de Oliveira e Silva*, pelas contribuições e sugestões no exame de qualificação.

À minha *mãe e irmã*. Agradeço a presença e o apoio singelo e constante.

Ao *Fernando*, muito obrigada por sua amizade, companhia, por todo apoio, pelas conversas e por ser sempre presente. Quanta alegria sua vida fazer parte da minha! Amo você!

Agradeço infinitamente à minha linda amiga *Liliane Pires*! Obrigada por sua amizade, por seu carinho, por toda atenção e cuidado que você tem por mim. Quero que saiba que te respeito, admiro e me alegro por sua vida e por cada uma de suas conquistas! A alegria de ter sua amizade é imensurável. Muito obrigada, minha amiga para sempre. Amo você!

À *Leila Hashimoto*, muito obrigada por sua amizade, por cada ajuda, por cada minuto empenhado neste trabalho! Obrigada pela presença, sorriso e abraço que fizeram a diferença a cada dia. Amigas para sempre!

À *Verônica Bandeira*, muito obrigada, pela ajuda, pelo apoio, pelas conversas, por cada palavra de sabedoria e animação. Pela presença sempre alegre e prestativa que mudam meu dia! Amigas para sempre!

Pessoas que tenho a felicidade de conviver e amar! Nada é por acaso, sou infinitamente grata por minha vida ter encontrado a de vocês: *Lili, Ve e Leilinha*, vocês são preciosas para mim! Amo muito vocês!! Amigas sempre!

Às amigas do laboratório: *Ariana, Bruna, Graziela, Janaína, Kaluce, Larissa, Margarete e Vanessa*. Obrigada por cada colaboração e apoio, pela alegria, risadas e conversas animadas. Aos que passaram pelo laboratório e agora já estão alçando novos voos: *Bárbara, Isabela, Kátia*.

Ao *Alexandre*, obrigada pelo auxílio e apoio de sempre.

À *Luciana Nishimura*, por todo apoio e socorro oportuno! Muito obrigada pelo sorriso, abraço e carinho acolhedor de sempre!

Às amigas *Neide* e *Juliana*, por todo apoio e carinho, apesar da distância.

Aos queridos *Marcelo, Luciane, Maia, Leda, Edileuza, Edna, Glaene, Gilson, Paulino e Carol* pelo carinho, apoio e alegria de sempre.

Aos *participantes* deste estudo e seus responsáveis, pelo comprometimento e contribuição com a pesquisa.

SÚMARIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Diabetes <i>mellitus</i>	20
2.2 Diabetes <i>mellitus</i> e estresse oxidativo	25
2.3 Selênio e sistema de defesa antioxidante	29
2.4 SNPs Pro198Leu no gene da GPx1 (rs1050450) e -617C/A no gene do fator de transcrição Nrf2 (rs6721961)	41
3. OBJETIVOS	49
4. MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1 Protocolo Experimental	51
4.2 Avaliação Antropométrica	51
4.2.1 Peso	51
4.2.2 Estatura	51
4.2.3 Índice de massa corpórea	53
4.2.4 Circunferência da cintura	53
4.2.5 Impedância bioelétrica	53
4.3 Avaliação da ingestão alimentar	54
4.4 Controle de contaminação	55
4.5 Coleta dos materiais biológicos	55
4.5.1 Sangue	55
4.5.2 Urina de 24 horas	55
4.6 Parâmetros bioquímicos de avaliação do selênio	56
4.6.1 Determinação de selênio no plasma, nos eritrócitos e na urina	56
4.6.2 Determinações dos parâmetros glicêmicos	56
4.6.3 Determinação da atividade enzimática	56
4.6.3.1 <i>Glutathione peroxidase</i>	56
4.6.3.2 <i>Superóxido dismutase</i>	57
4.6.4 Determinação da concentração de malondialdeído (MDA)	57
4.6.5 Concentração de isoprostanos (8-iso PGF ₂ α)	58

4.7 Determinação do polimorfismo Pro198Leu no gene da GPx1 (rs1050450) e -617A/C na região promotora do gene do fator de transcrição Nrf2 rs6721961)	58
4.8 Avaliação da expressão gênica da GPx 1	58
4.9 Avaliação estatística	60
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1 Caracterização social, clínica e de composição corporal dos participantes	61
5.2 Avaliação da ingestão alimentar	63
5.3 Avaliação do estado nutricional relativo ao selênio	67
5.4 Parâmetros bioquímicos glicêmicos e perfil lipídico	72
5.5 Atividade das enzimas antioxidantes GPx e SOD	73
5.6 Determinação dos genótipos Pro198Leu C/T (1050450) no gene da GPx1 e -617C/A (rs6721961) no gene do fator de transcrição Nrf2.	77
5.7 Expressão gênica da GPx1	89
6. CONCLUSÕES	91
7. REFERÊNCIAS	92
ANEXOS	113

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema representativo do mecanismo de liberação de insulina.	23
Figura 2. Causa e efeito do estresse na DM1.	29
Figura 3. Moléculas cisteína e selenocisteína.	32
Figura 4. Esquema representativo do processo de incorporação da selenocisteína.	34
Figura 5. Esquema representativo das reações e ação das enzimas SOD, GPx e CAT.	36
Figura 6. Domínios funcionais do Nrf2	38
Figura 7. Esquema representativo do mecanismo de ação do fator de transcrição Nrf ₂ no diabetes <i>mellitus</i>	40
Figura 8. Distribuição dos participantes segundo ascendência genômica.	42
Figura 9. Fluxograma das atividades desenvolvidas.	52
Figura 10. Distribuição percentual de participantes segundo classificação de IMC proposta pela OMS 2007. São Paulo, 2014.	62
Figura 11. Distribuição percentual dos participantes de acordo com a adequação energética das dietas consumidas, segundo IOM (2000). São Paulo, 2014.	64
Figura 12. Média do valor energético total (VET) e da EER segundo IOM (2003). São Paulo, 2014.	64
Figura 13. Distribuição percentual de participantes dos grupos DM1 e GC, segundo a contribuição energética de macronutrientes, conforme proposto pelo <i>Institute of Medicine</i> (IOM, 2001). São Paulo, 2014.	65
Figura 14. Correlação entre a ingestão de carboidratos, lipídeos e proteína do grupo DM1. São Paulo, 2014.	66
Figura 15. Distribuição dos participantes dos grupos DM1 e GC, conforme a EAR para selênio segundo a idade. São Paulo, 2014.	67
Figura 16. Distribuição dos participantes dos grupos DM1 e GC segundo a concentração de selênio no plasma. São Paulo, 2014.	69
Figura 17. Distribuição dos participantes dos grupos DM1 e GC, de acordo com a concentração de selênio nos eritrócitos. São Paulo, 2014	71
Figura 18. Correlação entre a concentração de selênio nos eritrócitos e a atividade da GPx nos eritrócitos e sangue total, nos grupos DM1 e GC. São Paulo, 2014	75
Figura 19. Correlação entre a concentração de selênio no plasma e a atividade da GPx nos eritrócitos e sangue total, nos grupos DM1 e GC. São Paulo, 2014.	75
Figura 20. Correlação entre os parâmetros glicêmicos avaliados e a concentração de MDA, nos grupos DM1 e GC. São Paulo, 2014.	76

Figura 21	Correlação entre a concentração de selênio eritrocitário e a atividade da GPx no sangue total e nos eritrócitos, de acordo com os genótipos para o SNP Pro198Leu (rs1050450) no gene que codifica para a GPx 1, no grupo DM1. São Paulo, 2014.	83
Figura 22	Correlação entre a concentração de selênio plasmático e a atividade da GPx no sangue total e nos eritrócitos, de acordo com os genótipos para o SNP Pro198Leu (rs1050450) no gene que codifica para a GPx 1, do grupo DM1. São Paulo, 2014.	83
Figura 23	Correlação entre a concentração de selênio eritrocitário e a atividade da GPx no sangue total e nos eritrócitos, de acordo com os genótipos para o SNP Pro198Leu (rs1050450) no gene que codifica para a GPx 1, do grupo controle. São Paulo, 2014.	84
Figura 24	Correlação entre a concentração de selênio plasmático e a atividade da GPx no sangue total e nos eritrócitos, de acordo com os genótipos para o SNP Pro198Leu (rs1050450) no gene que codifica para a GPx 1, do grupo controle. São Paulo, 2014.	84
Figura 25	Concentração de glicose segundo os genótipos CC e CA/AA, nos grupos DM1 e GC.	86
Figura 26	Correlação entre a concentração de selênio nos eritrócitos e a atividade da GPx nos eritrócitos e sangue total, segundo o genótipo CC do SNP -617C/A na região promotora do gene do fator de transcrição Nrf2, nos grupos DM1 e GC. São Paulo, 2014.	87
Figura 27	Correlação entre a concentração de selênio nos eritrócitos e a atividade da GPx nos eritrócitos e sangue total, segundo os genótipos CA/AA do SNP -617C/A na região promotora do gene do fator de transcrição Nrf2, nos grupos DM1 e GC.	87
Figura 28	Correlação entre a concentração de selênio no plasma e a atividade da GPx nos eritrócitos e sangue total, segundo o genótipo CC do SNP -617C/A na região promotora do gene do fator de transcrição Nrf2, nos grupos DM1 e GC. São Paulo, 2014.	88
Figura 29	Correlação entre a concentração de selênio no plasma e a atividade da GPx nos eritrócitos e sangue total segundo os genótipos CA/AA do SNP -617C/A na região promotora do gene do fator de transcrição Nrf2, nos grupos DM1 e GC. São Paulo, 2014	88
Figura 30	Expressão gênica da GPx1 nos grupos DM1 e grupo controle. São Paulo, 2014.	89
Figura 31	Expressão gênica da GPx1 dos grupos diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 e grupo controle, segundo os genótipos dos SNPs C/T no gene da GPx1 e -617 C/A no gene do fator de transcrição Nrf2. São Paulo, 2014.	90

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1.	Identificação dos genes para reação de q-RT PCR disponibilizados pela Applied Biosystems.	59
Tabela 2.	Características clínicas e de composição corporal dos participantes dos grupos DM1 e GC. São Paulo, 2014.	61
Tabela 3.	Valores de ingestão de energia, macronutrientes e selênio pelos participantes dos grupos DM1 e GC. São Paulo, 2014.	63
Tabela 4.	Parâmetros bioquímicos de avaliação do <i>status</i> de selênio dos participantes dos grupos DM1 e GC. São Paulo, 2014.	68
Tabela 5	Parâmetros glicêmicos e perfil lipídico dos participantes dos grupos DM1 e GC. São Paulo, 2014.	72
Tabela 6.	Marcadores bioquímicos do estresse oxidativo dos grupos DM1 e GC. São Paulo, 2014.	74
Tabela 7.	Distribuição dos participantes dos grupos DM1 e GC, segundo os genótipos Pro198Leu C/T (1050450) no gene da GPx1 e -617C/A (rs6721961) no gene do fator de transcrição Nrf2. São Paulo, 2014	77
Tabela 8.	Concentrações de selênio plasmático e eritrocitário, segundo o genótipo para o polimorfismo Pro198Leu (rs1050450) no gene que codifica para a GPx 1. São Paulo, 2014.	80
Tabela 9.	Marcadores bioquímicos do estresse oxidativo dos participantes dos grupos DM1 e GC, segundo SNP Pro198Leu da GPx 1. São Paulo, 2014.	82
Tabela 10.	Concentrações de selênio plasmático, eritrocitário e atividade eritrocitária total da GPx, segundo o genótipo para o polimorfismo -617 C/A (rs6721961) no gene do fator de transcrição Nrf2. São Paulo, 2014.	86

LISTA DE QUADRO

	Página
Quadro 1. Recomendações de ingestão de selênio em $\mu\text{g}/\text{dia}$, de acordo com idade, proposto pelo IOM/FNB, 2000.	35
Quadro 2. Estudos de frequência do SNP Pro198Leu (rs1050450) no gene da enzima GPx1.	46
Quadro 3. Estudos de frequência do SNP -617C/A (rs6721961) na região promotora do gene do fator de transcrição Nrf2.	48

LISTA DE ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlet
8-iso PGF2 α	8-iso-prostaglandina F2 alfa
ADA	Associação americana de diabetes
ADP	Adenosina difosfato
AGEs	<i>Advanced glycation endproducts</i> (produtos de glicação avançada)
ANOVA	Análise de variância
ARE	Elemento de resposta antioxidante
ATP	Adenosina trifosfato
Ca ²⁺	Cálcio
CAT	Catalase
CH ₃ Sec	Metilselenocisteína
CH ₃ SeH	Metilselenol
CHD ₆	<i>Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 6</i>
CnC-bZIP	<i>Cap'n'Collar - basic region leucine zipper</i>
CPH	Exoprotease carboxipeptidase H
CT	Colesterol total
DCNC	Doença crônica não comunicável
DM	Diabetes mellitus
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DRIs	<i>Dietary reference intake</i> (Recomendação da ingestão de nutrientes)
EAR	<i>Estimated average requirement</i> (Necessidade média estimada)
EER	<i>Estimated energy requirement</i> (Necessidade energética estimada)
EFSec:	Fator de elongação específico da selenocisteína
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
Erk	Quinase regulada por sinal extracelular
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FNB	<i>Food and Nutrition Board</i>
GAD 65	Antidescarboxilase do ácido glutâmico
GAPDH	Gliceraldeído fosfato desidrogenase
GC	Grupo controle
GPx	Glutational peroxidase
GSH	Glutational reduzida
GST	Glutational transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HNO ₂	Ácido nitroso
HO 1	Heme oxygenase 1
HOCl	Ácido hipocloroso
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
HSe-	Selenido
IA2	Antitirosina fosfatase
INT	2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-cloreto de feniltiazol
IOM	<i>Institute of medicine</i>
IR	Receptor de insulina

IRS-1	Substrato do receptor de insulina 1
K ⁺	Potássio
Keap1	<i>Kelch-like ECH associating protein 1</i>
L•	Alquila
LADA	<i>Latent Autoimmune Diabetes in Adult</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LO•	Radical alcoxila
LOO•	Radical peroxila
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDA	Malondialdeído
N ₂ O ₃	Óxido nitroso
Na ⁺	Sódio
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases</i>
NaOH	Hidróxido de sódio
NES	<i>Nuclear export signal</i>
NF-E ₂	Fator nuclear eritroide E2
NFκB	Fator nuclear kappa beta
NLS	<i>Nuclear localization signals</i>
NO•	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
NQO1	Quinona oxiredutase 1
Nrf ₂	<i>Related fator nuclear2</i>
O ₂ ^{•-}	Anion superóxido
OH•	Hidroxila
OMS	Organização mundial de saúde
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PAPR	Poli-ADP-ribose polimerase
PC 1-2	Pró-hormônio convertase
PDK	Quinase dependente de fosfatidilinositol
PI3k	Fosfatidilinositol-3-quinase
PKB	Proteína quinase B
PKC	Proteína quinase C
qRT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> (transcriptase reversa, reação em cadeia da polimerase em tempo real)
RDA	<i>Recommended Dietary Allowances</i>
SBP2	Proteína ligadora de Secis
Sec	Selenocisteína
SECIS	Sequência de inserção de selenocisteína
SeMet	Selenometionina
SeO ₃ ²⁻	Selenito
SeO ₄ ²⁻	Selenato
sMaf	<i>Small Maf</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphisms</i>
SOD	Superóxido dismutase
SOS	<i>Son-of-sevenless</i>
Trx	Tiorredoxina redutase
UL	<i>Tolerable Upper Intake Level</i>

ALENCAR, L.L. Estudo dos polimorfismos Pro198Leu no gene da glutathiona peroxidase 1 e -617C/A no gene do fator de transcrição Nrf2 com relação ao estresse oxidativo e ao estado nutricional relativo selênio de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1. São Paulo, 2014. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

RESUMO

Estudos têm mostrado que a atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx) se encontra reduzida na presença do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) Pro198Leu no gene que codifica para a GPx1. Associado a isso, polimorfismos na região promotora do gene do fator de transcrição Nrf2, o qual se liga ao elemento de resposta antioxidante na via de expressão de genes de enzimas antioxidantes, também pode alterar a expressão gênica da GPx1. Como o mineral selênio faz parte do sítio catalítico desta enzima antioxidante, muitos estudos têm associado o estado nutricional relativo a este nutriente com doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como o diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1). Nesse sentido, este estudo visou avaliar a presença dos SNPs Pro198Leu e -617 C/A no Nrf2, bem como da expressão gênica da GPx1 em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e relacioná-los com marcadores do estado nutricional relativo ao selênio e de estresse oxidativo, comparados com um grupo controle sem a doença. Este é um estudo caso e controle, constituído por dois grupos experimentais, um grupo composto por 77 pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) atendidos no Setor de Endocrinologia do Hospital das Clínicas, com idade entre 10 e 19 anos, de ambos os gêneros, e um grupo controle (GC) constituído por 74 indivíduos da mesma faixa etária, os quais relataram ausência de doenças crônicas. Foi realizada avaliação antropométrica e da ingestão alimentar. Além disso, foram determinados parâmetros bioquímicos de *status* de selênio, controle glicêmico (glicose sérica, HbA_{1c}), atividade enzimática, concentração de malondialdeído e 8-isoprostanos. A determinação dos SNPs e da expressão gênica foi realizada por PCR em tempo real. O grupo DM1 apresentou média de idade de 15,9 anos e o GC de 13,4 anos. A concentração de glicose sérica e HbA_{1c} foi significativamente diferente entre os grupos ($p < 0,001$). As frequências dos genótipos do SNP da GPx1 para o grupo DM1 e GC foram, respectivamente, 60% e 61% (CC), 30% e 32% (CT), 10% e 7% (TT), estando em equilíbrio gênico. A concentração de selênio no plasma foi significativamente maior no grupo DM1 e, ao avaliar essa concentração de acordo com genótipos, observou-se menor concentração de selênio no plasma no genótipo TT no grupo controle ($p < 0,05$). A expressão gênica da GPx1 não apresentou diferença estatística entre os grupos nem entre os genótipos. O mesmo foi observado quanto à concentração de 8-isoprostanos. No entanto, a atividade das enzimas GPx e SOD assim como a concentração de MDA foram significativamente maiores no grupo DM1 ($p < 0,05$). O estado nutricional de todos participantes em relação ao selênio estava deficiente. Foi observada correlação entre a concentração de selênio no plasma e nos eritrócitos e a atividade da GPx, assim como foi observada maior atividade enzimática e concentração de MDA no grupo DM, sem apresentar diferença na distribuição segundo os alelos estudados. Desta forma, pode-se concluir que independentemente da doença todos os indivíduos apresentaram deficiência de selênio. Em ambos os grupos, foi observada maior peroxidação lipídica, na presença do alelo variante T, o que pode indicar alteração da proteção antioxidante. No entanto, a presença do alelo variante nos SNPs avaliados não apresentaram influência sobre a expressão gênica.

Palavras-chave: nutrigenômica, micronutrientes, doenças crônicas não transmissíveis, estresse oxidativo, expressão gênica.

Alencar, L. L. Study of polymorphisms in glutathione peroxidase 1 Pro198Leu gene and -617C/A in the transcription factor Nrf2 gene in relation to oxidative stress and nutritional status of selenium in patients with type 1 diabetes mellitus. São Paulo, 2014 Master's Dissertation - Faculty of Pharmaceutical Sciences - University of Sao Paulo.

ABSTRACT

Studies have shown that the activity of glutathione peroxidase (GPx) is reduced in the presence of single nucleotide polymorphism (SNP) in Pro198Leu encoding GPx1 gene. Beyond that, polymorphism of the transcription factor Nrf2 gene promoter, which binds to the antioxidant response element in the pathway of antioxidant enzymes gene expression, may also alter gene expression of GPx1. As mineral selenium is part of the catalytic site of this antioxidant enzyme, many studies have associated the nutritional status of this nutrient with oxidative stress diseases, such as type 1 diabetes mellitus (DM1). Thus, this study aimed to evaluate the presence of Pro198Leu and -617 C / A in Nrf2 SNPs, as well as GPx1 gene expression in patients with type 1 diabetes mellitus, and to associate them with nutritional status of selenium and stress oxidative markers, comparing with a control group without the disease. This is a case-control study, compound of two groups, one group containing 77 patients with type 1 diabetes mellitus (DM1) from the Service of Endocrinology of Hospital das Clinicas, aged between 10 and 19 years, of both genders, and a control group (CG) was composed for 74 individuals of the same age, who reported no chronic diseases. Anthropometric and dietary intake assessment was performed. In addition, the biochemical parameters of selenium status, glycemic control (serum glucose, HbA1c), enzyme activity, concentration of malondialdehyde and 8-isoprostane were determined. The determination of SNPs and gene expression was performed by real-time PCR. The DM1 group had a mean age of 15.9 years and 13.4 years for the CG. The concentration of serum glucose and HbA 1c were significantly different between groups ($p < 0.001$). The genotype frequencies of the GPx1 SNP for DM1 and control group were, respectively, 60% and 61% (CC), 30% and 32% (CT), 10% and 7% (TT), which is in genetic equilibrium. The selenium concentration in plasma was significantly higher in DM1 group. To assess the selenium concentration according to genotypes, we observed lower plasma concentration in TT genotype in the control group ($p < 0.05$). The GPx1 gene expression showed no statistical difference between groups or between genotypes. The same result was observed for the 8-isoprostane concentration. However, GPx and SOD activity and MDA concentration were significantly higher in DM1 ($p < 0.05$). The nutritional status of all participants in relation to selenium was deficient. Correlation between selenium concentration in plasma and erythrocytes and GPx activity, as well as higher enzyme activity and MDA concentration in the DM1 group were observed, with no significant difference in the distribution according to studied alleles was observed. The presence of the variant allele in the SNPs evaluated showed influence neither on gene expression, nor on the activity of GPx. Thus, it can be concluded that, regardless of the disease, all subjects had low nutritional status of selenium, without genotype influence, and, as expected, oxidative stress was increased in individuals with DM1, as demonstrated by laboratory tests.

Keywords: nutrigenomics, micronutrients, chronic diseases, oxidative stress, gene expression.

1. INTRODUÇÃO

Diabetes *mellitus* é uma doença caracterizada por hiperglicemia e insuficiência da secreção ou ação da insulina endógena. Nos últimos anos, o número de casos esta aumentando em todo o mundo (SHAW; SICREE; ZIMME, 2010). O diabetes *mellitus* tipo 1, resulta da destruição autoimune das células β do pâncreas e representa de 5 a 10% dos casos diagnosticados (BANGSTAD *et al.* 2007).

O desenvolvimento, progressão e complicações desta doença estão em geral associados ao estresse oxidativo, o qual resulta do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas (ERs) e a capacidade antioxidante. A produção aumentada de ERs no diabetes pode ser decorrente, principalmente, da auto-oxidação da glicose. Porém a hiperglicemia estimula a formação de ERs a partir de outras vias como fosforilação oxidativa, lipoxigenase, óxido nítrico sintase (NOS), entre outras. A presença de ERs podem causar danos estruturais e funcionais nas células (MARITIM *et al.*, 2003).

Evidências sugerem que o mecanismo de defesa antioxidante no diabetes é deficiente, com alterações na atividade das enzimas antioxidantes (AKSOY *et al.*, 2005; SINDHU *et al.*, 2004). Assim, por ser componente essencial de selenoproteínas antioxidantes, como a glutathiona peroxidase (GPx), o selênio tem papel importante no diabetes (PAPP *et al.*, 2007). A GPx possui em seu sitio ativo quatro moléculas de selênio, na ausência deste mineral, a transcrição desta enzima pode ser inibida. Deste modo, a expressão e atividade da GPx estão diretamente relacionadas com o estado nutricional do individuo relativo ao selênio (KASAIKINA *et al.*, 2011; LUBOS, 2011; RESZKA, 2011; PAPP *et al.*, 2007; STADTMAN, 2005).

A biodisponibilidade e o *status* de selênio no organismo influenciados pela eficiência dos processos biológicos de digestão, absorção e síntese de selenoproteínas, presença de doenças, ingestão dietética do mineral, entre outros. Embora a ingestão inadequada deste micronutriente seja um fator limitante para a ação antioxidante, há outros fatores que também interferem nessa defesa antioxidante. A presença de polimorfismos nos genes da GPx ou

no fator de transcrição relacionados a ela, estão associados a redução da atividade dessa enzima (VIVANCO; MENGE; BARRIGA, 2010).

O polimorfismo de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphisms* – SNP) Pro198Leu, caracterizado pela substituição da citosina por timina, resulta na troca do aminoácido prolina por leucina no códon 198 no gene da GPx1. A presença do alelo variante Leu tem sido associada a menor resposta à ingestão de selênio, com redução da atividade enzimática e com maior risco de desenvolver alguns tipos de câncer (HANSEN *et al.*, 2009; HU; DIAMOND, 2003).

De maneira semelhante, o SNP -617 C/A que está associado à menor expressão gênica e atividade de enzimas antioxidantes, como da GPx, devido à substituição da citosina por adenina, na posição 617 da região promotora do gene do fator de transcrição Nrf2 (MARZEC *et al.*, 2007).

Deste modo, a avaliação do *status* de selênio e a determinação da presença de SNPs tanto no gene da GPx1, quanto no gene do fator de transcrição Nrf2 se fazem necessárias para melhorar a influência destes SNPs nos mecanismos de defesa antioxidantes. A partir disso estabelecer-se uma possível intervenção nutricional a fim de minimizar complicações tardias do diabetes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Diabetes *mellitus*

O diabetes *mellitus* é uma doença metabólica, caracterizada pela hiperglicemia decorrente da ausência ou de falha na secreção e/ou ação de insulina. Etiopatogenicamente, esta doença é classificada principalmente em dois tipos: Tipo 1, causado pela ausência total da secreção de insulina, e Tipo 2, resultante de falha na secreção e ação de insulina (CRAIG; HATTERLEY; DONAGHUE, 2009; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

Considerada uma das doenças crônicas não comunicáveis (DCNC) mais comuns, a prevalência do diabetes *mellitus* tem aumentado em todo o mundo. Estima-se que, em 2030, haja aumento de 65,5% do número de casos de diabetes nas Américas Central e do Sul. Em relação ao Brasil, a estimativa é de 5,1 milhões de casos para este ano, classificando o país na 5ª posição para esta incidência, inferior apenas em relação a Índia, China, Estados Unidos e Paquistão (SHAW; SICREE; ZIMME 2010).

O diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) representa entre 5 a 10% dos casos de diabetes. A incidência de DM1 apresenta variação demográfica, sendo a maior taxa por 100 mil habitantes com idade inferior a 15 anos encontrada na Finlândia que é de 38,1 e a menor na Coreia que é de 0,5. No Brasil a taxa é de 7,6/100 mil habitantes. Essa taxa vem aumentando particularmente na população com menos de 5 anos de idade (SBD, 2013).

A taxa de mortalidade por DM1 também vêm aumentando, embora alguns casos apresentem como causa de óbito as complicações da doença, como complicações cardiovasculares, e não o próprio DM. No ano de 2010 foi estimado aumento de 0,5 dos casos de morte na população entre 0 e 29 anos, o que torna essa doença a quinta principal causa de morte (SBD, 2013).

O DM1 é resultante da destruição autoimune das células β do pâncreas (WALKER *et al.*, 2011, FRAYN, 2003). O desenvolvimento desta doença está relacionado a predisposições genéticas e fatores ambientais ainda não completamente definidos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010).

Esta doença é subdividida em DM1A, DM1B e LADA (*Latent autoimmune diabetes in adults*). O DM1A é a forma mais frequente de DM1, apresenta auto anticorpos devido a alterações no gene regulador da auto-imunidade (AIRE). DM1B representa aproximadamente 7% dos pacientes com DM1 e são assim classificados, porque, embora apresentem fenótipos de DM1, não apresentam auto anticorpos ativos (DIB, 2008; BREITLING; LITTLE, 1989).

LADA vem aumentando nos últimos anos, trata-se de uma doença autoimune, porém com expressão clínica mais tardia e branda, apresenta auto anticorpos e aspectos fenótipos de DM2. O diagnóstico inclui, o surgimento após os 30 anos de idade, a identificação de auto-anticorpos das células de ilhotas ativas, principalmente o GAD, e deve ter tratamento independente de insulina por pelo menos seis meses após o diagnóstico de diabetes (ADEBAYO; WILLIS, 2014; NAIK; BROOKS-WORRELL; PALMER, 2009).

Aproximadamente 90% dos casos de DM1, apresentam auto anticorpos ativos, como antiinsulina, antidescarboxilase do ácido glutâmico (GAD 65) e antitirosina-fosfatases (IA2 e IA2 β), considerados marcadores da destruição imune das células β . (CRAIG; DONAGHUE, 2009). A quantidade de autoanticorpos detectados está relacionada ao risco de progressão das complicações desta doença (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014; CRAIG; DONAGHUE 2009; KNIP; SILJANDER, 2008).

Como resultado da ausência da produção de insulina, caracteriza-se o quadro de hiperglicemia em pacientes com DM1. Na ausência da doença, o controle glicêmico é extremamente eficaz e complexo. A quantidade de carboidratos ingerida é, geralmente, o primeiro determinante de resposta pós prandial, contudo o tipo de carboidrato e as variações na preparação do alimento podem influenciar a resposta glicêmica (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2008).

Após a captação de glicose pelos órgãos alvos insulino dependentes, a concentração desta molécula no plasma é reduzida, inicia-se o processo inverso ao iniciado anteriormente para introdução deste hexâmero, cessando a secreção de insulina. (HENQUIN, 2000).

A insulina é um hormônio anabólico essencial para a manutenção da homeostase de glicose, pois aumenta a entrada desta molécula nos tecidos muscular e adiposo e simultaneamente, inibe a produção de glicose pelo fígado. Além de estimular o crescimento e diferenciação celular, esse hormônio promove o armazenamento de substratos no tecido adiposo, fígado e músculos por estimular a lipogênese, glicogênese e síntese proteica, e ainda inibe a lipólise e glicogenólise (SALTIEL; KAHN, 2001).

A síntese de insulina ocorre a partir da transcrição do gene que a codifica, formando a pré-pró-insulina, a qual é armazenada no retículo endoplasmático rugoso. Em seguida, é transportada para o complexo de *Golgi* sob forma de pró insulina e armazenada nos grânulos de secreção imaturos, os quais serão convertidos posteriormente em insulina madura, sua forma biologicamente ativa, e peptídeo C pela ação das enzimas pró hormônio convertases 1 e 2 (PC1-2) e da exoprotease carboxipeptidase H (CPH). A insulina madura pode ficar armazenada por dias até ser utilizada ou degradada (SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006; HUTTON, 2000).

A glicose é um potente regulador do potencial de membrana das células β pancreáticas. O aumento de glicose plasmática é o estímulo inicial do processo de secreção de insulina, correspondendo a uma fase de curta duração. A segunda fase, mais lenta, porém sustentada, é caracterizada pela despolarização da membrana, com consequente liberação de grânulos de insulina (CURRY; BENNETT; GRODSKY, 1968).

Os transportadores GLUT 1 e 2 são responsáveis pelo ingresso das moléculas de glicose para o interior das células β , que no citosol é fosforilada pela enzima glicoquinase, originando glicose-6-fosfato. Assim, há aumento da produção de adenosina trifosfato (ATP) no local, aumentando a razão entre ATP e adenosina difosfato (ADP), o que estimula o fechamento dos canais de potássio (K^+) sensíveis a ATP (K^{ATP}) na membrana plasmática. Este desfecho impede o efluxo de K^+ , acumulando carga positiva no interior celular e elevando o potencial de membrana, o que reduz a polaridade da membrana plasmática (RORSMAN, 1997; ELIASSON *et al.*, 2007)

Dessa maneira, a despolarização da membrana estimula a abertura dos canais de cálcio, aumentando o potencial de ação da membrana, permitindo a entrada de Ca^{2+} no citosol e provocando enfim, a exocitose dos grânulos de insulina (TARASOV; DUSONCHET; ASHCROFT, 2004). Mecanismo demonstrado na **Figura 1**.

Figura 1: Esquema representativo do mecanismo de liberação de insulina. O acúmulo de glicose plasmática ativa a abertura dos canais receptores de glicose GLUT2. A glicose passa para o meio intracelular, onde é oxidada até a liberação de ATP. Ocorre a despolarização da membrana que ativa a abertura dos canais de Ca^{++} e estimula a liberação da insulina.

A insulina circula pelo organismo até ligar-se às células alvo, por meio do receptor de insulina tirosina quinase (IR), unindo moléculas adaptadoras, como receptores de insulina e da proteína semelhante ao colágeno com homologia SRC (SHC). Desta forma, ocorre a autofosforilação do IR, que fosforila a proteína substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) (MURROW; HOEHN, 2010; WHITE, 2002).

A partir da ativação do IRS-1, ocorre estímulo para a ligação de proteínas com domínios SH2, como PI3k (fosfatidilinositol-3-quinase) ou Grb2 (proteína 2 ligada ao receptor de fator de crescimento). Deste modo, é possível

que um receptor fosforilado ative várias moléculas de IRS-1, que por sua vez fosforila qualquer proteína com domínio SH2. Essas proteínas recrutam Grb2 que, associada a SOS (*son-of-sevenless*) ativam o Erk1/2 (quinase regulada pelo sinal extracelular), via MAPK (OBBERGHEN, *et al.* 2001).

Em paralelo, a via PI3k se liga ao IRS-1 fosforilado, que sofre mudança conformacional, resultando em aumento da atividade e produção do fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) na membrana plasmática. Após essa ligação, PIP3 recruta proteínas como quinase B (Akt/PKB) que, entre outras ações, regula a translocação do GLUT-4 para membrana plasmática, resultando em aumento na entrada da glicose para a célula (MURROW; HOEHN, 2010; VANHAESEBROECK; ALESSI, 2000).

Alterações na ativação de enzimas de sinalização próximas a insulina (IR, PI3K), dos alvos jusantes (PDK, PKB), dos alvos (MAPK) em músculos e tecido adiposo, vêm sendo estudadas em pacientes com obesidade, diabetes *mellitus* tipo 2 e resistência a insulina, que podem ser responsáveis pelos defeitos na sinalização da cascata de insulina (FROJDO; VIDAL; PIROLA, 2009).

Com ação oposta a da insulina, tanto na regulação da glicemia quanto no metabolismo de nutrientes, o glucagon estimula a elevação da concentração da glicose sanguínea, por meio da gliconeogênese e a glicogenólise. Assim é considerado um hormônio catabólico (QUESADA *et al.*, 2008).

As células α pancreáticas possuem um conjunto específico de canais que podem gerar potenciais de ação de Na^+ e Ca^{2+} na ausência ou diminuição da concentração de glicose no sangue. Desta maneira, ocorre a liberação de glucagon por estas células (GROMADA *et al.*, 1997; QUESADA *et al.*, 2008; WALKER *et al.*, 2011).

Em resposta ao aumento de glicose sérica, a secreção de glucagon é suprimida e, por consequência, a produção de glicose hepática é reduzida. Há estímulo para armazenamento de glicose muscular e lipídeos, diminuindo assim a glicose sérica (WALKER *et al.*, 2011; WANG; JIN, 2009; FRAYN, 2003).

2.2 Diabetes *mellitus* e estresse oxidativo

O surgimento e a progressão da diabetes *mellitus* estão associados com o aumento do estresse oxidativo, sendo que na patogênese dessa doença, este processo não ocorre somente pela cadeia transportadora de elétrons, mas também por outras vias (BROWNLEE, 2001; BROWNLEE, 2005).

A peroxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) forma mais espécies reativas que podem contribuir com processos de estresse oxidativo e complicações micro e macrovasculares de DCNC. Dessa maneira o estresse oxidativo na diabetes é considerado um importante fator do início e progressão das complicações cardiovasculares associadas a essa doença. (BROWNLEE, 2001; BROWNLEE, 2005; JONES, 2007; HALLIWELL *et al.*, 1989; MARITIM *et al.*, 2003).

Por muitos anos, definiu-se estresse oxidativo como o desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) e os mecanismos de defesa antioxidante. Contudo, Jones (2007) propôs que estresse oxidativo além desse desequilíbrio, consiste em qualquer alteração do controle e/ou sinalização do sistema *redox* o que resulta em dano e morte celular. Esta conclusão se deu após estudos sobre as vias de sinalização do sistema *redox* e marcadores de estresse oxidativo, além de que espécies reativas podem ser geradas em processos fisiológicos de geração de energia, ligação de vários hormônios, fatores de crescimento e inflamatórios participando assim da cascata de sinalização intracelular.

A capacidade que ERs possuem para reagir com os ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas celulares e/ou com lipoproteínas é a principal relação entre estresse oxidativo e o aparecimento de doenças (BENZIE, 1996). Esta situação é comumente observada nas doenças crônicas, como na diabetes *mellitus* (JONES, 2007).

Entre as moléculas reativas participantes do processo de estresse oxidativo, podemos destacar as que derivam do oxigênio: estão superóxidos ($O_2^{\cdot-}$); hidroxila ($OH^{\cdot}$); alquila ($L^{\cdot}$); alcóxila ($LO^{\cdot}$); e peróxila ($LOO^{\cdot}$), e as espécies reativas não radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido

hipocloroso (HOCl) e oxigênio *singlet* ($^1\text{O}_2$). Dentre as moléculas derivadas do nitrogênio estão: óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-) e peroxinitrito (ONOO^-) (JONES, 2006; HUANG; ROSE; HOFFMAN, 2012).

A principal formadora de ER é a mitocôndria que, por meio da cadeia transportadora de elétrons, metaboliza aproximadamente 90% do O_2 , sendo o restante utilizado por enzimas oxidases e oxigenases ou reações químicas diretas (BARBOSA *et al.*, 2010; SCHNEIDER *et al.*, 2004).

Neste caso, a responsável pelo controle da geração destes radicais é a citocromo oxidase, que catalisa o citocromo c, localizado na parte terminal da cadeia transportadora de elétrons, ao qual adicionado O_2 formará água. No entanto, aproximadamente 5% do O_2 metabolizado pelas mitocôndrias, são reduzidos de forma univalente e desviados para outra via, gerando $\text{O}_2^{\bullet-}$, $\text{OH}^\bullet$ e H_2O_2 . (BARBOSA *et al.*, 2010).

Outra via fisiológica de produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ é por meio da ação das enzimas xantina oxidase, 5-lipoxigenase ou NADPH (HUANG; HONG; HOFFMAN, 2012). As enzimas *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases* (NADPH), importantes formadoras de radicais, apresentam seis isoformas que diferem quanto ao local de expressão e cofatores necessários para ativá-las. Apresentam função de transmitir elétrons através de membranas celulares e, como oceptor, utilizam geralmente O_2 , gerando o radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ (BARBOSA *et al.*, 2010; BERNARD *et al.*, 2007).

Pela dismutação do radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ é gerado o H_2O_2 , o qual não é considerado um radical livre por não ter um elétron desemparelhado. Quando isolado, é praticamente inócuo por ser pouco reativo frente às moléculas orgânicas na ausência de metais de transição. No entanto, apresenta importante papel no estresse oxidativo por sua facilidade em transpor as membranas celulares e reagir com Fe^{2+} (reação de Fenton), formando $\text{OH}^\bullet$. O H_2O_2 oxida proteínas que apresentem resíduos de metionina ou grupos tiol muito reativos, como por exemplo, a GSH, o que pode comprometer ainda mais a defesa antioxidante (BARREIROS *et al.*, 2006; LUBOS, 2011).

O $\text{OH}\cdot$ é o mais deletério ao organismo, devido a sua alta reatividade, considerado principal iniciador do processo de peroxidação lipídica, por reagir com íons de Fe, com relação equimolar, $\text{Fe}_3^+/\text{Fe}_2^+$, catalisa a conversão de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em radicais $\text{LO}\cdot$ e peroxila ($\text{LO}_2\cdot$), os quais são potencialmente reativos e iniciam uma nova cadeia de reações rápidas ou lentas, de acordo com a valência de Fe. O ataque intensivo e frequente deste radical pode originar mutações no DNA (BARBOSA *et al.*, 2010; BARREIROS *et al.*, 2006; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

O processo de peroxidação lipídica gera principalmente os radicais $\text{L}\cdot$, $\text{LO}\cdot$ e $\text{LOO}\cdot$, favorecendo o surgimento de alterações na estrutura das membranas celulares, como alteração da permeabilidade, do fluxo iônico e de outras substâncias, o resultado disso é a perda de seletividade de entrada e/ou saída de moléculas, nutrientes e substâncias das células, o comprometimento dos componentes da matriz extracelular (colágeno, proteoglicanos e elastina), alterações do DNA e até a morte celular (BARBER, HARRIS, 1994; BENZIE, 1996; BARBOSA *et al.*, 2010).

Como resultado do processo de peroxidação, há a formação de hidroperóxidos lipídicos, produzindo em seguida, malondialdeído (MDA) como produto secundário (DEL RIO *et al.*, 2005). O aumento das concentrações de MDA tem sido observado em doenças relacionadas com dano provocado por espécies reativas (BAGIS *et al.*, 2005; STEGHESN *et al.*, 2001).

Outro produto da peroxidação lipídica é o 8-isoprostaglandina F2 alfa (8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$), uma prostaglandina pertencente à classe F2 e seu aumento está associado a processos patológicos, sendo assim um biomarcador eficaz de peroxidação lipídica (HALLEWELL; LEE, 2010; MONTUSCHI *et al.*, 1999).

A hiperglicemia acentuada apresentada na diabetes está associada ao aumento do risco de efeitos adversos (KAVANAGH; MCCOWEN, 2010), por aumentar concentrações de lipídeos, polióis, além de AGEs (SCHMID, 2007).

Na via do poliól, a glicose é metabolizada em sorbitol e frutose, respectivamente, pelas enzimas aldose redutase e sorbitol desidrogenase. Como consequência da hiperglicemia presente na diabetes, há o acúmulo de

sorbitol. Como este poliól, não tem fácil difusão entre membranas celulares, causa danos pelo estresse osmótico e leva a ativação da PKC, a qual eleva a atividade da fosfolipase A2 e aumenta dois inibidores da Na/K/ATPase: o ácido araquidônico e a prostaglandina E2 (XIA, 1995; SCHMID, 2007).

Na tentativa de diminuir o fluxo de sorbitol, o NADPH é utilizado como cofator, levando ao aumento da taxa NADPH/NAD. No entanto, como NADPH é cofator essencial para regenerar a glutathione reduzida (GSH), ocorre diminuição da sua disponibilidade, comprometendo a ação antioxidante da célula (SCHMID, 2007).

No diabetes, tanto a hiperglicemia, quanto o estresse oxidativo, promovem a formação de AGEs pela glicação ou oxidação de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, formados por vias oxidativas ou não oxidativas. No entanto, a maior formação de AGEs resulta de precursores dicarbonil, gerados em meio intracelular a partir da autooxidação da glicose, pela decomposição de Amadori (aductos 1-amino-1deoxifrutose lisina). Altamente reativos, os produtos desta via reagem com aminas intra e extracelulares, formando AGEs (GIACCO; BROWNLEE, 2010; WELLS-KNECHT *et al.*, 1995). A produção dos precursores de AGEs pode induzir lesões por vários mecanismos, tais como a modificação de proteínas e de componentes da matriz extracelular, que levariam a alterações das propriedades funcionais, como a elasticidade de vasos (DOI *et al.*, 1992).

O aumento da superóxido dismutase na mitocôndria reduz a atividade da gliceraldeído desidrogenase (GAPDH), isso pode ser resultado da ativação da poli-ADP-ribose polimerase do tipo 1 (PAPR) e da redução de NAD⁺, mais que pela inativação oxidativa direta da enzima (GIACCO; BROWLEE, 2010; DU *et al.*, 2003). O aumento da expressão da SOD na mitocôndria, reduz os efeitos causados pelas EROs produzidas pela hiperglicemia (SHEN *et al.*, 2006).

A síntese da causa e efeitos do estresse na DM1 esta demonstrada na **Figura 2.**

Figura 2: Causa e efeito do estresse na DM1. A hiperglicemia é causada pela ausência e/ou diminuição da produção e da secreção de insulina decorrente da destruição das células β pancreática. O aumento da glicose sérica pode ser manifestado em dano celular ou molecular, que combinados podem causar morte celular.

2.3 Diabetes *mellitus*, selênio e sistema defesa antioxidante

O sistema de defesa antioxidante, cujo objetivo é reduzir danos causados por EROs e ERNs, dispõe de mecanismos químicos, enzimáticos e não enzimáticos em defesa contra processos oxidativos. Entre mecanismos antioxidantes não enzimáticos, estão albumina, ácido úrico, bilirrubina, glutathione e tióis. Já nos processos químicos temos moléculas oriundas da alimentação com ação antioxidante, entre elas: ácido ascórbico, β -caroteno (pró vitamina A), cobre, tocoferol (vitamina E), zinco, e selênio os quais atuam na neutralização de EROs e ERNs (BERGER, 2005; PRADA *et al.*, 2004; BARBOSA *et al.*, 2010).

Descoberto em 1817, pelo químico Jöns Jacob Berzelius, o selênio, um elemento metaloide com propriedade química semelhante ao enxofre, é encontrado em quatro estados segundo a oxidação (0, +II, +IV e +VI). Sua incorporação nos solos se deu a partir do magma e dos gases vulcânicos e, após degelo da era glacial, sua distribuição ocorreu de forma heterogênea

pelos territórios do planeta (SEIXAS; KEHRIG, 2007; SUZUKI, 2005; KÖHRLE, 1999).

Esse mineral pode ser encontrado sob as formas de selênio elementar, oxiânion como selenato (SeO_4^{2-}), assimilável pelas plantas e selenito (SeO_3^{2-}), a qual possui maior capacidade de originar complexos com outras partículas presentes no solo e é menos disponível; e formas orgânicas, como análogos dos aminoácidos cisteína e metionina, selenocisteína (Sec) e selenometionina (SeMet), respectivamente (NAKAMARU; TAGAMI; UCHIDA, 2005; SEIXAS; KEHRIG, 2007; SUZUKI, 2005).

Apesar de estar bem distribuído pelos continentes, alguns fatores como pH e a natureza da rocha originária, podem interferir na concentração de selênio nos solos, causando variação na concentração deste mineral, que pode oscilar entre menos que 0,1 até mais de 10 mg/kg. Dessa maneira, alimentos oriundos deste solos também apresentam variação em sua concentração de selênio. O consumo de alimentos com concentração inferior a 0,1µg deste elemento resulta na deficiência deste mineral, assim como o consumo frequente de mais de 1µg selênio/ g, pode causar toxicidade (DUMONT *et al.*, 2006).

A princípio, o selênio foi considerado tóxico porque observaram que cavalos que pastavam em determinados solos na China e nos EUA, eram acometidos de uma doença grave, posteriormente observaram alta concentração deste mineral nesses solos (DUMONT *et al.*, 2006). Apenas em 1973, observou-se que se tratava de um micronutriente essencial, uma vez que seus benefícios à saúde eram significativos e principalmente por ser componente essencial de enzimas antioxidantes, como a GPx (FAIRWEATHER-TAIT *et al.*, 2011; HESKETH, 2008).

Alimentos de origem animal e cereais são as principais fontes de selênio (BAYOUMY-EL, 2001; COMBS *et al.*, 2001; FAIRWEATHER-TAIT *et al.*, 2011; FERREIRA, 2002). No entanto, a castanha-do-brasil é o alimento com maior teor de selênio, com concentrações que variam de 11 a 58 µg/g (COMINETTI *et al.*, 2011; THOMSON *et al.*, 2008; PACHECO; SCUSSEL, 2007; DUMONT *et*

al., 2006). Embora o elevado conteúdo de lipídeos existentes na castanha dificulte os estudos de especiação de selênio na mesma (DUMONT *et al.*, 2006), estudos mostram maior concentração de SeMet (DUMONT *et al.*, 2005; VONDERHEIDE *et al.*, 2002; SUN; ALTENBACH; LEUNG, 1987).

A principal forma de selênio na dieta é a SeMet encontrada em alimentos de origem animal e vegetal. Já a Sec é encontrada apenas em alimentos de origem animal. As formas inorgânicas deste mineral são geralmente utilizadas em fortificação de alimentos e suplementos alimentares. Ambos os compostos, orgânico e inorgânico, são convertidos em selenido (HSe-) no organismo, um metabólito intermediário comum, utilizado para a síntese de selenoproteínas ou excretados após serem gradualmente metilados (ALMONDES *et al.*, 2010; BOOSALIS, 2008; SUZUKI, 2005).

Quanto à absorção, o selênio inorgânico geralmente é absorvido em ocasião de deficiência desse mineral (SCHOMBURG; KOHRLE, 2008). Sendo que a absorção do selenato depende do gradiente de Na^+/K^+ e ATPase e apresenta percentual maior que 90 (BURK; LEVANDER, 2003). Por sua vez, a absorção do selenito fica em torno de 80% e ocorre por difusão simples, principalmente no duodeno (BURK; LEVANDER, 2003; FOX; FAIRWEATHER-TAIT, 1999).

A absorção de SeMet não depende do estado nutricional do indivíduo em relação ao selênio, e ocorre em cerca de 95% no intestino delgado, mediada por um transporte duplo ativo de Na^+ e aminoácidos neutros (FAIRWEATHER-TAIT, 1997). A SeMet pode ser incorporada diretamente em proteínas por meio de substituição da metionina. Outra via independente é a do composto orgânico γ -glutamil-metilselenocisteína, o qual é convertido em metilselenocisteína (CH_3Sec) e em seguida convertido pela β -liase em metilselenol (CH_3SeH), sendo excretado principalmente pela respiração (RAYMAN; INFANTE; SARGENT, 2008; SUZUKI, 2005).

Já a Sec, mesmo sendo menos absorvida quando comparada a SeMet, ainda assim é a forma mais ativa biologicamente, e sua absorção está relacionada diretamente à sua incorporação nas selenoproteínas (SCHOMBURG; , 2008)

Conhecida como o 21º aminoácido, a Sec faz parte das selenoproteínas, sendo que a maioria destas participa das reações de oxido-redução, entretanto ainda não foram estabelecidas as funções de todas as selenoproteínas (FAIRWEATHER-TAIT *et al.*, 2011; HESKETH, 2008; PAPP, 2007). Até o momento, foram identificadas trinta selenoproteínas, das quais vinte e cinco são encontradas no genoma humano (BODNAR; KONIECZKA; NAMIESNIK, 2012).

Por ser análogo da cisteína, a Sec possui sua molécula semelhante a deste aminoácido, com substituição de enxofre pelo selênio. A comparação entre as estruturas pode ser vista na **Figura 3**.

Figura 3. Moléculas cisteína e selenocisteína.

A incorporação da selenocisteína na sequência de aminoácidos é realizada por meio do processo de recodificação, no qual o *stop códon* UGA é recodificado para o *códon sense*. Este processo necessita de estruturas secundárias específicas denominadas de elementos de sequência de inserção de selenocisteína (SECIS), nas regiões 3' não traduzidas (3'UTR) do mRNA, que recrutam uma proteína ligadora de SECIS denominada SBP2 (*Substrate-Binding Protein*), a qual age na captação do fator de elongação específico da Sec (EFSec) e de seu tRNA cognato (tRNA^{Sec}) (BELLINGER *et al.*, 2012; HESKETH, 2008). Na **Figura 4**, está esquematizada a via de incorporação da Sec.

Até o momento, são conhecidas sete isoformas de GPx, que possuem em seu sítio ativo quatro moléculas de selênio, as quais incluem: GPx citosólica (GPx1), a GPx específica gastrintestinal (GPx2), a GPx encontrada no plasma (GPx3), a GPx fosfolípídio hidroperóxido (GPx4) e a GPx6, que foi recentemente descoberta e está localizada no epitélio olfatório e tecidos embrionários. Outras variantes da GPx que contém cisteína ao invés de selenocisteína, incluem a GPx5 com expressão restrita no epidídimo e o fosfolípídio hidroperóxido, nomeada de GPx7 (HUANG; ROSE; HOFFMANN, 2011; PAPP *et al.*, 2007, KRYUKOV *et al.*, 2003; UTOMO *et al.*, 2004).

O conjunto das GPx constitui um importante sistema enzimático antioxidante. Assim como outras selenoenzimas, a estrutura do sítio ativo de cinco isoformas de GPx contém selênio sob a forma de resíduos de selenocisteína, enquanto duas possuem cisteína, sendo por isso consideradas não-dependentes de selênio. As cinco GPx selenodependentes, são: GPx 1 (citosólica), a primeira a ser reconhecida, GPx 2 (gastrintestinal), GPx 3 (plasmática), GPx 4 (fosfolípídio hidroperóxido) e a GPx 6 (epitélio olfatório e tecidos embrionários) (VIVANCO; MENGE; BARRIGA, 2010; PAPP; HOLMGREN; KHANNA, 2007; HOFFMAN; BERRY, 2005).

Alguns fatores modulam a expressão, transcrição e regulação da GPx1, como também pode ser regulada como parte de resposta celular ao estresse oxidativo. Uma vez que a GPx possui em seu sítio ativo quatro moléculas de selênio, na ausência deste mineral, a transcrição da enzima GPx pode ser inibida (LUBOS, 2011). Deste modo, a expressão e atividade da GPx estão diretamente relacionadas com o estado nutricional do indivíduo relativo ao selênio (KASAIKINA *et al.*, 2011; PAPP *et al.*, 2007; STADTMAN, 2005; RESZKA, 2011).

Figura 4. Esquema representativo do processo de incorporação da selenocisteína. Legenda: Sec: selenocisteína; SECIS: sequência de inserção de selenocisteína; SBP2: proteína ligadora de Secis 2; EFSec: fator de alongação específico da selenocisteína; tRNA: RNA transportador; **1.** SECIS recruta a proteína ligadora de Secis (SBP2) a qual atua na captação do fator de alongação específico da selenocisteína (EFSec) e de seu tRNA. **2.** Inserção do tRNA na região UGA resultando na incorporação da Sec, formando selenoproteína.

O estado nutricional do indivíduo em relação ao selênio, pode ser afetado por diversos fatores, entre eles componentes genéticos, biológicos, físicos, ambientais, comportamentais, entre outros. A avaliação do *status* deste mineral no organismo pode ser determinada por meio de análises nos cabelos, unhas, urina e mais diretamente através da sua concentração no sangue (sangue total, soro, plasma e eritrócitos). Análises de selenoproteínas em diferentes frações do sangue podem fornecer uma estimativa mais acurada do *status* de selênio dos indivíduos (FAIRWEATHER-TAIT *et al.*, 2011).

Dentre as selenoproteínas mais utilizadas para avaliar o status de selênio destacam-se GPx1, GPx3 e GPx4. No entanto, a atividade destas enzimas no plasma, eritrócitos ou plaquetas respondem a suplementação apenas em populações deficientes, sendo observado o aumento apenas na atividade da GPx3 com ingestão superior a 65µg de selênio por dia (FAIRWEATHER-TAIT *et al.*, 2011; OTTEN; PITZHELLWIG; MEYERS, 2006).

Com objetivo de evitar tanto a deficiência quanto a toxicidade de selênio na população, o *Institute of Medicine* (IOM) através da *Food and Nutrition Board* (FNB) estimou as recomendações relativas para este mineral. Baseada na maximização da atividade da GPx, a determinação das necessidades de selênio foram utilizadas como indicador para o cálculo da Necessidade Energética Média Estimada (EAR) e Ingestão Dietética Recomendada (RDA). No **Quadro 1**, estão apresentadas as recomendações de ingestão de selênio.

Quadro 1. Recomendações de ingestão de selênio em µg/dia, de acordo com idade, proposto pelo IOM/FNB, 2000.

Recomendação de ingestão	Selênio (µg/dia)			
	DRI	1-3 anos	4-6 anos	9-13 anos
EAR	17	23	35	45
RDA	20	30	40	55
UL	90	150	280	400

Fonte: Institute of Medicine/Food and Nutrition Board, 2000.

DRI *Dietary Reference Intake* - ingestão dietética de referência

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

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

UL *Tolerable Upper Intake Level* – nível máximo de ingestão tolerável: é o valor mais alto de ingestão diária continuada de um nutriente que não foi observado risco de efeito adverso à saúde para todos os indivíduos de um mesmo estágio de vida ou gênero.

Estudos têm investigado a influência do genótipo sobre o estado nutricional dos indivíduos relativo aos micronutrientes, como o selênio, e da alimentação na modulação da expressão gênica de enzimas antioxidantes. Contudo, mais estudos são necessários para avaliar alterações de biomarcadores funcionais, interação entre selênio e outros micronutrientes, os quais podem exercer influências sobre o metabolismo (BOETTLER *et al.*, 2012; FAIRWEATHER-TAIT; COLLINGS; HURST, 2010).

O sistema enzimático é representado principalmente pela GPx, catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e tioredoxina redutase (Trx), que atuam principalmente na redução de O_2^- e H_2O_2 . A SOD responsável pela dismutação de O_2^- em H_2O_2 , e as enzimas GPx e a CAT atuam sobre o H_2O_2 formando duas moléculas de H_2O e álcool, o que reduz a formação de EROs, principalmente o hidroxila ($OH\cdot$). Este radical possui alto potencial reativo, além de ser considerado iniciador do processo de peroxidação lipídica que, entre outros danos, pode causar mutações no DNA (BARBOSA *et al.*, 2010; JONES, 2007; HALLIWELL *et al.*, 1989; MARITIM *et al.*, 2003). As reações e atuações enzimática estão representadas na **Figura 5**.

Figura 5. Esquema das reações e ação das enzimas SOD, GPx e CAT.

Legenda: O_2^- : superóxido; SOD: superóxido dismutase; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; CAT: catalase; GPx: glutathiona peroxidase; O_2 : oxigênio; H_2O : água.

O processo de desintoxicação ou biotransformação no organismo classifica-se em três partes com específicas classes enzimáticas atuantes. As enzimas da Fase I atuam introduzindo oxigênio à substância, formando metabólitos altamente reativos, que serão neutralizados pelas enzimas da Fase II. Esta segunda fase catalisa tais substâncias tornando-as inativas ou excretáveis. A terceira fase consiste na excreção destas substâncias (VARGAS; JOHNSON, 2009; JAGANJAC, 2010).

Um importante fator nesse processo é o fator nuclear - eritroide 2 (NF-E2), um heterodímero, composto por subunidades de 45-kDa de eritroide (p45)

e o polipeptídeo (p18), o qual foi posteriormente identificado como small Maf (ALAM, 2006; VARGAS, JOHNSON, 2009; JAGANJAC, 2010).

O NF-E2 pertence à família dos fatores de transcrição Cap'n'Collar - basic region leucine zipper (CnC-bZIP), foi identificado em 1994 (MOI et al., 1994; BRIGELIUS-FLOHE, 2011). Este fator de transcrição contém 43 aminoácidos no domínio CnC, com estrutura bZIP, constituída por uma leucina a cada sete posições, formando dímeros, e em uma região básica nas pontas, estabilizando sua estrutura helicoidal. Visto que suas hastes são flexíveis e se abrem como um zíper, origina-se seu nome, assim serve como módulo de ligação ao DNA (ALAM, 2006; VARGAS, JOHNSON, 2009; JAGANJAC, 2010).

Essa estrutura permite que a ligação desse fator de transcrição à sequência alvo seja realizada somente como heterodímeros, como a small Maf (sMaf) (ALAM, 2006).

A família CNC-bZIP é constituída por seis membros: a p45, o NF-E2 related fator (Nrf) 1, Nrf2, Nrf3, Bach1 e Bach2. Estes se subdividem de acordo com o poder de ativação de domínio, sendo que p45, Nrf1 e Nrf2 apresentam domínios de ativação de moderado a forte, o Nrf3 apresenta baixo domínio de ativação e Bach 1 e 2 são sem domínios aparente (ALAM, 2006).

O fator de transcrição Nrf2 é composto por 605 aminoácidos e subdivide-se em seis domínios, ou seja, seis sequências peptídicas de ativação chamados Nrf2-ECH *homology* 1 a 6 (Neh1, Neh2, Neh3, Neh4, Neh5 e Neh6). O domínio Neh1 contém a região CnC, e a ligação de DNA bZIP, responsável pela heterodimerização, que interage com sMaf (BAIRD; DINKOVAKOSTOVA, 2011).

A região Neh2 é o domínio de ligação negativa, a qual é responsável pela ligação com a proteína Keap1 (*Kelch-like ECH associating protein 1*), por meio da sua união com os domínios DLG e ETGE, os quais contêm diversas sequências *nuclear export signal* (NES) e *nuclear localization signals* (NLS). Essas sequências são responsáveis pela locomoção do Nrf2 entre o citosol e o núcleo, e pela degradação proteassomal de Nrf2 (JAIN et al., 2005; BAIRD; DINKOVAKOSTOVA, 2011). O domínio Neh3 liga-se à proteína *chromodomain-helicase-DNA-binding protein 6* (CHD6), que funciona como um

coativador e estimula a transcrição de genes dependentes do ARE (Elemento de Resposta Antioxidante) (NIOI *et al.*, 2005). Da mesma maneira, os domínios Neh4 e Neh5 agem sinergicamente para ativação gênica. O domínio regulador Neh6 é um importante local de controle e degradação nuclear de Nrf2, independente da Keap1 (BAIRD; DINKOVAKOSTOVA, 2011; McMAHON *et al.*, 2004). Os domínios estruturais de Nrf2 estão esquematizados a seguir, na **Figura 6**.

Figura 6. Domínios funcionais do Nrf2. Neh2: onde se encontram os domínios DLG e ETGE, responsáveis pela ligação à proteína Keap1, regulação da degradação proteossomal de Nrf2 e migração para o núcleo. Neh4 e Neh5. Responsáveis pela ativação transcricional. Neh6. Região de controle independente de Keap1. Neh1. Domínio de ligação com DNA. Neh3. Responsável pela ligação com proteína CHD6 que estimula a transcrição de genes de ARE. Legenda: CHD6: *chromodomain-helicase-DNA-binding protein 6*; Keap: *Kelch-like ECH associating protein*; Nrf2: *Nuclear Factor-erythroid-2-related fator-2*; Neh: *NrF2-ECH homology*.

O fator de transcrição Nrf2, esta envolvido na expressão de enzimas da Fase II é expresso em células eritroides, megacariócitos e mastócitos (ELIASSON *et al.*, 2007; JAGANJAC, 2010). Encontra-se em abundância no fígado, intestino, pulmões e rins, onde as reações de desintoxicação são constantes e intensas (XUE *et al.*, 2013).

Em condições basais, o Nrf2 está ligado a proteína repressora Keap 1. Esta ligação se dá entre as cisteínas C273 e C288 da proteína e o domínio Neh2 do fator de transcrição Nrf2. A união Nrf2/keap1 é considerada importante sensor do estado redox intracelular. Assim, ocorre uma etapa fundamental para a via de sinalização e tradução de enzimas de desintoxicação da Fase II (KANG *et al.*, 2005; CHARTOUMPEKIS, KENSLER, 2013).

Na presença de estímulos, no caso de diabetes *mellitus*, EROs e principalmente a PCK, promovem a oxidação das cisteínas responsáveis pela ligação Nrf2/Keap 1, resultando na dissociação deles (KANG *et al.*, 2005; CHARTOUMPEKIS, KENSLER, 2013).

Devido a isso, o Nrf2 migra para o núcleo celular e forma um heterodímero com a proteína *small Maf*, o qual se liga ao ARE e ativa a transcrição de uma série de enzimas antioxidantes tais como a GPx, CAT, glutathione transferase (GST), quinona oxiredutase 1 (NQO1), heme oxigenase 1 (HO 1), entre outras (WAKABAYASHI *et al.*, 2004; ITOH *et al.*, 2004; KENSLER *et al.*, 2007; SYKIOTIS; BOHMANN, 2010).

A união Nrf2-Maf/ARE resulta na indução de um potente sistema de defesa antioxidante que regula a expressão de aproximadamente 250 enzimas, conhecido como *prolife genes* (PETRI *et al.*, 2012). Após a restauração do sistema *redox*, retoma-se a associação da proteína Keap1 ao fator de transcrição Nrf2 no citoplasma (WAKABAYASHI *et al.*, 2004; ITOH *et al.*, 2004; KENSLER *et al.*, 2007). Na **Figura 7**, esta a representação, de maneira resumida, do mecanismo de ação do fator de transcrição Nrf2.

A resposta adaptativa descrita acima é conhecida como “contra ataque eletrofílico” ou fase 2 de resposta a desintoxicação. Na ausência de estímulos, a atividade basal do fator de transcrição Nrf2 é de manter a expressão de enzimas antioxidantes em concentrações fisiológicas. Assim, o fator de transcrição Nrf2 controla a atividade basal e a atividade induzida a resposta de defesa antioxidante enzimática celular (SYKIOTIS; BOHMANN, 2010).

De mecanismo de ativação semelhante, porém com efeito oposto, atua o fator nuclear kappa beta (NFkB), localizado no citosol também ligado a uma proteína repressora IκB. A presença de fatores pró-inflamatórios como citocinas, promove a oxidação de IκB, e o deslocamento de NFkB para o núcleo celular, onde se liga a região promotora de genes pró-inflamatórios, como o COX2, e induz a expressão de mais agentes inflamatórios (SURH, 2008)

Figura 7. Esquema representativo do mecanismo de ação do fator de transcrição Nrf2 no diabetes *mellitus*. Legenda: Nrf2: *nuclear factor eritroide 2 related factor 2*; Keap1: *Kelch-like ECH associating protein 1*; ARE: *antioxidant response element*; sMaf: 1. Em condições basais há junção do complexo Keap1/Nrf2, no citoplasma. 2. Após estímulo, como aumento de EROs, ERNs, PKC, entre outros processos resultantes da hiperglicemia, ocorre separação do complexo Keap1/Nrf2. 3. Em seguida, o fator de transcrição Nrf2 se desloca para o núcleo celular, enquanto a proteína Keap 1 permanece no citoplasma. 4. O fator de transcrição Nrf2 liga-se a proteína sMaf, e em seguida Nrf2/sMaf liga-se a região promotora de ARE ocorre a transcrição dos genes destas enzimas. 5. Transcrição de enzimas antioxidantes entre elas SOD: superóxido redutase, CAT: catalase, GPx, NQO: quinona oxiredutase, entre outras. 6. Na ausência de estímulo, Nrf2 segue para a degradação proteossomal.

Dessa maneira, a resposta de defesa enzimática atua de forma antagônica à inflamação, uma vez que o fator de transcrição Nrf2 resulta na supressão de vias que estimulariam a expressão das vias pro-inflamatórias mediadas pela sinalização do NFkB (JEONG *et al.* 2004).

A ausência ou redução da expressão do gene do Nrf2 aumenta o estado de estresse celular, e a deleção deste fator de transcrição tem sido associada ao surgimento e progressão de DCNC, como alguns tipos de câncer (pulmão, fígado e intestino) e doenças neurodegenerativas, tais como Doença de *Parkinson*, Doença de *Alzheimer*, Doença de *Huntington* e Esclerose lateral amiotrófica (PETRI, *et al.*, 2012).

Em ratos knockout para o fator de transcrição Nrf2 foi observado redução da expressão de enzimas antioxidantes e consequente redução na atividade de tais enzimas no fígado (ITOH *et al.*, 1997), intestino (McMAHON *et al.*, 2001).

No entanto, Xue *et al.* (2013) verificaram que ratos *knockout* para o fator de transcrição Nrf2 tiveram a resistência à insulina agravada. Outro estudo com animais mostrou que o sistema Nrf2 está comprometido no diabetes, o que contribui com o surgimento de complicações próprias da doença (PALSAMY; SUBRAMANIAN, 2011).

Em estudo de suplementação com selênio e glicorafarina (precursor de sulforano) em ratos, foi observado aumento na expressão do fator de transcrição Nrf2 e ARE e, como consequência, também houve aumento da expressão de enzimas de desintoxicação da fase II (EFII). Desse modo, esses compostos mostraram-se eficazes na proteção contra processos inflamatórios no intestino grosso e câncer de cólon (BLUM *et al.*, 2013).

Outro estudo mostrou associação da deficiência da atividade de enzimas da fase II com desenvolvimento de doenças, como risco aumentado para desenvolver câncer de cólon (BALOGUN *et al.*, 2003).

2.4 SNPs Pro198Leu no gene da GPx1 (rs1050450) e -617C/A no gene do fator de transcrição Nrf2 (rs6721961) no DM

O maior entendimento sobre as doenças genéticas foi possível a partir do sequenciamento do genoma humano. A interação entre gene e fatores ambientais, estilo de vida e alimentação, os quais podem resultar em desenvolvimento de doenças, já está bem estabelecida (KAUWELL, 2005).

Frequências alélicas, assim como predisposição a determinadas doenças, variam consideravelmente entre as populações mundiais. Isto provavelmente é resultado da genética, mas também da adaptação a fatores seletivos locais, como clima, estilo e qualidade de vida e disponibilidade de nutrientes (PENA, 2011).

O Brasil é um importante modelo de genética, devido a sua miscigenação. Um estudo que objetivou determinar a ancestralidade genômica no Brasil mostrou que as populações de diferentes regiões do país estão ancestralmente mais semelhantes do que se pensava (PENA, 2011) (**Figura 8**)

Figura 8. Distribuição dos participantes segundo ascendência genômica.

Fonte: Pena, 2011. Enredo triangular e a tabela das proporções da ascendência genômica: africana, européia e ameríndia em quatro diferentes regiões do Brasil, independente de categoria de cor autorrelatada. Cada ponto representa uma região separada: 1. Norte (Pará), 2. Nordeste (Bahia), (3) Sudeste (Rio de Janeiro) e (4) Sul (Rio Grande do Sul).

Atualmente, uma das vertentes consideráveis para esclarecimentos sobre interação entre ambiente, genética e doenças é o estudo dos polimorfismos, que consiste em alterações pontuais em nucleotídeos no DNA

com frequência superior a 1% da população. Existem muitos tipos de polimorfismos, sendo os mais comuns os polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphisms* - SNPs), que consistem na substituição de uma única base em um determinado códon do DNA (BALASUBRAMANIAN, 2004; KAUWELL, 2005).

O primeiro SNP identificado no gene que codifica a GPx1 foi identificado por Forsberg e colaboradores em 1999. Este polimorfismo ocorre pela alteração C/T na posição 593, o qual codifica para o aminoácido leucina ao invés de uma prolina no códon 198 (Pro198Leu). A presença deste SNP está associada à redução da atividade da GPx1 e ao surgimento e desenvolvimento de DCNC em diferentes populações.

Estudos associaram a presença deste SNP a alguns tipos câncer, como de próstata (ARSOVA-SARAFINOVSKA *et al.*, 2009), de mama (RAVN-HARREN *et al.*, 2006) e de pulmão (RATNASINGHE *et al.*, 2010).

Um estudo brasileiro avaliou a presença do SNP Pro198Leu em mulheres obesas e verificou que a atividade da GPx nos eritrócitos encontrava-se reduzida nas mulheres que apresentavam pelo menos um alelo polimórfico (CT e TT), demonstrando, assim, a interação entre este SNP e a atividade enzimática da GPx (COMINETTI *et al.*, 2011).

No estudo de Kuzuya *et al.* (2008), verificou-se a associação entre esse SNP e a prevalência da síndrome metabólica em homens japoneses. No entanto, esta prevalência não foi observada em mulheres. Outro estudo verificou que essa associação foi prevalente em 7 a 11% nos caucasianos e em 15% nos negros (HESKETH; MÉPLAN, 2011).

Outro estudo brasileiro realizado com indivíduos idosos com doença de Alzheimer mostrou que a presença do SNP Pro198Leu estava associada com o pior estado nutricional relativo ao selênio em idosos (CARDOSO *et al.*, 2012).

Shuvalova e colaboradores (2010) avaliaram homens com doença coronariana, e observaram que os pacientes com os alelos CT e TT (17%) apresentaram atividade da GPx reduzida, assim como maior quantidade de lipoperóxidos (74%) e malondialdeído (27%) quando comparados àqueles com o alelo CC. Portanto, maior intensidade de oxidação foi observada nos pacientes com alelo variante Leu.

Zhou e colaboradores (2007) ao avaliarem 198 indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2 e 94 indivíduos sem a doença para verificar a relação entre o

SNP Pro198Leu no gene da enzima GPx1 e o risco de desenvolver doenças coronarianas, observaram maior frequência do alelo polimórfico nos indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2. Contudo, não verificaram associação entre o SNP e o desenvolvimento de doenças coronarianas.

De maneira semelhante, Hamanis e colaboradores (2004) verificaram a presença do SNP Pro198Leu relacionada com a prevalência de doença cardiovascular em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2.

Outro aspecto a ser avaliado quanto à redução da atividade de enzimas antioxidantes, é a presença de polimorfismos na região promotora do fator de transcrição Nrf2, o qual se liga ao ARE e promove a transcrição de genes das enzimas de desintoxicação. Segundo Kauwell (2005), os polimorfismos na região promotora de genes possivelmente estão associados tanto ao risco quanto a resistência em desenvolver doenças crônicas.

Marzec e colaboradores (2007) identificaram a alteração do alelo C por A na posição -617 na região promotora do gene do fator de transcrição Nrf2. A funcionalidade deste fator de transcrição foi avaliada na região que apresentava o SNP, e observou-se que esta alteração pode prejudicar a transcrição do gene. Isso sugere que esse SNP altera a transcrição do fator de transcrição Nrf2, responsável pela indução da transcrição de enzimas de desintoxicação de Fase II, que atuam na redução do estresse oxidativo (GPx, CAT, GST, NQO1 e HO 1).

A frequência do SNP -617 C/A na região promotora do gene do fator de transcrição Nrf2 vem sendo encontrada de maneira constante e uniforme na raça branca, como foi verificado na população mexicana (24%) (CÓRDOVA, *et al.*, 2011). Esta frequência foi semelhante ao observado na população asiática (24 a 29%), em homens austríacos (33%) (BOETTLER *et al.*, 2012) e em brancos americanos (40%) (MARCZAK *et al.*, 2012). Ressalta-se que na população negra a frequência desse SNP é menor, como na afro-europeia (10%) e afro-americano (2%) (MARCZAK *et al.*, 2012). No **Quadro 2** verifica-se a frequência desse SNP em diversas populações.

Um dos primeiros estudos conduzidos para avaliar a relevância funcional de genótipos específicos do fator transcrição Nrf2 e de sua expressão mediante a ingestão de uma dieta rica em compostos antioxidantes mostrou a frequência de 33% do SNP -617C/A na região promotora do gene deste fator de transcrição entre os indivíduos saudáveis do sexo masculino. Além disso, verificaram também que o consumo da dieta antioxidante reduziu a expressão gênica do fator de transcrição Nrf2, e consequente diminuição da expressão de enzimas da fase II (BOETTLER *et al.*, 2012).

Em ratos *knockout* para o fator de transcrição Nrf2 foi observado menor capacidade de proteção e desintoxicação celular, além de síntese reduzida de GPx (CHAN *et al.*, 2001). Desta forma, o fator de transcrição Nrf2 é considerado um regulador dos genes que codificam as enzimas do sistema de defesa antioxidante, as quais participam da homeostase celular *redox*, crescimento e apoptose celular, resposta inflamatória e degradação da via mediada por ubiquitina (THIMMULAPPA *et al.*, 2002; KWAK *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2003; RANGASAMY *et al.*, 2004; CHO *et al.*, 2005).

Assim, a presença do SNP Pro198Leu no gene da GPx1 e do SNP -617C/A na região promotora do gene do fator de transcrição Nrf2 podem influenciar a proteção antioxidante endógena, visto que nesta situação as enzimas antioxidantes podem ter sua funcionalidade e expressão alteradas. O estado nutricional do indivíduo relativo ao selênio também pode influenciar o estado antioxidante, uma vez a GPx é selenodependente. Desta forma, os conhecimentos adquiridos neste estudo são importantes para o melhor entendimento sobre fatores que influenciam o estresse oxidativo em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1, visando a redução de complicações tardias do diabetes e consequente melhora da qualidade de vida desta população. Além disso, os dados sobre a expressão gênica e os polimorfismos podem auxiliar no estabelecimento de importantes biomarcadores da função de micronutrientes e no ajuste das recomendações de selênio na presença de polimorfismos.

Quadro 2. Estudos de frequência do SNP C/T (Pro198Leu – rs1050450) no gene da enzima GPx1.

Objetivo do estudo	População	N	Distribuição alélica (n)	Frequência alelo variante (%)	Resultado	Referência
Associar SNP, com a atividade enzimática da GPx1, o estado nutricional dos indivíduos em relação ao selênio e a mortalidade em determinado hospital	Adultos Hospitalizados (Brasil)	110	CC 60 CT 42 TT 08	45	Não houve associação entre o SNP e demais parâmetros avaliados.	Costa <i>et al.</i> , 2014
Determinar a frequência do SNP Pro198Leu, e relacionar com a atividade enzimática da GPx1 e com o estado nutricional dos indivíduos em relação ao selênio.	Idosos (Brasil)	57	CC 42 CT 08 TT 07	26	Relacionou a presença do SNP com ruim estado nutricional dos idosos em relação ao selênio.	Cardoso <i>et al.</i> , 2012
Avaliar o efeito da suplementação com castanha-do-brasil e parâmetros de status de selênio, atividade da GPx e dano no DNA	Mulheres obesas (Brasil)	37	CC 18 CT 14 TT 05	32	A suplementação foi eficiente em melhorar o <i>status</i> de selênio e a atividade da GPx. No entanto, a presença de pelo menos um alelo variante pareceu minimizar esses efeitos.	Cominetti <i>et al.</i> , 2011
Associar SNP a neuropatia no diabetes.	Adultos (Japão)	173	CC 149 CT 24 TT 00	12	A presença de um alelo variante pode ser um predito genético para neuropatia diabética.	Matsuno <i>et al.</i> 2011
Associar SNP com a concentração de selênio e a atividade da GPx no sangue total, em uma área endêmica da doença de Keshan.	Adultos (China)	361	CC 315 CT 41 TT 05	13	Encontraram associação entre a presença do alelo Leu com a menor concentração de selênio e menor atividade da GPx	Lei <i>et al.</i> , 2009

Quadro 2. Estudos de frequência do SNP C/T (Pro198Leu – rs1050450) no gene da enzima GPx1.

Objetivo do estudo	População	N	Distribuição alélica (n)	Frequência	Resultado	Referência
Associar SNP com risco de desenvolver doença cardiovascular em indivíduos com diabetes.	Adultos (Japão)	184	CC 151 CT 33 TT 00	17	Foi observada a associação entre SNP e risco de desenvolver doença cardiovascular em indivíduos com diabetes.	Hamanishi <i>et. al.</i> , 2004
Associar com a atividade da GPx e o risco de desenvolver doenças cardiovasculares	Adultos (Suécia)	315	CC 169 CT 123 TT 23	27	A presença de alelo variante não influenciou a atividade enzimática e não foi observado risco de desenvolver	Fosberg <i>et al.</i> , 2000
	Adultos (Finlândia)	66	CC 23 CT 32 TT 11	41		

Quadro 3. Estudos de frequência do SNP -617C/A na região promotora do gene do fator de transcrição Nrf2 (rs6721961).

Objetivo do estudo	População	<i>n</i>	Distribuição alélica (n)	Frequência alelo variante (%)	Resultado	Referência
Avaliar a associação entre SNP e o desenvolvimento de lesão pulmonar aguda.	Européia	10	AA 2	20	Diminuição da expressão gênica de Nrf2 nos indivíduos com polimorfismo.	Marzec <i>et al.</i> , 2007
	Afro-descendente	10	AA 1	10		
	Norte americana	10	AA 5	50		
	Asiática	10	AA 4	40		
Avaliar a associação entre o SNP e o surgimento de asma na infância.	Crianças – México	600	CC 354 CA 216 AA 36	24	Não foi encontrada associação entre o SNP e o surgimento de asma na infância	Cordóva <i>et al.</i> , 2011
Avaliar a associação entre o SNP e a função vascular (resistência vascular no antebraço).	Afro-americana	64	CC 62 CA 02 AA 00	3	Houve estatisticamente associação significativa, apenas na população caucasiana.	Marczak <i>et al.</i> , 2012
	Caucasiano	184	CC 144 CA 38 AA 02	22		
Avaliar a relação entre SNP e dieta antioxidante.	Homens – Áustria	18	CC 11 CA 05 AA 01	33	Menor expressão gênica de Nrf2 em indivíduos com SNP	Boettler <i>et al.</i> , 2012

OBJETIVOS

Geral:

Avaliar a influência dos polimorfismos Pro198Leu no gene da glutathione peroxidase 1 e -617C/A no gene do fator de transcrição Nrf2 sobre o estado nutricional relativo ao selênio e marcadores do estresse oxidativo de pacientes com diabetes mellitus tipo 1.

Específicos:

- Determinar a frequência dos SNPs Pro198Leu no gene da GPx1 e -617 C/A na região promotora do gene do fator de transcrição Nrf2, nos grupos diabetes mellitus 1 (DM1) e grupo controle (GC);
- Avaliar o estado nutricional relativo ao selênio por meio da ingestão alimentar e dos parâmetros bioquímicos do status de selênio dos grupos avaliados;
- Avaliar marcadores de estresse oxidativo e parâmetros glicêmicos dos grupos estudados;
- Comparar todas as variáveis avaliadas de acordo com a presença dos alelos variantes dos SNPs Pro198Leu e -617 C/A na região promotora do fator de transcrição Nrf2 nos grupos DM1 e GC;
- Determinar a influência da presença dos SNPs estudados sobre a expressão gênica da GPx1

4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados 77 pacientes com DM1, de ambos os sexos, com idade entre 10 e 19 anos, voluntários, que fazem acompanhamento clínico no setor de endocrinologia do Hospital da Clinicas e para compor o grupo controle, foram selecionados 74 participantes, sem relatos de doença e da mesma faixa etária do grupo de pacientes DM1.

Foi aplicado um questionário, para obter informações socioeconômicas, antecedentes familiares para doenças crônicas não comunicáveis, uso de medicamentos e presença de outras doenças (ANEXO 1). A seleção dos participantes seguiu os seguintes critérios de inclusão: presença de diabetes *mellitus* tipo 1 e faixa etária acima citada, considerando, ainda, os seguintes fatores de exclusão: presença de doenças que interfiram no estado nutricional dos indivíduos em relação ao selênio (artrite reumatoide, câncer, insuficiência renal crônica e disfunções da tireoide); e utilização de suplementos vitamínico-mineral.

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

Os participantes e/ou responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 2), que descreve as informações sobre o projeto, de acordo com a Resolução CNS nº 196/96, itens III, IV e V, que tratam da proteção dos participantes e orienta procedimentos referentes às pesquisas que necessitam experiências com humanos.

Este estudo foi submetido e aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. CAAE: 10951313.7.0000.0067 / Parecer: 353.246/2013 (ANEXO 3).

4.1 Protocolo Experimental

Este é um estudo caso/controle. Foram constituídos dois grupos experimentais: um de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e um grupo controle de indivíduos que relataram a ausência de doenças.

Todos foram submetidos a uma coleta de urina e sangue, esta última foi realizada por um técnico especializado. Foram realizadas aferições de peso, estatura e circunferência da cintura para avaliação antropométrica e bioimpedância para avaliar a composição corporal (ANEXO 4). Também foram coletadas informações sobre a ingestão alimentar por meio de registro alimentar de 3 dias, sendo 1 dia de final de semana (ANEXO 5).

O material biológico foi utilizado para avaliar o estado nutricional dos indivíduos relativo ao selênio, marcadores glicêmicos e lipídicos, marcadores de estresse oxidativo e foram determinados os polimorfismos Pro198Leu no gene da enzima GPx1 e -617C/A no gene do fator de transcrição Nrf2 e da expressão gênica da GPx1 (Figura 9).

4.2 Avaliação Antropométrica

4.2.1 Peso

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

4.2.2 Estatura

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

Estudo dos polimorfismos Pro198Leu no gene da glutathiona peroxidase 1 e -617C/A no gene do fator de transcrição Nrf2 com relação ao estresse oxidativo e ao estado nutricional de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 relativo ao selênio

Procedimentos éticos: Pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
CAAE: 10951313.7.0000.0067/Parecer: 353.246/2013

Seleção dos participantes

Figura 9. Fluxograma de atividades desenvolvidas.

Legenda: Se: selênio; HbA_{1c}: hemoglobina glicada; MDA: malondialdeído; SOD: superóxido dismutase; GPx: glutathiona peroxidase.

4.2.3 Índice de massa corpórea

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

4.2.4 Circunferência da cintura

A circunferência da cintura foi aferida com o paciente em pé, com os pés juntos e braços estendidos, utilizando uma fita métrica não extensível. A mesma circundou o indivíduo no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca. A leitura foi feita no momento da expiração e os resultados foram analisados de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS, 1998).

4.2.5 Impedância bioelétrica

A avaliação antropométrica foi realizada no dia da coleta de sangue. Foi orientado a todos os participantes para que no dia anterior a avaliação, não fosse ingerido café, chás, refrigerantes à base de cola e bebida alcoólica e que não realizassem atividade física. As meninas foram orientadas a não realizarem o exame enquanto estivessem no período menstrual. Para esta determinação os indivíduos ficaram deitados, em decúbito dorsal, com as pernas e os braços ligeiramente afastados do corpo. Foram colocados os dois eletrodos (um distal e outro proximal) no pé direito: o eletrodo distal na base de dedo médio e o eletrodo proximal um pouco acima da linha da articulação do tornozelo, entre os maléolos medial e lateral da tíbia; e na mão direita: o eletrodo distal na base do dedo médio e o eletrodo proximal um pouco acima da linha da articulação do punho, coincidindo com o processo estiloide.

4.3 Avaliação da ingestão alimentar

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

A análise dos alimentos consumidos pelos participantes da pesquisa, foi feita por meio do *software* NutWin, do Departamento de Informática da Escola Paulista de Medicina/UNIFESP. A este *software* foi acrescentado a concentração de selênio de alimentos produzidos no Brasil, tanto do estudo de Ferreira e colaboradores (2002), quanto de dados produzidos no Laboratório de Nutrição e Minerais/FCF/USP.

A adequação das dietas foi realizada por meio das DRIs de 2001 (IOM, 2001), considerando os macronutrientes e selênio. Além disso, foi calculado o valor de necessidade estimada de energia (EER - *Estimated Energy Requirement*) para obter a adequação energética das dietas dos participantes. As fórmulas que foram utilizadas para cada fase de desenvolvimento e gênero constam abaixo.

Feminino

9 – 18 anos de idade

$$\text{EER (kcal)} = 135,3 - (30,8 \times \text{idade [anos]}) + \text{coeficiente de atividade física} \times (10,0 \times \text{peso [kg]} + 934 \times \text{estatura [m]}) + 25 \text{ kcal de depósito}$$

≥ 19 anos

$$\text{EER (kcal)} = 354 - (6,91 \times \text{idade [anos]}) + \text{coeficiente de atividade} \times (9,36 \times \text{peso [kg]} + 726 \times \text{estatura [m]})$$

Masculino

9 – 18 anos de idade

$$\text{EER (kcal)} = 88,5 - 61,9 \times \text{idade (anos)} + \text{coeficiente de atividade física} \times [26,7 \times \text{peso (kg)} + 903 \times \text{estatura (m)}] + 25 \text{ kcal de depósito.}$$

≥ 19 anos

$$\text{EER (kcal)} = 662 - (9,53 \times \text{idade (anos)}) + \text{coeficiente de atividade física} \times [(15,91 \times \text{peso (kg)}) + (539,6 \times \text{estatura (m)})]$$

4.4 Controle de contaminação

Todo o material utilizado (vidrarias, plásticos, ponteiras, tubos, etc.) para análises de selênio foi desmineralizado em banho de ácido nítrico a 20%, pelo período mínimo de 12 horas, e enxaguados pelo menos 10 vezes consecutivas com água nanopura, minimizando assim o risco de contaminação por minerais.

O material utilizado nas demais determinações foi esterilizado e livre de *RNase*.

4.5 Coleta dos materiais biológicos

4.5.1 Sangue

Amostras de 15 mL de sangue foram colhidas no período da manhã, estando os participantes em jejum de 8 à 10h. Essas amostras foram destinadas à análise de selênio, marcadores glicêmicos e de estresse oxidativo, perfil lipídico, polimorfismos e expressão gênica, avaliados neste estudo. Após a coleta, o plasma foi separado do sangue total por centrifugação a 3500 rpm durante 15 minutos a 4°C, e acondicionado em microtubos de polipropileno, sendo a seguir armazenados a -80°C para posterior análise.

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

4.5.2 Urina de 24 horas

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

4.6 Parâmetros bioquímicos

4.6.1 Determinação de selênio no plasma, nos eritrócitos e na urina

As amostras de plasma, eritrócitos e urina foram primeiramente digeridas por via úmida ácida, ou seja, nos tubos de vidro contendo as amostras foram adicionados 5 mL de ácido nítrico 68% P.A. (MERCK®) e mantidos em repouso de 12 horas. Em seguida a digestão foi realizada em bloco digestor com temperatura inicial de 50°C que foi aumentada gradativamente até alcançar, no máximo, 150°C, a fim de eliminar as substâncias orgânicas. A seguir foram acrescidos 5 mL de HCL 1,2 N para reduzir o selênio presente na forma VI para forma IV, e as amostras ficaram sob aquecimento por duas horas à temperatura de 100°C. Após este procedimento essas soluções foram diluídas para 25 mL com água deionizada e submetidas a leitura de selênio, por meio do método de espectrometria de absorção atômica por geração de hidretos acoplados a cela de quartzo (HGQTAAS) (modelo Z5000, Hitachi, Tokio, Japão) (HAO *et al.*, 1996; SABÉ; RUBIO; GARCÍA-BELTRÁN, 2000; ROMERO *et al.*, 2001). Os resultados foram expressos em µg/L.

4.6.2 Determinações dos parâmetros glicêmicos

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

4.6.3 Determinação da atividade enzimática

4.6.3.1 Glutathiona peroxidase

A atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx) foi determinada no sangue total e nos eritrócitos. Esta análise foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Paglia & Valentine (1967), em um analisador bioquímico Labmax 240, usando kit disponível comercialmente (Ransel; Randox Laboratories, UK). Essa técnica baseia-se na oxidação da glutathiona pelo peróxido de hidrogênio. Na presença da glutathiona redutase e NADH, a glutathiona oxidada é imediatamente convertida a forma reduzida com concomitante oxidação de NADH (reduzindo NADPH

a NADH⁺). Também foi determinada a concentração de hemoglobina, uma vez que a atividade da enzima foi expressa em U/g de hemoglobina.

4.6.3.2 Superóxido dismutase

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

4.6.4 Determinação da concentração de malondialdeído (MDA)

Para a análise da concentração de MDA, alíquotas de 100 µL de plasma foram hidrolisadas para liberação do MDA ligado a proteínas através da adição de 10 µL de NaOH 4M com subsequente incubação a 60 °C por 30 minutos sob agitação de 100rpm. Ao término da incubação, 150 µL de H₂SO₄ 1% (v/v) foram adicionados e as amostras foram submetidas à vigorosa agitação por 20 segundos com posterior centrifugação a 9.300 g por 10 min. Após a centrifugação, 175 µL do sobrenadante foram coletados e incubados com 25 µL de uma solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH, 1 mg/mL em HCl 2M). A reação de derivatização ocorreu em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 30 minutos. Alíquotas de 100 µL foram injetadas em um sistema de HPLC-UV.

4.6.5 Concentração de isoprostanos (8-iso PGF₂α)

A concentração de 8-iso PGF₂α na urina utilizando o kit 8-isoprostane EIA[®] foi analisado (Cayman Chemical Co) por ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), conforme o protocolo de análise fornecido pelo fabricante. A leitura das placas foi realizada em leitor de microplacas (SpectraMax190, Molecular Devices) com comprimento de onda de 410nm. Também foi determinada a concentração de creatinina, uma vez que os resultados foram calculados em ng/mmol creatinina.

4.7 Determinação do polimorfismo Pro198Leu no gene da GPx1 (rs1050450) e -617A/C na região promotora do gene do fator de transcrição Nrf2 (rs6721961)

Primeiramente, foi realizada a extração de DNA com o kit PureLink[™] – Genomic DNA Mini Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. Então, foi feita a quantificação da concentração de DNA por meio de leitura em espectrofotômetro (Nanodrop[®]). Os resultados foram obtidos em ng/μL. A genotipagem dos participantes em relação aos polimorfismos Pro198Leu no gene da GPx1 e -617A/C na região promotora do gene do fator de transcrição Nrf2, foi feita pelo sistema *TaqMan SNP Genotyping Assays* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), conforme as instruções do fabricante. Este sistema é baseado na análise *end-point* da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) com *primers* e sondas específicas para cada SNP. Estas análises foram realizadas, em placas específicas de 96 poços no equipamento *StepOne System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Foram repetidas 60% das amostras, afim de confirmação dos resultados.

4.8 Avaliação da expressão gênica da GPx 1

A extração do mRNA foi realizada com o kit RiboPure[™] – Blood Kit (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante. Após a extração do RNA, este foi tratado com DNase I a fim de remover eventual contaminação com DNA genômico. Em seguida foi feita a quantificação por meio de leitura no espectrofotômetro

(Nanodrop) nos comprimentos de onda (λ) de 260nm (RNA) e 280nm (proteína). O grau de pureza das amostras foi avaliado através da relação das leituras 260 e 280nm, sendo considerados ideais os valores entre 1,8 e 2,0. Os resultados foram obtidos em ng/ μ L onde o valor de densidade ótica (DO) igual a 1, no comprimento de onda de 260 nm, corresponderá a 40 μ g de RNA (SAMBROOK, 1989).

A transcrição reversa do RNA total para cDNA foi realizada utilizando a enzima transcriptase reversa Super-script IITM Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As reações de PCR em tempo real (qRT-PCR) foram realizadas em triplicata, em placas específicas de 96 poços no equipamento *StepOne System*, usando o sistema para detecção de produtos de amplificação “TaqMan Gene Expression Master Mix” (Applied Biosystems, USA). O gene de referência (endógeno) utilizado na reação foi RPS 13. Foram selecionados *primers* e sondas marcadas com fluoróforo FAM para todos os genes de acordo com os ensaios disponibilizados pela Applied Biosystems, conforme **Tabela 1** (www.appliedbiosystems.com.br).

No momento em que ocorre a amplificação, de maneira exponencial, é gerado o parâmetro ciclo, denominado *threshold* (Ct). Para cada amostra de cDNA, o Ct de cada gene é registrado e comparado com o gene do RPS13, utilizado como controle endógeno.

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

Identificação	Gene
Hs00829989_gH	GPX1
Hs01011487_g1	RPS13

Os valores obtidos do Ct nos ensaios foram utilizados para determinar a expressão relativa de mRNA de cada gene alv em relação ao controle endógeno, por meio da reação Delta Ct (Δ Ct):

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

Em seguida os resultados foram transformados em escala logarítmica ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

4.9 Avaliação estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Para comparar as variáveis de resposta do grupo controle (n=74) com os diabéticos (n=77), inicialmente as variâncias foram checadas pelo teste F, sendo que diferenças entre os valores médios foram avaliadas pelo teste t-*Student* para amostras independentes ou teste de *Mann-Whitney*, dependendo da distribuição dos dados e/ou homoscedasticidade. Valores de probabilidade abaixo de 5% foram adotados para rejeitar a hipótese de nulidade.

Os valores da ingestão de selênio foram ajustados pelo valor energético da dieta, segundo o método residual proposto por *Willet* (1998). Para isto, os valores de ingestão de selênio obtidos pelos registros alimentares foram testados quanto a sua distribuição normal por meio do teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Em seguida, a correlação linear de Pearson foi utilizada para verificar se há correlação estatisticamente significativa entre os valores de ingestão de selênio com a energia.

Procedeu-se com testes de regressão linear simples, considerando a energia como variável independente e o valor da ingestão de selênio como variável dependente. A partir desta análise foram obtidos os valores β_0 e β_1 , os quais foram utilizados para determinar os valores dos nutrientes estimados, residuais, constantes, e por fim, ajustados, respectivamente. Ao final, a média dos valores de ingestão dos nutrientes deve ser igual tanto em suas formas ajustadas quanto em suas formas brutas.

Para comparar as variáveis de resposta de cada grupo de pacientes com polimorfismo GPx, inicialmente as variâncias foram checadas pelo teste de *Brown-Forsythe*, sendo que diferenças entre os valores médios foram avaliadas pela análise de variâncias (ANOVA) unifatorial ou pelo teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis* (dados que não seguem distribuição normal), ao passo que diferenças de médias foram avaliadas pelo teste de *Fisher* ou pelo teste de comparação múltipla de *Kruskal-Wallis*. Valores de probabilidade abaixo de 5% foram adotados para rejeitar a hipótese de nulidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização social, clínica e de composição corporal dos participantes

Durante o processo de seleção foram convidados 195 participantes, sendo 98 do grupo DM1 e 97 do GC. Após a avaliação dos critérios de inclusão, foram selecionados 77 pacientes do grupo DM1, com média de idade 15,6 anos e tempo médio de diagnóstico da doença de 7,1 anos. Para o GC, 74 participantes com média de idade de 13,4 anos, sem relato de qualquer DCNC ou autoimune foram incluídos no estudo.

Ao caracterizar os participantes do estudo quanto os aspectos sociais, estes apresentavam renda familiar entre 2 e 5 salários mínimos e nível de escolaridade correspondente à faixa escolar para a idade. A prática de atividade física foi referida em 64% dos participantes do grupo DM1 e 73% do GC.

Os resultados de caracterização dos participantes se encontram na **Tabela 2**.

Tabela 2. Características clínicas e de composição corporal dos participantes dos grupos DM1 e GC. São Paulo, 2014.

Características	DM1 (n=78)	GC (n=74)	P
Idade (anos)	15,9 ± 4,1	13,4 ± 2,1	<0.001**
Gênero (feminino/masculino)*	(58/42)	(65/35)	
Tempo de diagnóstico (anos)	7,3 ± 4,9	-	
Peso (kg)	53,9 ± 14,1	49,7 ± 12,3	0,051
Estatura (cm)	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1	0,556
IMC (kg/m ²)	21,0 ± 3,9	19,7 ± 3,1	0,215
% Gordura corporal	26,5 ± 9,7	26,5 ± 7,1	0,085
Circunferência da cintura (cm)	72,1 ± 10,6	67,3 ± 7,9	0,282

Resultados apresentados em média ± desvio-padrão; * Frequência relativa (%).

Legenda: DM1: Diabetes *mellitus* tipo 1; CG: grupo controle; IMC: índice de massa corpórea.

**Diferença estatística significativa (p<0,001).

A distribuição percentual dos participantes avaliados em relação aos pontos de corte para IMC segundo a OMS, está apresentada na **Figura 10**.

Figura 10. Distribuição percentual de participantes segundo classificação de IMC proposta pela OMS (2007). São Paulo, 2014.

Legenda: DM1: Diabetes *mellitus* tipo 1; GC: Grupo controle. São Paulo, 2014.

Ao avaliar os participantes do estudo quanto ao estado nutricional, verificou-se que aproximadamente 15% dos participantes do grupo DM1 se encontravam com sobrepeso ou obesidade. Este resultado se assemelha a outros estudos, os quais observaram percentual de sobrepeso e obesidade de 16% (LIBERATORE JUNIOR *et al.*, 2008) e 23,9% (MORAES *et al.*, 2003) entre os pacientes com DM1.

O excesso de peso não é uma característica clínica comum dessa doença, principalmente em seu estágio inicial. Contudo, este quadro vem mudando nas últimas décadas, possivelmente por reflexo da tendência mundial de aumento de peso (ARCANJO *et al.*, 2005). Este aspecto foi observado em um estudo brasileiro, no qual a prevalência de sobrepeso em adolescentes com DM1 foi 45,5% (FERREIRA E FERREIRA, 2009). A obesidade e sobrepeso nestes pacientes implicam em maior necessidade de insulina, além de associar-se ao mau controle metabólico, à maior carga aterosclerótica e ao aumento de hospitalização por insuficiência cardíaca (CHILLARÓN *et al.*, 2014).

Por estes motivos, é necessária maior atenção no controle de peso desses pacientes, uma vez que possuem risco aumentado de desenvolver doenças cardiovasculares (ARCANJO *et al.*, 2005).

Não houve diferença do IMC entre os grupos, e mais de 75% dos participantes apresentaram IMC adequado para a idade. No entanto, o percentual de gordura estava acima do adotado para a população, que é 25% para meninas e 20% para os meninos (SIGULEM; VEIGA; PRIORE, 1995). Quanto a avaliação da circunferência da cintura, os participantes estavam abaixo dos pontos de corte ideais para a redução do risco de desenvolver doenças cardiometabólicas (TAYLOR, 2000).

5.2 Avaliação da ingestão alimentar

O *Institute of Medicine* (IOM) (2000), por meio das DRIs, recomenda que a distribuição do valor energético total entre carboidratos, proteínas e lipídios seja de 45 a 65%, 10 a 35% e 20 a 35%, respectivamente. Por sua vez, a recomendação de ingestão de selênio é de 35 µg/dia para faixa etária de 9 a 13 anos e de 45 µg/dia para faixa de idade de 14 a 19 anos. A partir dos registros alimentares de três dias, calculou-se a ingestão de macronutrientes e de selênio dos grupos DM1 e GC, conforme apresentada na **Tabela 3**. Contudo, deve-se destacar que 10,4% (n=7) e 24,4% (n=10) dos grupos DM1 e GC, respectivamente, não entregaram os registros.

Tabela 3. Valores de ingestão de energia, macronutrientes e selênio, pelos participantes dos grupos DM1 e GC. São Paulo, 2014.

Energia e Nutrientes	Grupo DM1 (n=70)	GC (n=64)	p*
Energia (kcal/dia)	1614,9 ± 517,7	1382,1 ± 461,6	0,578
Carboidratos (%)	55,3 ± 8,1	50,7 ± 6,0	0,000
Proteínas (%)	19,7 ± 4,6	18,7 ± 5,8	0,353
Lipídios (%)	25,6 ± 6,3	30,5 ± 4,9	0,000
Selênio (µg/dia)	29,3 ± 10,6	23,9 ± 9,4	0,009

Legenda: DM1: Diabetes *mellitus* tipo 1; DP: Desvio-padrão

Dados apresentados em média ± desvio-padrão; * Diferença estatística significativa (p<0,05).

Na **Figura 11** está apresentado o percentual de adequação energética das dietas dos grupos DM1 e GC.

Figura 11. Distribuição percentual dos participantes de acordo com a adequação energética das dietas consumidas, segundo os valores propostos pelo IOM (2000). São Paulo, 2014. Legenda: DM1: diabetes mellitus tipo 1; GC: Grupo controle; IOM: *Institute of Medicine*. *n=70. **n=56.

Ao comparar o valor energético total (VET) com a Necessidade Energética Estimada (*Estimated Energy Requirement* - EER) dos dois grupos estudados, verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$). Estes dados estão apresentados na **Figura 12**.

Figura 12. Média do valor energético total (VET) e da EER segundo IOM (2003). São Paulo, 2014. Legenda: DM1: Diabetes mellitus 1; GC: grupo controle; EER (*Estimated Energy Requirement* – necessidade energética estimada); VET: valor energético total; *diferença significativa entre VET e EER em ambos os grupos: p -valor $< 0,05$

Ao avaliar a ingestão dos macronutrientes, observou-se adequação superior a 77% na distribuição percentual de contribuição energética proposta pela IOM. Esses resultados estão apresentados na **Figura 13**.

Figura 13. Distribuição percentual de participantes segundo a contribuição energética de macronutrientes, conforme proposto pelo *Institute of Medicine* (IOM, 2001). São Paulo, 2014. Legenda: DM1: Diabetes *mellitus* tipo 1; GC: Grupo controle; CHO: Carboidratos; LIP: Lipídeos; PTN: Proteína.

Não foi encontrada correlação entre o VET, parâmetros glicêmicos e perfil lipídico, semelhante ao encontrado por Kamada e colaboradores (2012) ao avaliarem adolescentes com DM1. No entanto, observaram correlação inversamente proporcional entre a ingestão de carboidrato e lipídeos e proteínas. No presente estudo, também foi encontrada tal correlação (p -valor $<0,05$), estes dados estão apresentados na **Figura 14**.

Figura 14. Correlação entre a ingestão de carboidratos, lipídeos e proteína do grupo DM1. São Paulo, 2014.

Legenda: Carboidratos e proteína: $r= 0,4812$, $p=0,000$ e carboidratos e lipídeos: $r=0,4581$; $p=0,000$. Diferença estatística significativa $p<0,05$.

Quanto a ingestão de selênio, na **Figura 15** está apresentada a distribuição dos participantes segundo os valores de selênio ingerido comparados à EAR. No grupo DM1, apenas 7,4% dos participantes com idade entre 9 e 13 anos, atingiram a recomendação de 35 μg Se/dia. Em relação aos participantes com idade acima de 14 anos, não foi observada ingestão de selênio acima do valor recomendado (45 μg Se/dia).

Figura 15. Distribuição dos participantes dos grupos DM1 e GC, conforme a EAR para selênio segundo a idade. São Paulo, 2014.

Legenda: Se: selênio; DM1: Diabetes *mellitus* tipo 1; GC: Grupo controle; EAR: necessidade média estimada; €: EAR para idade de 9 a 13 anos; §: EAR para a idade de 14 a 19 anos.

5.3 Avaliação do estado nutricional relativo ao selênio

O estado nutricional dos indivíduos relativo ao selênio pode ser avaliado por meio da concentração de selênio em diversos tecidos e fluidos biológicos, como sangue, cabelo, unhas e urina (NÈVE, 1991; SHEENAN; HALLS, 1999). Neste estudo, foi avaliado no plasma, eritrócitos e urina, nos grupos DM1 e GC. Na **Tabela 4**, estão apresentados os resultados relativos a essa avaliação.

O biomarcador mais acessível e utilizado para avaliar o *status* de selênio é a concentração plasmática deste mineral, por ser sensível a alterações na ingestão e concentração de selênio em curto prazo. No entanto, fatores como a forma do selênio ingerido, estado fisiológico e idade, podem influenciar essa avaliação (ASHTON *et al.*, 2009; NÈVE, 1991; THOMSON, 2004; VAN DAEL; DEELSTRA, 1993).

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos de avaliação do *status* de selênio dos participantes dos grupos DM1 e GC. São Paulo, 2014.

Selênio ($\mu\text{g Se/L}$)	DM1 (n=77)	GC (n=74)	p*
Plasma	52,54 $\pm$ 12,9	42,5 $\pm$ 11,6	0,000*
Eritrócitos	59,65 $\pm$ 25,6	57,5 $\pm$ 11,6	0,283
Urina	7,5 $\pm$ 4,6**	7,7 $\pm$ 4,3***	0,557

Legenda: Se: Selênio; DM1: Diabetes *mellitus* tipo 1; GC: Grupo Controle

Dados apresentados em média $\pm$ desvio-padrão; * Diferença significativa entre os grupos (p-valor<0,05); **n=69; ***n=51.

Valores de referência: Se plasmático: 60-120 $\mu\text{g/L}$; Se eritrocitário: 90-190 $\mu\text{g/L}$; Se Urinário: dados não disponíveis (VAN DAEL E DEELSTRA, 1993).

Há diferentes valores de referência propostos para avaliar a concentração de selênio no plasma. Van Dael e Deelstra (1993) propuseram intervalo de 60 a 120 $\mu\text{g/L}$. Enquanto que Alegria e colaboradores (1996) propuseram intervalo de 53 a 109 $\mu\text{g/L}$. Ainda Nève (1995) ao avaliar os efeitos da suplementação com diferentes formas de selênio propôs 70 $\mu\text{g/L}$ como a concentração mínima adequada para melhor disponibilidade deste mineral no organismo e prevenção de doenças.

No entanto, para Thomson (2004), não há intervalo de referência único estabelecido, principalmente pelas variações do estado nutricional de cada indivíduo relativo ao selênio, devido diferenças de idade, estilo de vida, alimentação, região onde vive. Sendo assim, após ampla avaliação de estudos, este autor reuniu e propôs valores de adequação da concentração de selênio no plasma para prevenção de doenças e otimização da atividade de selenoenzimas. A concentração mínima de selênio no plasma no valor de 21 $\mu\text{g/L}$, foi proposta para prevenção da doença de Keshan e a concentração plasmática maior que 115 $\mu\text{g/L}$ para prevenção de alguns tipos de câncer. Já para otimização da atividade de enzimas, foi proposto valor maior que 65 $\mu\text{g/L}$ para as deiodinases e o intervalo entre 80 e 95 $\mu\text{g/L}$ para as enzimas GPx e selenoproteína P.

Embora a concentração de selênio plasmático de ambos os grupos deste estudo, estejam abaixo das faixas de recomendação acima mencionadas, são superiores aos valores reconhecidos como de risco para desenvolver sintomas de deficiência e a doença de Keshan. A concentração de selênio plasmático no grupo DM1 foi significativamente maior ($p<0,05$), quando comparado ao grupo controle, possivelmente porque apresentou maior ingestão deste mineral ($p=0,009$). A distribuição dos participantes de acordo com a concentração de selênio plasmático se encontra na **Figura 16**.

Figura 16. Distribuição dos participantes dos grupos DM1 e GC, segundo a concentração de selênio no plasma. São Paulo, 2014.

Legenda: DM1: diabetes mellitus tipo 1; GC: grupo controle.

€: Intervalo de referência de 60 a 120 µg/L (VANDAEL; DEELSTRA, 1993).

§: Intervalo para otimização da atividade da GPx (THOMSON, 2004)

¥: Concentração mínima para prevenção do desenvolvimento da doença de Keshan (THOMSON, 2004).

Pires (2012) ao avaliar a concentração de selênio no plasma de pacientes com diabetes *mellito* tipo 1, verificou que estes encontravam-se deficientes. Esses resultados corroboraram com a ingestão de selênio abaixo da necessidade média estimada (EAR) para as faixas etárias estudadas.

Estudos que relacionam selênio e diabetes são escassos na literatura, principalmente com DM1. Um estudo mostrou associação inversa entre a concentração de selênio nas unhas e prevalência de diabetes (RAJPATHAK *et al.*, 2005). Ruiz e colaboradores (1998) encontraram maior concentração de selênio plasmático no grupo controle ao comparar com os pacientes com DM1. No entanto Bleys e colaboradores (2007) encontraram resultados semelhantes ao do presente estudo, no qual os participantes com DM apresentavam concentração de selênio plasmático superior ao do grupo controle.

Alguns estudos brasileiros que avaliaram a concentração de selênio plasmático em outros grupos específicos da população brasileira, encontraram valores abaixo dos pontos de corte estabelecidos. Almondes e colaboradores (2013) encontraram concentração de 44,4 µg/L e 48 µg/L de selênio no plasma em crianças e adolescentes com leucemia linfóide aguda e grupo controle, respectivamente. Outros estudos encontraram concentração média de selênio no plasma de 37,2 µg/L (CARDOSO *et al.*, 2012) e 57,3 µg/L (COMINETTI, 2012).

Outros estudos avaliaram a concentração de selênio no plasma de indivíduos saudáveis, como a metanálise de estudos das regiões de Bruxelas e Flandres, na Bélgica, retratando a variação média da concentração de selênio no plasma de 83 a 97 µg/L (CAUWENBERG *et al.*, 2004).

Em uma região endêmica da doença de Keshan na China, encontraram-se valores médios de selênio plasmático de 21 e 23 µg/L, em homens e mulheres, respectivamente (XIA *et al.*, 2005).

A avaliação de indivíduos saudáveis que compunham grupos controle em estudos com doenças cardiovasculares em diversos países encontraram valores médios de selênio plasmático de 52,5 µg/L, na Polônia (ZACHARA *et al.*, 2001); 82,2 µg/L na Turquia (BOR *et al.*, 1999) e 85,2 µg/L na França (COUDRAY *et al.*, 1997). Já nos Estados Unidos, Combs e colaboradores (2011) observaram concentração média de 142 µg Se/L no plasma em indivíduos saudáveis.

Assim como para selênio no plasma, há diferentes valores de referência para concentração de selênio nos eritrócitos. Van Dael e Deelstra (1993) propuseram o intervalo de 90 a 190 µg/L, enquanto Ortuño (1997) sugeriu intervalo de 60 a 120 µg/L.

Esse parâmetro é mais utilizado para avaliar mudanças do estado nutricional de indivíduos em longo prazo, por estar relacionado com a meia vida dos eritrócitos (ALFTHAN *et al.*, 1991; NÈVE, 1991; VANDAELE; DEELSTRA, 1993).

No estudo de Pires (2012), a avaliação do *status* de selênio em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 também se apresentou deficiente, assim como encontrado na avaliação da concentração desse mineral no plasma.

Um estudo que avaliou indivíduos saudáveis na região de Granada, na Espanha, encontrou concentração média de 104,6 $\mu\text{g Se/L}$ nos eritrócitos (ADAME, 2012). Em outro estudo com indivíduos saudáveis, residentes em área de solo rico em selênio na China, a concentração média de selênio nos eritrócitos foi de 131,1 $\mu\text{g/L}$ (KO *et al.*, 2005).

No presente estudo não foi observada diferença significativa da concentração de selênio eritrocitário, entre os grupos DM1 e GC, conforme foi apresentado na **Tabela 4**. A distribuição dos participantes de acordo com a concentração de selênio nos eritrócitos esta apresentada na **Figura 17**.

Figura 17. Distribuição dos participantes dos grupos DM1 e GC de acordo com a concentração de selênio nos eritrócitos. São Paulo, 2014.

Legenda: DM1: diabetes *mellitus* tipo 1; GC: grupo controle; §: faixa de referência segundo Van Dael e Deelstra (1993): 90 – 190 $\mu\text{g/L}$.

5.4 Parâmetros bioquímicos glicêmicos e perfil lipídico

A avaliação dos marcadores glicêmicos foi realizada por meio da concentração de glicose sérica e percentual de HbA_{1c}, e o perfil lipídico foi avaliado por meio da concentração de sérica de CT, HDL colesterol, LDL colesterol e triglicerídeos, dados apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Parâmetros glicêmicos e perfil lipídico dos participantes dos grupos DM1 e GC. São Paulo, 2014.

Características	DM1 (n=78)	GC (n=74)	*p
Glicose sérica (mg/dL)	207,3 ± 105,0	81,8 ± 10,4	0,000
Hemoglobina glicada (%)	9,9 ± 2,4	4,4 ± 0,7	0,000
Colesterol total (mg/dL)	159,7 ± 39,6	150,0 ± 28,2	0,000
HDL colesterol (mg/dL)	47,2 ± 11,2	44,8 ± 9,7	0,000
LDL colesterol (mg/dL)	95,9 ± 36,2	89,8 ± 21,0	0,000
Triglicerídeos (mg/dL)	87,7 ± 74,2	76,7 ± 41,6	0,000

Legenda: DM1: Diabetes *mellitus* tipo 1; GC: Grupo Controle

Dados apresentados em média ± desvio-padrão; * Diferença significativa (p<0,05).

Embora as altas concentrações de glicose sérica e HbA_{1c} sejam características do diabetes, esses parâmetros necessitam de controle adequado, porque estão relacionados ao pior prognóstico, devido estes parâmetros estarem relacionados com o aumento de estresse oxidativo e complicações micro e macrovasculares, como mencionado anteriormente.

Conforme esperado, a concentração de glicose sérica e o percentual de hemoglobina glicada (HbA_{1c}) apresentaram diferença significativa entre os grupos (p<0,05). Apesar de realizarem o controle glicêmico, os parâmetros glicêmicos são difíceis de serem normalizados em pacientes com diabetes (INTERNATIONAL EXPERT COMMITTEE, 2009; ADA, 2014). Outros estudos que avaliaram índices glicêmicos de adolescentes com DM1 encontraram valores de HbA_{1c} de 10,9 % (DIAS *et al.*, 2013); 7,7% (JUNIOR LIBERATORE *et al.*, 2008); e 9% (GABBAY *et al.*, 2004)

O alto percentual de HbA_{1c} está relacionado com o risco elevado de desenvolver doença cardiovascular, podendo progredir à óbito, devido à instabilidade microvascular proporcionada (NICHOLS; GOTLIB; SHREEKANT PARASURAMAN, 2013; UKPDS, 1998).

Estudos *in vitro* observaram o efeito do selênio sobre a redução de HbA_{1c} e de glicose. Contudo esse efeito anti-diabético do selênio, só foi observado em altas concentrações, tóxicas ao ser humano (STEINBRENNER *et al.* 2011; MUELLER *et al.*, 2009; HEI *et al.*, 1998; EZAKI, 1990). E o mecanismo que está envolvido nesse efeito está relacionado com a capacidade do selênio de atuar em reações oxidativas, como composto insulino-mimético ativando a proteína Akt e quinases envolvidas na cascata de sinalização da insulina (STEINBRENNER *et al.*, 2011). Neste estudo não foi encontrada correlação entre o *status* de selênio e os parâmetros glicêmicos avaliados.

A relação entre as concentrações de lipoproteínas e selênio ainda não está bem estabelecida. No entanto, estudos propõem que o selênio pode exercer importante papel no metabolismo das lipoproteínas. Ao avaliarem 5452 indivíduos, Bleys e colaboradores (2008) observaram correlação diretamente proporcional entre elevadas concentrações de selênio sérico e altas concentrações de CT, LDL-c, HDL-c e triglicerídeos.

De maneira semelhante outro estudo avaliou 1159 indivíduos e observaram correlação positiva entre as concentrações de selênio e as concentrações de CT, e LDL-c. Porém foi observada correlação inversa entre as concentrações de selênio e HDL-c (LACLAUSTRA *et al.* 2010).

Resultados diferentes foram encontrados por Lee, Moon e Chung (2003) que verificaram associação entre as concentrações de selênio plasmático e HDL-c em mulheres adultas.

Neste estudo, no entanto, não foi encontrada correlação entre os parâmetros lipídicos avaliados e o *status* de selênio.

5.5 Atividade das enzimas antioxidantes GPx e SOD

Como descrito anteriormente, a hiperglicemia esta associada à produção de EROs que, em excesso, pode resultar em alteração do sistema *redox*. Nesse estudo,

utilizamos como marcadores a atividade das enzimas GPx e SOD, para avaliar o sistema antioxidante, e a concentração de MDA e 8-isoprostanos como marcadores oxidantes. Os resultados estão apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6. Marcadores bioquímicos do estresse oxidativo dos participantes dos grupos DM1 e GC. São Paulo, 2014.

Parâmetros	DM1 n=77	GC n=74	p*
GPx sangue total (U/g Hb)	42,0 ± 13,0	18,9 ± 4,8	<0,001
GPx nos eritrócitos (U/g Hb)	85,5 ± 26,7	40,2 ± 11,3	<0,001
SOD nos eritrócitos (U/g Hb)	3,3 ± 0,8	1,5 ± 0,3	<0,001
MDA no plasma (µM)	2,7 ± 1,1	1,36 ± 0,3	<0,001
8-isoprostanos na urina (ng/mmol creatinina)	117,1 ± 172,9 [§]	151,2 ± 253,5 [∞]	0,394

Legenda: DM1: diabetes *mellitus* tipo 1; GC: grupo controle; GPx: glutathiona peroxidase; SOD: superóxido dismutase; MDA: malondialdeído [§]n=69; [∞]n=51.

Resultados apresentados como média ± desvio padrão. *p-valor < 0,05

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

A atividade da enzima GPx está relacionada à ingestão e concentração de selênio no organismo. Estudos mostram que a atividade eritrocitária atinge um platô a partir da ingestão diária de 60 a 80 µg/dia de selênio (ALFTHAN *et al.*, 1991; NÈVE, 1991). Não foi encontrada correlação entre a ingestão de selênio e a atividade da GPx, nos grupos DM1 e GC. No entanto, no grupo DM1, foi encontrada correlação entre a atividade da enzima GPx e as concentrações de selênio no plasma e nos eritrócitos, **Figuras 18 e 19**.

A atividade da GPx no sangue total como nos eritrócitos foi significativamente maior no grupo DM1. Assim como a atividade da SOD e a concentração de MDA (p=0,000).

Figura 18. Correlação entre a concentração de selênio nos eritrócitos e a atividade da GPx nos eritrócitos e sangue total, nos grupos DM1 e GC. São Paulo, 2014

Legenda: DM1: diabetes mellitus tipo 1; GC: grupo controle.

DM1: GPx – Eritrócitos $r=0,332$; $p= 0,006$

GC: GPx – Eritrócitos $r= 0,016$; $p=0,942$

DM1: GPx – Sangue total $r=0,379$; $p= 0,002$

GC: GPx – Sangue total $r=0,107$; $p= 0,636$

Figura 19. Correlação entre a concentração de selênio no plasma e a atividade da GPx nos eritrócitos e sangue total, nos grupos DM1 e GC. São Paulo, 2014.

Legenda: DM1: diabetes mellitus tipo 1; GC: grupo controle.

DM1: GPx – Eritrócitos $r= 0,409$; $p=0,001$

GC: GPx – Eritrócitos $r= 0,071$; $p= 0,348$

DM1: GPx – Sangue total $r= 0,443$; $p=0,00$

GC: GPx – Sangue total $r= 0,210$; $p= 0,348$

Diferentemente dos resultados encontrados neste estudo, alguns trabalhos que avaliaram a atividade enzimática no diabetes verificaram menor atividade quando comparado ao grupo controle, como OPRIS; CONSTANTIN; VALUCH (2012), que encontraram valores médios de 47U/g Hb de GPx eritrocitária no grupo de participantes com diabetes, sendo significativamente menores que os valores encontrados no grupo controle (70U/gHb). De maneira semelhante, outro estudo verificou menor atividade desta enzima em pacientes com diabetes (27,1U/g Hb), ao comparar com o grupo controle (29,9U/g Hb) (AYDIN *et al.* 2001). Nobar e colaboradores (1999) também encontraram valores médios da atividade da GPx nos eritrócitos de 31U/g Hb significativamente menor quando comparada ao grupo controle que foi de 38U/g Hb.

No entanto, como o estresse oxidativo no DM é aumentado, espera-se maior atividade enzimática, para suprir a defesa antioxidante. Sendo o dano proteico considerado mais deletério que o lipídico, porque inativa a proteína e é irreversível. Estas células podem ser removidas por proteólise ou contribuem ainda mais para o dano celular e complicações microvasculares. Fathy e colaboradores (2009) encontraram correlação positiva entre o percentual de HbA_{1c} e a concentração de MDA, ao avaliarem crianças e adolescentes com DM1. Resultados semelhantes foram encontrados neste estudo, os dados estão apresentados na **Figura 20**.

Figura 20. Correlação entre os parâmetros glicêmicos avaliados e a concentração de MDA, nos grupos DM1 e GC. São Paulo, 2014.

Legenda: DM1: Diabetes *mellitus* tipo 1; GC: grupo controle.

Diferença estatística $p < 0,05$.

5.6 Determinação dos genótipos Pro198Leu C/T (1050450) no gene da GPx1 e -617C/A (rs6721961) no gene do fator de transcrição Nrf2

Na avaliação do SNP Pro198Leu no gene que codifica para a GPx1, o percentual de distribuição dos participantes segundo os genótipos CC ou Pro/Pro, CT ou Pro/Leu e TT ou Leu/Leu, no grupo DM1 foi de 59,7%, 29,9% e 10,4% e no GC foi 60,8%, 32,4% e 6,8%. Já na avaliação do SNP -617 C/A a distribuição dos participantes segundo os genótipos CC, CA e AA no grupo DM1 foi 71,4%, 27,3% e 1,3% e no GC foi 71,6%, 27% e 2 1,4%. Estes dados estão apresentados na Tabela 7.

A frequência de ambos os genótipos estava em equilíbrio de Hardy Weinberg, o qual determina que as frequências alélicas permaneçam constantes ao longo das gerações, caso não haja intervenção de nenhum fator evolutivo. As frequências alélicas esperadas para o SNP no gene da GPx1 para o grupo DM1 eram 43, 29 e 5 com variação alélica de 0,45 ($\chi^2=3,4$; $p=0,75$) e 44, 26, e 4 para o GC, com frequência de variação de 0,23 ($\chi^2=0,52$; $p=0,77$). Para o SNP no gene do fator de transcrição Nrf2 era esperada a frequência alélica de 55, 20 e 2 para o grupo DM1 com variação alélica de 0,15 ($\chi^2=0,41$; $p=0,85$) e 54, 19 e 2 para o grupo controle, com variação de 0,15 ($\chi^2=0,34$; $p=0,85$).

Tabela 7. Distribuição dos participantes, dos grupos DM1 e GC, segundo os genótipos Pro198Leu C/T (1050450) no gene da GPx1 e -617C/A (rs6721961) no gene do fator de transcrição Nrf2. São Paulo, 2014.

Genótipo	DM1 [∞]	GC [§]
	n (%)	n (%)
GPx 1		
CC	46 (59,7)	45 (60,8)
CT	23 (29,9)	24 (32,4)
CC	8 (10,4)	5 (6,8)
Nrf2		
CC	55 (71,4)	53 (71,6)
CA	21 (27,3)	20 (27,0)
AA	1 (1,3)	1 (1,4)

Legenda: DM1: diabetes *mellitus* tipo 1; GC: grupo controle; CC citosina/citosina; CT: citosina/timina; TT: timina/timina; CA: citosina/adenina e AA: adenina/adenina [∞]: n=77; [§]: n=74.

Estudos que avaliaram a frequência do SNP da GPx1 encontraram resultados semelhantes aos deste estudo. Em 1999, Forsberg e colaboradores (1999) avaliaram 25 indivíduos suecos e encontraram frequência para os genótipos de 52% CC, 36% CT e 12% TT. No ano seguinte, deram sequência ao estudo e encontraram a frequência de genótipos de CC, CT e TT de 54%, 49% e 7%, respectivamente, em 305 indivíduos suecos e 35%, 48% e 17% para CC, CT e TT, respectivamente em 66 indivíduos finlandeses (FORSBERG *et al.* 2000). Menores frequências do alelo variante foram encontradas na população asiática, conforme verificado por Lei e colaboradores (2009), os quais encontraram 13% do alelo variante em 365 indivíduos chineses. Hamanishi e colaboradores (2004) encontraram 17,5% de alelo variante em 184 indivíduos japoneses.

Estudos brasileiros realizados em diferentes grupos, determinaram a distribuição de genótipos para o SNP no gene da GPx1. Cominetti e colaboradores (2012) avaliaram 37 mulheres obesas e encontraram a distribuição genotípica de 48,7% de CC, 37,8% de CT e 13,5% de TT. Costa e colaboradores (2014), ao avaliarem indivíduos hospitalizados encontraram 60% de indivíduos com genótipo CC, com 42% CT e com 8% de TT. Hiragi e colaboradores (2011) avaliaram a frequência deste SNP em indígenas (n=60), afrodescendentes (n=72) e brasileiros residentes no Distrito Federal (n=172). Na população indígena encontraram 95% alelo selvagem, 3% alelo heterozigoto e 2% para alelo variante. Já na população afrodescendente a distribuição foi de 71% CC, 22% CT e 7% TT. No terceiro grupo, (brasileiros residentes no Distrito Federal) foram encontrados 47% de alelo selvagem (CC), 40% de heterozigoto (CT) e 13% para alelo variante (TT). Em outro estudo, com indivíduos idosos residentes no estado de São Paulo, foi encontrada a frequência de 73,7%, 14% e 12,3% para os genótipos CC, CT e TT, respectivamente. (CARDOSO *et al.*, 2012).

Diferentemente dos estudos apresentados, Sabet e colaboradores (2014) avaliaram 105 mulheres que tiveram aborto espontâneo e 90 mulheres sem apresentar qualquer complicação na gestação (grupo controle) da província de Guinle, no Irã, e verificaram maior frequência do alelo CT nos dois grupos estudados. A frequência nos alelos CC, CT e TT no grupo caso foram de 11,1 %, 82,9 % e 5,7 %, respectivamente, e no grupo controle de 10% das mulheres com genótipo CC, 86,7%

com CT e 3,3% com TT. No entanto, não foi observada associação entre a presença do SNP e o risco de apresentar aborto espontâneo.

Com o objetivo de avaliar se a presença dos SNPs estudados teria alguma influência nos parâmetros bioquímicos avaliados nos grupos DM1 e GC, apresentamos a seguir os resultados de acordo com os genótipos dos dois SNPs avaliados.

. O estado nutricional dos participantes relativo ao selênio de acordo com os genótipos da GPx1, no códon 198, está apresentado na **Tabela 8**. A concentração de selênio plasmático no genótipo CT foi significativamente menor nos grupos DM1 e GC. Não foram encontradas diferenças significativas em relação à concentração de selênio nos eritrócitos.

Tabela 8. Concentração de selênio plasmático e eritrocitário, segundo o genótipo para o polimorfismo Pro198Leu (rs1050450), no gene que codifica para a GPx1. São Paulo, 2014.

Parâmetros	DM1			GC			*p
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	
Se plasmático (µg/L)	53,4 ± 13,7 ^a (53,2)	50,3 ± 10,7 ^b (47,8)	53,8 ± 15,2 ^a (47,2)	44,0 ± 10,0 ^a (44,0)	41,0 ± 10,7 ^b (40,3)	36,16 ± 5,2 ^c (35,0)	0,000
Se eritrocitário (µg/L)	61,8 ± 30,9 (57,7)	56,0 ± 14,5 (54,5)	57,6 ± 13,7 (55,6)	58,11 ± 12,1 (57,3)	56,4 ± 11,2 (54,9)	57,6 ± 10,3 (52,5)	0,871

Resultados apresentados como média± desvio padrão (mediana).

Letras diferentes no mesmo grupo (DM1 ou GC) representam médias estatisticamente diferentes, e entre alelos pelo teste de Fisher.

Valores de referência: Selênio plasmático: 60 a 120 µg/L e selênio eritrocitário: 90 a 190 µg/L (VAN DAEL; DEELSTRA, 1993).

Legenda: DM1: diabetes *mellitus* tipo 1; GC: grupo controle.

Diferença estatística: *p-valor<0,05:

Cominetti e colaboradores (2011), ao avaliarem mulheres obesas, não encontraram diferença significativa da concentração de selênio no plasma (54,04µg/L; 55,24µg/L e 62,74µg/L) e nos eritrócitos (60,8µg/L, 65µg/L e 59,7 µg/L) segundo os genótipos CC, CT e TT, respectivamente. De maneira semelhante, Cardoso e colaboradores (2012), também não encontraram diferença estatística entre os genótipos na concentração de selênio no plasma (31,4µg/L para o genótipo CC e 43,2 µg/L para os genótipos CT e TT) e nos eritrócitos (40,2 µg/L e 53,69 µg/L) ao avaliarem idosos com Alzheimer.

Ao avaliar os parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo de acordo com o SNP Pro198Leu no gene que codifica para a GPx1, não foi observada diferença entre os genótipos nos grupos DM1 e GC. No entanto, conforme já discutido anteriormente, o grupo DM1 apresentou maior atividade das enzimas antioxidantes quando comparada ao GC. Além disso, observou-se maior concentração de MDA no genótipo CT no grupo DM1 ($p=0,001$). Estes resultados estão apresentados na **Tabela 9**.

Cominetti e colaboradores (2011) encontraram valores médios de atividade enzimática da GPx nos eritrócitos de 38,5U/g Hb; 33,0U/g Hb e 31,4 U/g Hb, para os genótipos CC, CT e TT, respectivamente. Costa e colaboradores (2014) encontraram atividade da GPx nos eritrócitos inferior a encontrada no presente estudo, sendo 28,5U/g Hb no alelo CC, 31,1U/g Hb para CT e 35,9U/g Hb no alelo TT.

Lei e colaboradores (2009), encontraram em seu grupo controle valores médios da atividade da GPx1 superiores aos encontrados neste estudo, sendo 98,4 U/gHb no genótipo CC, e 99,78 U/gHb nos genótipos CT e TT.

Tabela 9. Marcadores bioquímicos do estresse oxidativo dos participantes dos grupos de DM1 e GC, segundo o segundo SNP Pro198Leu da GPx 1. São Paulo, 2014.

Parâmetros	DM1 ⁿ⁼⁷⁷			GC ⁿ⁼⁷⁴			<i>p</i>
	CC n=46	CT n=23	TT n=8	CC n=45	CT n=24	TT n=5	
GPx sangue total (U/g Hb)	43,8±13,3 ^a	38,8±13,3 ^a	41,9±10,6 ^a	19,7 ± 4,9 ^b	17,8 ± 4,5 ^b	16,9 ± 4,7 ^b	0,00 ^{&}
GPx nos eritrócitos (U/g Hb)	87,6±28,9 ^a	82,0±25,1 ^a	83,5±18,5 ^a	41,1 ± 12,4 ^b	37,0 ± 8,2 ^b	46,9 ± 11,5 ^b	0,00 ^{&}
SOD nos eritrócitos (U/g Hb)	3,4±0,7 ^a	3,2±0,9 ^a	3,0±0,9 ^a	1,56 ± 0,3 ^b	1,50 ± 0,3 ^b	1,5 ± 0,5 ^b	0,00 ^{&}
MDA no plasma (μM)	2,6±1,2 ^a	3,0±1,2 ^b	2,6±0,7 ^a	1,34 ± 0,3	1,43 ± 0,3	1,3 ± 0,2	0,00 [¥]
8-isoprostanos na urina (ng/mmol creatinina) [€]	93,5±137,4 ^{a €}	176,6±227,7 ^{a*}	43,4± 36,1 ^{a**}	171 ± 304 ^{b§}	120 ± 181 ^{b*}	154 ± 136 ^{b∞}	0,53

Legenda: DM1: Diabetes *mellitus* tipo 1; GC: Grupo controle; GPx: Glutathione peroxidase; SOD: Superóxido dismutase; MDA: malondialdeído;

€n=41; *n=21; ** n=7; §n=31; ∞n=4; ¥: diferenças entre os alelos CT e CC, CT; &: diferença estatística entre grupos DM1 e GC.

Resultados apresentados como média ± desvio-padrão

Diferenças estatística $p < 0.05$.

Letras diferentes no mesmo grupo e linha representam médias estatisticamente diferentes entre alelos.

Valores de referência: GPx no sangue total: 27,5 – 73,4 U/g Hb; SOD nos eritrócitos: 1102 – 1601 U/g Hb (kit comercial)

Observou-se também correlação diretamente proporcional entre a concentração de selênio no plasma e nos eritrócitos e a atividade da GPx no sangue total e nos eritrócitos no genótipo CC, em ambos os grupos. Estes dados estão apresentados nas **Figuras 21, 22, 23 e 24**.

Figura 21. Correlação entre a concentração de selênio eritrocitário e a atividade da GPx no sangue total e nos eritrócitos, de acordo com os genótipos para o SNP Pro198Leu (rs1050450) no gene que codifica para a GPx 1, no grupo DM1. São Paulo, 2014. Legenda: DM1: diabetes *mellitus* tipo 1; CC: citosina/citosina; CT: citosina/timina; TT: timina/timina
GPx – Sangue total CC: $r=0,585$; $p=0,007$; CT: $r=-0,128$; $p=0,691$; TT: $r=0,106$ $p=0,989$
GPx – Eritrócitos CC $r=0,679$; $p=0,037$; CT: $r=0,127$; $p=0,969$; TT: $r=0,575$; $p=0,942$.
Correlação de Pearson, diferença estatística $p<0,05$.

Figura 22. Correlação entre a concentração de selênio plasmático e a atividade da GPx no sangue total e nos eritrócitos, de acordo com os genótipos para o SNP Pro198Leu (rs1050450) no gene que codifica para a GPx 1, do grupo DM1. São Paulo, 2014. Legenda: DM1: diabetes *mellitus* tipo 1 CC: citosina/citosina; CT: citosina/timina; TT: timina/timina
GPx – Sangue total CC $r=0,346$; $p=0,135$; CT: $r=0,230$; $p=0,470$; TT: $r=0,174$; $p=0,826$.
GPx – Eritrócitos CC $r=0,189$; $p=0,135$; CT: $r=0,428$; $p=0,165$; TT: $r=-0,184$; $p=0,816$
Correlação de Pearson, diferença estatística $p<0,05$.

Figura 23. Correlação entre a concentração de selênio eritrocitário e a atividade da GPx no sangue total e nos eritrócitos, de acordo com os genótipos para o SNP Pro198Leu (rs1050450) no gene que codifica para a GPx 1, do GC. São Paulo, 2014. Legenda: GC: Grupo controle; CC: citosina/citosina; CT: citosina/timina; TT: timina/timina
 GPx – Sangue total CC $r=0,543$; $p=0,013$; CT: $r=0,499$; $p=0,030$; TT: $0,5^*$
 GPx – Eritrócitos CC $r=0,584$; $p=0,099$; CT: $r=0,330$; $p=0,167$; TT: $-0,9^*$
 Correlação de *Pearson*, diferença estatística $p<0,05$; * Teste *Spearman*.

Figura 24. Correlação entre a concentração de selênio plasmático e a atividade da GPx no sangue total e nos eritrócitos, de acordo com os genótipos para o SNP Pro198Leu (rs1050450) no gene que codifica para a GPx 1, do GC. São Paulo, 2014. Legenda: GC: Grupo controle; CC: citosina/citosina; CT: citosina/timina; TT: timina/timina
 GPx – Sangue total CC $r=0,559$; $p=0,118$; CT: $r=0,408$; $p=0,083$; TT: $0,7$
 GPx – Eritrócitos CC $r=0,552$; $p=0,123$; CT: $r=0,212$; $p=0,387$; TT: $-0,7$
 Correlação de *Pearson*, diferença estatística $p<0,05$. * Teste *Spearman*

Outros estudos também não encontraram correlação entre a concentração de selênio e a atividade da enzima GPx no alelo variante (T), o que indica que a presença de pelo menos um alelo variante pode tornar o indivíduo menos responsivo a alteração tanto a ingestão de selênio quanto na

atividade da enzima GPx (HU; DIAMOND, 2003; JABLONSKA *et al.* 2009; KARUNASHINGHE *et al.* 2011).

Um estudo mostrou fortes evidências de ligação funcional entre selenoproteínas e enzimas fase II, uma vez que a redução de selenoenzimas aumentou a expressão de outras enzimas da fase II. Neste sentido, avaliamos o estado nutricional relativo ao selênio, segundo o genótipo do SNP -617 C/A, (SENGUPTA *et al.* 2008). A frequência dos genótipos CC, CA e AA na posição -617 da região promotora no gene do fator de transcrição Nrf2 de ambos os grupos estão apresentados na **Tabela 7**.

Os parâmetros bioquímicos avaliados de *status* de selênio, biomarcadores glicêmicos e do estresse oxidativo foram avaliadas de acordo com esses genótipos. Como foram encontrados apenas dois participantes com alelos heterozigoto variante (AA), sendo um do grupo DM1 e um do GC, estes foram reunidos no grupo de alelo CA para análise estatística.

A maioria dos estudos com esse fator de transcrição é realizada com modelo animal ou *in vitro*, principalmente os relacionados ao SNP -617 C/A. Estudos mostram a influencia de fatores dietéticos na transcrição gênica do fator de transcrição Nrf2 que ativa a transcrição de enzimas antioxidantes, como a GPx (BAI *et al.* 2013, BOETLER *et al.*, 2012). No entanto, mostram também que a presença de SNPs nesse fator de transcrição, pode diminuir a expressão dessas enzimas (BOETLER *et al.*, 2012; MARZEC *et al.*, 2007).

Nesse estudo, observamos a correlação positiva entre a ingestão de selênio e a expressão gênica da GPx1 ($r=0,677$; $p=0,006$), porém esse resultado foi encontrado apenas no grupo CA/AA DM1. Não foi observada correlação nos demais grupos.

Foi encontrada diferença significativa entre a concentração de selênio plasmático entre os grupos DM1 e GC, na avaliação segundo genótipo -617 C/A. Os dados de *status* de selênio de acordo com os genótipos do SNP do Nrf2 estão apresentados na **Tabela 10**.

Tabela 10. Concentrações de selênio plasmático e eritrocitário segundo o genótipo para o polimorfismo -617 C/A (rs6721961) no gene do fator de transcrição Nrf2, nos grupos DM1 e GC. São Paulo, 2014.

Parâmetros ($\mu\text{g Se/L}$)	DM1 (n=77)		GC (n=74)		*p
	CC (n=55)	CA/AA (n=22)	CC (n=53)	CA/AA (n=21)	
Se plasmático	52,1 $\pm$ 13,6	53,56 $\pm$ 11,2	43,2 $\pm$ 10,3	40,9 $\pm$ 9,9	<0.001
Se eritrocitário	61,4 $\pm$ 28,8	55,3 $\pm$ 15,3	56,8 $\pm$ 11,0	59,4 $\pm$ 13,1	0,583

* Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos;

Na avaliação dos parâmetros glicêmicos segundo genótipo, observou-se maior concentração de glicose no grupo de alelos variantes CA/AA do DM1 ($p=0,001$). Uma vez que a hiperglicemia esta associada ao aumento de estresse oxidativo e a presença do SNP -617 C/A, esta associado à diminuição da expressão de enzimas antioxidantes, esses dados podem ser observados e talvez considerados como parâmetro para acompanhamento e redução de estresse oxidativo, principalmente em pacientes com DM. Dados apresentados na **Figura 25**.

Figura 25. Concentração de glicose dos participantes dos grupos DM1 e GC segundo os genótipos CC e CA/AA. Legenda: DM1: diabetes *mellitus* tipo 1; GC: grupo controle; CC: citosina/citosina; CA/AA: citosina/adenina, adenina/adenina.

Não foi observada correlação entre os parâmetros glicêmicos e lipídicos avaliados, segundo o genótipo do Nrf2. Os resultados encontrados sobre a atividade da GPx e concentração de selênio eritrocitário e plasmático, estão apresentados nas **FIGURAS 26, 27, 28 e 29**.

Figura 26. Correlação entre a concentração de selênio nos eritrócitos e a atividade da GPx nos eritrócitos e sangue total, segundo o genótipo CC do SNP -617C/A na região promotora do gene do fator de transcrição Nrf2, nos grupos DM1 e GC. São Paulo, 2014. Legenda: DM1: diabetes mellitus tipo 1; GC: grupo controle. CC: citosina/citosina.

DM1: GPx – Eritrócitos $r = 0,130$; $p = 0,685$; GPx: Sangue total $r = 0,280$; $p = 0,377$

GC: GPx – Eritrócitos $r = 0,273$; $p = 0,231$; GPx: Sangue total $r = 0,417$; $p = 0,06$

Figura 27. Correlação entre a concentração de selênio nos eritrócitos e a atividade da GPx nos eritrócitos e sangue total, segundo os genótipos CA/AA do SNP -617C/A na região promotora do gene do fator de transcrição Nrf2, nos grupos DM1 e GC. Legenda: DM1: diabetes mellitus tipo 1; GC: grupo controle; CA: Citosina/adenina; AA: adenina/adenina

DM1: GPx – Eritrócitos $r = 0,016$; $p = 0,972$; GPx Sangue total $r = 0,102$ $p = 0,636$

GC: GPx – Eritrócitos $r = 0,481$; $p = 0,159$; GPx Sangue total $r = 0,790$; $p = 0,007$

Figura 28. Correlação entre a concentração de selênio no plasma e a atividade da GPx nos eritrócitos e sangue total, segundo o genótipo CC do SNP -617C/A na região promotora do gene do fator de transcrição Nrf2, nos grupos DM1 e GC. São Paulo, 2014. **Legenda:** DM1: diabetes mellitus tipo 1; GC: grupo controle; CC: citosina/citosina.

DM1: GPx Eritrócitos $r=0,1618$; $p=0,615$; GPx Sangue total $r=0,260$; $p=0,58$.

GC: GPx – Eritrócitos $r=0,296$; $p=0,192$; GPx Sangue total $r=0,449$; $p=0,41$

Figura 29. Correlação entre a concentração de selênio no plasma e a atividade da GPx nos eritrócitos e sangue total segundo os genótipos CA/AA do SNP -617C/A na região promotora do gene do fator de transcrição Nrf2, nos grupos DM1 e GC. São Paulo, 2014.

Legenda: DM1: diabetes mellitus tipo 1; GC: grupo controle; CA: Citosina/adenina; AA:adenina/adenina

DM1: GPx – Eritrócitos $r=0,159$; $p=0,683$; GPx Sangue total $r=0,401$; $p=0,285$

GC: GPx – Eritrócitos $r=0,511$; $p=0,888$; GPx Sangue total $r=0,145$; $p=0,689$

Não foram encontrados estudos que avaliassem *status* de selênio, parâmetros glicêmicos e biomarcadores de estresse oxidativo, segundo o genótipo deste SNP.

5.7 Expressão gênica da GPx1

A avaliação da expressão gênica de selenoproteínas como biomarcador do *status* de selênio ainda é discutida, porque muitos fatores podem influenciar o estado nutricional, como fatores ambientais (dieta, etilismo, tabagismo, sedentarismo), genéticos (SNPs) e fisiológicos (alterações nos sistema imunológico e endócrino) (REZSKA *et al.* 2012).

Um estudo *in vitro* mostrou correlação positiva entre o aumento da concentração de glicose e a expressão da GPx1 (PATEL *et al.*, 2013). Neste estudo não foi observada correlação entre a expressão da GPx1 e os parâmetros avaliados.

Figura 30. Expressão gênica da GPx1 nos grupos DM1 e GC. São Paulo, 2014.

Legenda: DM1: diabetes mellitus tipo 1; GC: grupo controle; RPS13: proteína ribossomal S13.

Resultados apresentados como média. Não foi observada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. A expressão do RNA foi obtida pela razão entre a expressão do mRNA alvo e do mRNA de referência RPS13.

Não foram encontrados estudos de expressão gênica da GPx1 em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1. EL-BAB e colaboradores (2013) encontraram menor expressão de enzimas antioxidantes em pacientes com DM2. Nesse estudo, no entanto, não foi observada diferença significativa na expressão do gene da GPx entre os genótipos. Os resultados estão apresentados na **Figura 31**.

Figura 31. Expressão gênica da GPx1 dos grupos diabetes *mellitus* tipo 1 e grupo controle, segundo os genótipos dos SNPs C/T no gene da GPx1 e -617 C/A no gene do fator de transcrição Nrf2. São Paulo, 2014.

Resultados apresentados como média.

A expressão do RNA foi obtida pela razão entre a expressão do mRNA alvo e do mRNA de referência RPS13.

Legenda: DM1: diabetes mellitus tipo 1; GC: grupo controle; RPS13: proteína ribossomal S13.

Um estudo com camundongos com diabetes, foi observado aumento da expressão gênica de GPx1 e outras enzimas antioxidantes, quando comparado ao controle (NAGATOMO *et al.*, 2014).

Outro estudo, porém *in vitro*, verificou correlação positiva entre a dieta, com 40% de lipídeos e a expressão gênica do fator de transcrição Nrf2, da GPx1 e de outras enzimas antioxidantes, o sugerindo resposta ao estresse oxidativo pós-prandial (CAMARGO *et al.* 2014).

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

O estado nutricional dos participantes relativo ao selênio é deficiente, independente da doença. Quando avaliado de acordo com os genótipos da GPx1 Pro198Leu (rs1050450) e -617 C/A no gene do fator de transcrição Nrf2 (rs6721961) a concentração de selênio no plasma foi menor no genótipo CT para GPx1, em ambos os grupos, o que sugere influência da presença do alelo no *status* de selênio.

O estresse oxidativo encontrou-se aumentado nos participantes com DM1. Ao avaliar os marcadores de estresse oxidativo de acordo com os SNPs estudados, foi observada maior peroxidação lipídica, em ambos os grupos, na presença do alelo variante T, o que pode indicar alteração da proteção antioxidante.

Contudo a expressão gênica da GPx1 não foi alterada pela presença dos SNPs avaliados.

7. REFERÊNCIAS

- ADAME, E. M.; FLOREA, D.; PEREZ, L.S.; LÓPEZ, J. M.; LÓPEZ-GONZALEZ, B.; CRUZ, A. P.; DEL POZO, E. P. Deficient selenium status of a healthy adult Spanish population. ***Nutrición Hospitalaria***, v. 27, n. 2, p. 524-528, 2012.
- ADEBAYO, O.; WILLIS, G.C. The Changing Face of Diabetes in America. ***Emergency Medicine Clinics of North America***, v.32, p.319–327, 2014.
- AKSOY, N.; VURAL, H.; SABUNCU, T.; ARSLAN, O.; AKSOY, S. Beneficial effects of vitamins C and E against oxidative stress in diabetic rats. ***Nutrition Research***, v.25, p.625-630, 2005.
- ALAM, J. The Mammalian Cap and Collar Family of Transcription Factors. ***Signal Antioxidants & Redox Signaling***, v.8, n.1-2, 2006.
- 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.
- ALFTHAN, G.; ARO, A.; ARVILOMMI, H.; HUTTUNEN, J. K. Selenium metabolism and platelet glutathione peroxidase activity in healthy Finnish men: effects of selenium yeast selenite and selenate. ***The American Journal of Clinical Nutrition***, v. 53, p. 120-125, 1991.
- ALMONDES, K. G. S. et al. O papel das selenoproteínas no câncer. ***Revista da Associação Médica Brasileira***, v.56, n. 4, p. 484-488, 2010.
- ALMONDES, K. G. S.; DE OLIVEIRA T.F.; SIVIERO-MIACHON, A.A.; LEE, M.L.; RONDÓ, P.H.; LOUREIRO, A.P.; SPINOLA-CASTRO, A.M.; COZZOLINO, S.M.F. Selenium inadequacy is not associated with oxidative stress in child and adolescent acute lymphocytic leukemia survivors. ***Nutrition Research***, v.30, n. 5, p.563–568, 2013.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. ***Diabetes Care***, v.37, suppl. 1, 2014
- ARCANJO, C.J.; PICCIRILLO, L.J.; MACHADO, L.V.; ANDRADE, J.R.C.R.M.; CLEMENTE, E.L.; GOMES, M.B. Avaliação de dislipidemias e índices antropométricos em pacientes com diabetes mellitus tipo 1. ***Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia***, v.49, n.6, p.951-958, 2005.

- ARSOVA-SARAFINOVSKA, Z.; MATEVSKA, N.; EKEN, A.; PETROVSKI, D.; BANEV, S.; DZIKOVA, S.; GEORIEV, V.; SIKOLE, A.; ERDEM, O.; SAYAL, A.; AYDIN, A.; DIMOVSKI, A. J. Glutathione peroxidase 1 (GPX1) genetic polymorphism, erythrocyte GPX activity, and prostate cancer risk. **International Journal of Urology and Nephrology** v. 41, n. 1, p. 63-70, 2009.
- ASHTON, K.; HOOPER, L.; HARVEY, L. J.; HURST, R.; CASGRAIN, A.; FAIRWEATHER-TAIT, S. J. Methods of assessment of selenium status in humans: a systematic review. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, p. 2025S-2039S, 2009.
- AYDIN, A.; ORHANB, H.; SAYALA, A.; ZATAC, M.O.; AHINB, G.S.; ISIMER, A.K. **Clinical Biochemistry**, v.34, p.65-70, 2001
- BAGIS, S.; TAMER, L.; BILGIN, G.S.R.; GULER, H.; ERDOGAN, B.E.C. Free radicals and antioxidants in primary fibromyalgia: an oxidative stress disorder? **Rheumatology International**, v.25, n.3, p.188-190, 2005.
- BAI Y, CUI W, XIN Y, MIAO X, BARATI MT, ZHANG C, ET AL. Prevention by sulforaphane of diabetic cardiomyopathy is associated with up-regulation of Nrf2 expression and transcription activation. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.57, p.82–95, 2013.
- BAIRD, L. & DINKOVA-KOSTOVA, A. T. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. **Archives Toxicology**, v.85, p.241-272, 2011.
- BALASUBRAMANIAN, S.P.; COX, A.; BROWN, N.J.; REED, M.W. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. **European Journal of Surgical Oncology**, v.30, n.6, p.593-601, 2004.
- BALOGUN, E.; HOQUE M; GONG P; KILLEEN E; GREEN C E FORESTI R. Curcumin activates the Heme Oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element **Biochemical Journal**. v.371, p.887–895, 2003.
- BANGSTAD, H.J.; DANNE, T.; DEEB, L.C.; JAROSZ-CHOBOT, P.; URAKAMI, T.; HANAS, R. Insulin treatment. **Pediatric Diabetes**, v.8, p.88-102, 2007.
- BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; Valéria Paula Rodrigues MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, Campinas. v.23, n.4, p.629-643, 2010.
- BARREIROS, A.L.B.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Química Nova**, v.29, n.1, 2006.

- BASTOS, A. S.; LOUREIRO, A. P. L.; OLIVEIRA, T. F.; CORBI, S. C. T.; CAMINAGA, R. M. S.; ROSSA-JÚNIOR, C.; SILVANA R.P. ORRICO, S. R.P. Quantitation of malondialdehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid chromatography-based method. **Analytical Biochemistry**, v. 423, p. 141-146, 2012.
- BAYOUMY-EL, K. The preventive role of selenium on genetic damage and on cancer: review. **Mutation Research**, v. 75, p. 123-139, 2001.
- BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements **International Journal of Food Sciences and Nutrition and dietary influences**, v.47, p.233-261, 1996.
- BERGER, M. M. Can Oxidative Damage Treated Nutritionally? **Clinical Nutrition**, v.24, n. 2, p. 172-183, 2005.
- BERNARD K, KRAUSE KH. The NOX family of ROS generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiology Review**, v.87, n.1, p.245-313, 2007
- BLEYS, J.; NAVAS-ACIEN, A.; GUALLAR, E. Serum selenium and diabetes in US adults. **Diabetes Care**, v.30, p.829-834, 2007.
- BLUM, N.M., MUELLER, K., LIPPMANN, D., METGES, C.C., LINN, T., PALLAUF, J., MUELLER, A.S. Feeding of Selenium Alone or in Combination with Glucoraphanin Differentially Affects Intestinal and Hepatic Antioxidant and Phase II Enzymes in Growing Rats. **Biological Trace Element Research**, v.151, n.3, p. 384-99, 2013.
- BODNAR, M.; KONIECZKA, P. and NAMIESNIK, J. The Properties, Functions, and Use of Selenium Compounds in Living Organisms. **Journal of Environmental Science and Health** v.30, p.225–252, 2012.
- BOETTLER, U.; VOLZ, N.; TELLER, N.; HAUPT, L.M.;BAKURADZE, T.; EISENBRAND, G.; BYTOF, G. LANTZ, I.; GRIFFITHS, L.R.; MARKO, D. Induction of antioxidative Nrf2 gene transcription by coffee in humans: depending on genotype? **Molecular Biology Reports** , v.39, p.7155–7162, 2012.
- BOOSALIS, M. G. The role of selenium in chronic disease. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 23, n. 2, p. 152-160, 2008.
- BOR, M. V.; CEVIK, C.; USLU, I.; GUNERAL, F.; DUZGUN, E. Selenium levels and glutathione peroxidase activity in patients with acute myocardial infarction. **Acta Cardiologica**, v. 54, p. 271-276, 1999.

BOURGES, R.H. La nutriología a partir de “la doble hélice”. **Revista de Investigación Clínica**. v.55, n.2, p.216-219, 2003.

BRATTBAKK HR, ARBO I, AAGAARD S, LINDSETH I, DE SOYSA AK, LANGAAS M, KULSENG B, LINDBERG F, JOHANSEN B. Balanced caloric macronutrient composition downregulates immunological gene expression in human blood cells-adipose tissue diverges. **OMICS**, v.17, p.41-52, 2013.

BREITLING, F.; LITTLE, M. Carboxy-terminal Regions on the Surface of Tubulin and Microtubules Epitope Locations of YOL1/34, DMIA and DMIB. **J. Journal of Molecular Biology**, v.189, p.367-370, 1986

BRIGELIUS-FLOHE, R. & FLOHE, L. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. **Antioxidants Redox Signal**, v.15, p.2335-81, 2011.

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

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

BURK, R. F. & LEVANDER, O. A. Selenium. In: **Modern Nutrition in Health and Disease** (Shils, M. E., Olson, J. A., Shike, M. & Ross, A. C., eds.), 9 ed., pp. 285–302. Williams & Wilkins, Baltimore, MD. 2003

CAMARGO, A.; ORIHUELA, P.P.; ZÚÑIGA, O.A.R.; MARTÍNEZ, P.P.; LISTA, J.D.; TENO, C.C.; MARÍN, C.; TINAHONES, F.; MALAGÓN, M.M.; ROCHE, H.M.; JIMÉNEZ, F.P.; MIRANDA, J.P. Peripheral blood mononuclear cells as *in vivo* model for dietary intervention induced systemic oxidative stress. **Food and chemical toxicology**, v.72; p. 178-186, 2014.

CARDOSO, BR.; ONG, TP.; JACOB-FILHO, W.; FREITAS, MI.; COMINETTI, C.; COZZOLINO, SM. Glutathione peroxidase 1 Pro198Leu 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.

CAUWENBERGH, R. V.; ROBBERECHT, H.; VLASLAERB, V. V.; DEELSTRA, H. Comparison of the serum selenium content of healthy adults living in the Antwerp region (Belgium) with recent literature data. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.18, p. 99-112, 2004

CHAN, K., HAN, X. D., KAN, Y. W. An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, p.4611–4616, 2001.

CHARTOUMPEKIS, D.V. and KENSLER, T.W. New Player on An Old Field; the Keap1/Nrf2 Pathway as a Target for Treatment of Type 2 Diabetes and Metabolic Syndrome. **Current Diabetes Reviews**, v.9, n.2, p.137-145, 2013

CHILLARÓN, J.J.; LE-ROUX, J.A.L.; BENAIGES, D.; PEDRO-BOTET, J. Type 1 diabetes, metabolic syndrome and cardiovascular risk. **Metabolism Clinical And Experimental**, v.63, p.181–187, 2014

CHO, H.Y.; REDDY, S.P.; DEBIASE, A.; YAMAMOTO, M.; KLEEBERGER, S. R. Gene expression profiling of NRF2-mediated protection against oxidative injury. **Free Radical Biology**, v.38, p.325–343, 2005.

COMBS JR, G. F.; WATTS, J. C.; JACKSON, M. I.; JOHNSON, L. K.; ZENG, H.; SCHEETT, A. J.; UTHUS, E. O.; SCHOMBURG, L.; HOEG, A.; HOEFIG, C. S.; DAVIS, C. D.; MILNER, J. A. Determinants of selenium status in healthy adults. **Nutritional Journal**, v. 10, 2011.

COMINETTI C, DE BORTOLI MC, GARRIDO AB JR, COZZOLINO SM. Brazilian nut consumption improves selenium status and glutathione peroxidase activity and reduces atherogenic risk in obese women. **Nutrition Research**, v.32, p.403-407, 2012.

COMINETTI, C.; BORTOLI, M. C.; PURGATTO, E.; ONG, T.P.; MORENO, F.S.; GARRIDO, A.B.J.; 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 Research**, v.27, p.891-896, 2011.

CÓRDOVA, E.J.; JIMÉNEZ M.S.; CENTENO, F.; MARTINEZ HERNÁNDEZ, A.; MARTÍNEZ-AGUILAR, N.; DEL-RÍO-NAVARRO B.E.; GOMEZ_VERA, J.; L NFE 2L2 gene variants and susceptibility to childhood-onset asthma. **Revista de Investigación Clínica**, v. 63, n.4, p.407-411, 2011.

COSTA, N.A., GUT, A.L., PIMENTEL, J.A.C., COZZOLINO, S.M.F., AZEVEDO, P.S., FERNANDES, A.A.H., POLEGATO, B.F., TANNI, S.E., GAIOLLA, R.D., ZORNOFF, L.A.M., PAIVA, S.A.R., MINICUCCI, M.F. Erythrocyte selenium concentration predicts intensive care unit and hospital mortality in patients with septic shock: a prospective observational study. **Critical Care**, v.18, Suppl. 3, p.92, 2014.

COUDRAY, C.; ROUSSEL, A. M.; MAINARD, F.; ARNAUD, J.; FAVIER, A. Lipid peroxidation level and antioxidant micronutrient status in a pre-aging population; correlation with chronic disease prevalence in a French epidemiological study (Nantes, France). **The Journal of the American College of Nutrition**, v.16, p. 584-591, 1997.

CRAIG, M.E.; HATTERLEY, A.; DONAGHUE, K.C. Definition, epidemiology and classification diabetes in children and adolescents. ***Pediatric Diabetes***, v.10, suppl.12, p.3-12, 2009.

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

DEL RIO, D.; STEWART, A.J.; PELLEDRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. ***Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases***, v.15, p.316-32, 2005.

DIAS, J.; MARTINS, S.; CARVALHO, S.; MARQUES, O.; ANTUNES, A. Mauriac syndrome still exists. ***Endocrinology Nutrition***, v.60, n.5, p.245-248, 2013.

DIB, A.S. Heterogeneidade do Diabetes Melito Tipo 1. ***Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia***. v.52, p.2, 2008.

DOI T, VLASSARA H, KIRSTEIN M, YAMADA Y, STRIKER GE, STRIKER LJ. Receptor-specific increase in extracellular matrix production in mouse mesangial cells by advanced glycosylation end products is mediated via platelet-derived growth factor. ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***, v.89, p.2873-2877, 1992.

DUMONT, E.; VANHAECKE, F.; CORNELIS, R. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. ***Analytical and Bioanalytical Chemistry***, v.385, p.1304–1323, 2006.

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.

DUMONT, E., DE CREMER, K., VANHULLE, M., CHE´RY, C., VANHAECKE, F., & CORNELIS, R. Identification of the major Se-compound in three different *Saccharomyces cerevisiae* supplements by on-line narrowbore HPLC–ES-MS-MS. ***Journal of Chromatography A***, v.1071, p.191–196, 2005

EL-BAB, M.F.; ZAKI, N.S.; MOJADDIDI, AL-BARRY, M.; EL-BESHBISHY, H.A. Diabetic retinopathy is associated with oxidative stress and mitigation of gene expression of antioxidant enzymes. ***International Journal of General Medicine***, v.19, n.6, p.799-806, 2013.

ELIASSON, L.; ABDULKADER, F.; BRAUN, M.; GALVANOVSKIS, J.; HOPPA, M.B.; RORSMAN, P.; FAINSTEIN, M. K. Nrf2: La historia de un nuevo factor de

transcripción que responde a estrés oxidativo. **Revista de Educación Bioquímica**, v.26, p. 18-25, 2007.

ELLINGER FP, RAMAN AV, REEVES MA *et al.* Regulation and function of selenoproteins in human disease. **Biochemical Journal**. v.422, n.11, p.22, 2009.

EZAKI, O. The insulin-like effects of selenate in rat adipocyte. **Journal of Biological Chemistry**, v.15, p.1124-1128, 1990.

FAIRWEATHER-TAIT, S. J. Bioavailability of selenium. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 51, p. S20-S23, 1997.

FAIRWEATHER-TAIT, S.J. Human nutrition and food research: opportunities and challenges in the post-genomic era. **Journal - Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v.358, n.1438, p.1709-1727, 2003.

FERREIRA A.L.A., MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FERREIRA, K. S.; GOMES, J. C.; BELLATO, C. R.; JORDÃO, C. P. Concentração de selênio em alimentos consumidos no Brasil. **Pan American Journal of Public Health**, v.11, n. 3, p. 172-177, 2002.

FORSBERG, L.; De FAIRE, U.; MORGENSTERN, R. Low yield polymorphisms from est balst searging: Analysis of genes related to oxidative stress and verification of the P197L polymorphism in GPx1. **Human Mutation**, v.13, p.294-300, 1999.

FORSBERG, L.; FAIRE, U.; MARKLUND, SL.; ANDERSSON, PM.; STEGMAYR, B.; MORGENSTERN, R. Phenotype determination of a common Pro-Leu polymorphism in human glutathione peroxidase 1. Blood Cells, **Molecules & Diseases**, v. 26, n.5, p.423-426, 2000.

FOX, T.; FAIRWEATHER-TAIT, S. J. Selenium. In.: HURRELL, R. **The mineral fortification of foods**. Leatherhead: Leatherhead Publishing, v. 2, p. 1-44, 1999.

FRAYN, K.N. Metabolic Regulation: **A Human Perspectiv**. 2ª ed., Oxford: Blackwell Science, 2003.

FROJDO, S.; VIDAL, H.; PIROLA, L. Alterations of insulin signaling in type 2 diabetes: A review of thw current evidence from humans. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1792, p.83-92, 2009.

GABBAY, M.A.L.; MORI, D.; GIUFFRIDA, F.; DIB, S.A. Comparação entre as insulinas regular pré-jantar e NPH no almoço como a terceira aplicação de insulina no tratamento de adolescentes com diabetes melito do tipo 1 em um Serviço Público de Saúde. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v.48, n.6, 2004.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research*, v.107, p.597-605, 2006.

GROMADA J, BOKVIST K, DING WG, BARG S, BUSCHARD K, RENSTRÖM E, RORSMAN P. Adrenaline stimulates glucagon secretion in pancreatic A-cells by increasing the Ca²⁺ current and the number of granules close to the L-type Ca²⁺ channels. **Journal Of General Physiology**, v.110, p.217-22, 1997.

HALIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in Biology and Medicine. **Oxford: Claredon Press**, p.543, 1989.

HAMANISHI, T.; FURUTA, H.; KATO, H.; DOI, A.; TAMAI, M.; SHIMOMURA, H.; SAKAGASHIRA, S.; NISHI, M.; SASAKI, H.; SANKE, T.; NANJO, K. Functional Variants in the Glutathione Peroxidase-1 (GPx-1) Gene Are Associated With Increased Japanese Type 2 Diabetic Patients. **Diabetes**, v.53, p.2455-2460, 2004.

HANSEN, R. D.; KRATHC, B. N.; FREDERIKSENA, K.; TJONNELANDA, A.; OVERVADD, K.; ROSWALL, N.; LOFT, S.; DRAGSTEDC, L. O.; VOGEL, U.; RAASCHOU-NIELSEN, O. GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, interaction with alcohol consumption and smoking, and risk of colorectal cancer. **Mutation Research**, v. 664, 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.

HEI, Y.J.; FARAHBAKHSHIAN S.; CHEN, X.; BATTELL, M.L.; McNEILL, J.H. Stimulation of MAP kinase and S6 kinase by vanadium and selenium in rat adipocytes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.178, p.367-375, 1998.

HENKIN, J.C. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. **Diabetes**, v.49, p.1751-1760, 2000.

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

HESKETH, J.; MÉPLAN, C. Transcriptomics and functional genetic polymorphisms as biomarkers of micronutrient function: focus on selenium as an exemplar.

Conference on 'Functional genomic biomarkers, nutrition and disease susceptibility'. **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.

HU, Y. J.; DIAMOND, A. M. Role of Glutathione Peroxidase 1 in Breast Cancer: Loss of Heterozygosity and Allelic Differences in the Response to Selenium. **Cancer Research**, v. 63, p. 3347–3351, 2003.

HUANG, Z.; HOFFMANN, F.W.; FAY, J.D.; HASHIMOTO, A.C.; CHAPAGAIN, M.L.; KAUFUSI, P.H. HOFFMANN, P.R. Stimulation of unprimed macrophages with immune complexes triggers a low output of nitric oxide by calcium-dependent neuronal nitric oxide synthase. **Journal of Biology Chem**, v.287, n.7, p.1-10, 2012.

ITOH, K.; MOCHIZUKI, M.; ISHII, Y.; ISHII, T.; SHIBATA, T. *et al.* Transcription factor Nrf2 regulates inflammation by mediating the effect of 15-deoxy-12,14-prostaglandin. **Molecular Cellular Biol.**, v. 24, n.1, p.36–45, 2004.

ITOH, K.; CHIBA, T.; TAKAHASHI, S.; ISHII, T.; IGARASHI, K.; KATOH, Y.; OYAKE, T.; HAYASHI, N.; SATOH, K.; HATAYAMA, I.; YAMAMOTO, M. & NABESHIMA, Y. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.236, p.313-22, 1997.

JABLONSKA, E.; GROMADZINSKA, J.; RESZKA, E.; WASOWICZ, W.; SOBALA, W.; SZESZENIA-DABROWSKA, N.; BOFFETTA, P. Association between GPx1 Pro198Leu polymorphism, GPx1 activity and plasma selenium concentration in humans. **European Journal of Nutrition**, v. 49, p. 383-386, 2009.

JAGANJAC, M. Possible involvement of granulocyte oxidative burst in Nrf2 signaling in cancer. **Indian Journal of Medical**, v.131, p 609-616, 2010.

JAIN, A.K.; BLOOM, D.A. & JAISWAL, A.K. Nuclear import and export signals in control of Nrf2. **Journal Biological Chemistry**, v.280, n.32, p.29158-68. 2005.

JEONG W.S.; KIM, I.W.; HU, R.; KONG, A.N. Modulatory properties of various natural chemopreventive agents on the activation of NF-kappaB signaling pathway. **Pharmaceutical Research**, n.21, p.661–670, 2004

JONES, D.P. Redefining Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.8, p.1865-1879, 2007.

LIBERATORE JUNIOR, R.D.R.; CARDOSO-DEMARTINI, A.A.; ALLAN HIROSHI DE A. ONO, A.H.A.; ANDRADE, G.C. Prevalência de obesidade em crianças e adolescentes com diabetes melito tipo 1. **Revista Paulista de Pediatria**, v.26, n.2, p.142-145-5, 2008

KAMADA, C.; YOSHIMURA, H.; OKUMURA, R.; TAKAHASHI, K.; IIMURO, S.; OHASHI, Y.; ARAKI, A.; UMEGAKI, H.; SAKURAI, T.; YOSHIMURA, Y.; ITO, H. Japanese Elderly Diabetes Intervention Trial Study Group. Optimal energy distribution of carbohydrate intake for Japanese elderly patients with type 2 diabetes: the Japanese Elderly Intervention Trial. **Geriatrics & Gerontology International**, v.12, Suppl 1, p.41-49, 2012.

KARUNASINGHE, N.; HAN, D. Y.; ZHU, S.; YU, J.; et al. Serum selenium and single-nucleotide polymorphisms in genes for selenoproteins: relationship to markers of oxidative stress in men from Auckland, New Zealand. **Genes & Nutrition**, v. 7, p. 179-190, 2012. KANG, K.W.; LEE, SJ; KIM, S.G. Molecular Mechanism of Nrf2 Activation by Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.7, p.11-12, 2005.

KASAIKINA, M.V.; KRAVTSOVA, M.A.; LEE, B.C.; SERAVALLI, J.; PETERSON, D.A.; WALTER, J.; LEGGE, R.; BENSON, A.K.; HATFIELD, D.L.; GLADYSHEV, V.N.; Dietary selenium affects host selenoproteome expression by influencing the gut microbiota. **FASEB Journal**, v.25, p.2492-2499, 2011.

KAUWELL, G.P.A. Emerging Concepts in Nutrigenomics: A Preview of de what is to come. **Nutrition in Clinical Practice**, v.20, p.153-159, 2005.

KAVANAGH, B.P.; MCCOWEN, K.C. Glycemic Control in the ICU. **The new England journal of medicine**, vol. 363, n.26, 2010

KENSLER, T.W.; WAKABAYASHI, N.; BISWAL, S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.47, p.89-116, 2007.

KO, W. S.; GUO, C. H.; YEH, M. S.; LIN, L. Y.; HSU, G. S.; CHEN, P. C.; LUO, M. C.; LIN, C. Y. Blood micronutrient, oxidative stress, and viral load in patients with chronic hepatitis C. *World Journal of Gastroenterology*, v. 14, n. 30, p. 4697-4702, 2005

KÖHRLE, J. The trace element selenium and the thyroid gland. *Biochimie*, v.81, p. 527-533, 1999.

KRYUKOV, G.V.; CASTELLANO, S.; NOVOSELOV, S.V.; LOBANOV, A.V.; ZEHTAB, O.; GUICO, R.; GLADSHEV, V.N. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, v.300, p.1439-1443, 2003

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

KWAK, M.K.; WAKABAYASHI, N.; ITOH, K.; MOTOHASHI, H.; YAMAMOTO, M.; KENSLER, T.W. Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. *Biochemical Journal*, v. 278, p.8135–8145, 2003.

LACLAUSTRA, M.; NAVAS-ACIEN, A.; STRANGES, S.; ORDOVAS, J.M.; GUALLAR, E. Serum selenium concentrations and diabetes in US adults: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2004. *Environmental Health Perspectives*, v.117, p. 1409-1413, 2009.

LEE, J. M., CALKINS, M. J., CHAN, K., KAN, Y. W., JOHNSON, J. A. Identification of the NF-E2- related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *Journal Biology and Chemical*, v. 278, p.12029–12038, 2003.

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

LUBOS, E.; LOSCALZO, J.; HANDY, D.E. Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, v.15, n.7, p.1957-1998, 2011

MARCZAK, E.D; MARZEC, J.M.; ZELDIN, D.C.; KLEEGERGER, S.R.; BROWN, N.J.; PRETORIUS, M.; LEE, C.R. Polymorphisms in the transcription factor NRF2 and forearm vasodilator responses in humans. *Pharmacogenet Genomics*, v.22, n.8, p.620-628, 2012.

MARITIM, A.C.; SANDERS, R. A.; WATKINS III, J.B. Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review. **Journal Biochemical Molecular Toxicology**, v.17, n.1, p.24-38, 2003.

MARQUES, R.M.B.; Fornés, N.S.; Stringhini, M.L.F. Fatores socioeconômicos, demográficos, nutricionais e de atividade física no controle glicêmico de adolescentes portadores de diabetes melito tipo 1. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v.55, n. 3, 2011.

MARZEC, J.M.; CHRISTIE, J.D.; REDDY, S.P.; JEDLICKA, A.E.; VUONG, H.; LANKEN, H.; LANKEN, P.N.; APLENC, R.; YAMAMOTO, T.; YAMAMOTO, M.; CHO, H. E KLEEBERGER, S.R. Functional polymorphisms in the transcription factor NRF2 in humans increase the risk of acute. lung injury. **FASEB Journal** V. 21, p.2237-2246, 2007.

MATSUNO, S.; SASAKI, H.; YAMASAKI, H.; YAMAOKA, H.; OGAWA, K.; NAKATANI M.; HAMANISHI, T.; DOI, A.; NAKANO, Y.; WAKASAKI, H.; FURUTA, H.; NISHI, M.; AKAMIZU, T.; NANJO, K. Pro198Leu missense polymorphism of the glutathione peroxidase 1 gene might be a common genetic predisposition of distal symmetric polyneuropathy and macrovascular disease in Japanese type 2 diabetic patients. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 30, p.474-482, 2011.

McMAHON, M.; ITOH, K.; YAMAMOTO, M.; CHANAS, S.A.; HENDERSON, C.J.; McLELLAN, L.I.; WOLF, C.R., CAVIN, C.; AND HAYES, J.D. The Cap 'n' Collar Basic Leucine Zipper Transcription Factor Nrf2 (NF-E2 p45-related Factor 2) Controls Both Constitutive and Inducible Expression of Intestinal Detoxification and Glutathione Biosynthetic Enzymes. **Cancer Research**. v.61, n. 8, p.3299-3307, 2001.

McMAHON, M., THOMAS, N., ITOH, K., YAMAMOTO, M. & HAYES, J. D. Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. **Journal Biological Chemistry**. V. 279, n.30, p. 31556-67, 2004.

MOI, P., CHAN, K., ASUNIS, I., CAO, A. & KAN, Y. W. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. **Proc Natl Acad Sci.**, v.91, p.9926-30, 1994.

MORAES, C.M.; PORTELLA, R.B.; PINHEIRO, V.S.; Marcus M.S. Oliveira, M.M.S.; Fuks, A.G.; Cunha, E.F.; Gomes, M.B. Prevalência de Sobrepeso e Obesidade em Pacientes Com Diabetes Tipo1. Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia, v.47, n.6, 2003.

MOTOHASHI, H.; SHAVIT, J. A.; IGARASHI, K.; YAMAMOTO, M.; ENGEL, J. D. The world according to Maf. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.2953–2959, 1997.

MONTUSCHI, P.; CORRADI, M.; CIABATTONI, G.; NIGHTINGALE, J.; KHARITONOV, A.; BARNES, P.J. Increased 8-Isoprostane, a Marker of Oxidative Stress, in Exhaled Condensate of Asthma Patients. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.160, p.216–220, 1999.

MURROW, B.A.; MUELLER, K.; WOLF, N.M.; PALLAUF, J. mitochondrial regulation of insulin action. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.42, p.1936-1939, 2010.

NAGATOMO, Y.; MEGURO, T.; ITO, H.; KOIDE, K.; ANZAI, T.; FUZUDA, K.; OGAWA, S.; YOSHIKAWA, T. Significance of AT1 receptor independent activation of mineralocorticoid receptor in murine diabetic cardiomyopathy. **Plos One**, v.9, n.3, e93145, 2014 NAIK, R.G.; BROOKS-WORRELL, B.M.; PALMER, J.P. Latent Autoimmune Diabetes in Adults. **Journal Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.94, n.12, p.4635– 4644, 2009.

NAKAMARU, Y.; TAGAMI, K.; UCHIDA, S. Distribution coefficient of selenium in Japanese agricultural soils. **Chemosphere**, v. 58, p. 1347-1354, 2005.

NÈVE, J. Methods in determination of selenium states. **Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health and Disease**, v. 5, p. 1-17, 1991.

NICHOLS, G.A.; GOTLIB, S.J.; SHREEKANT PARASURAMAN, M.S.P.H. Glycemic Control and Risk of Cardiovascular. Disease Hospitalization and All-Cause Mortality. **Journal of the American College of Cardiology**, v.62, n.2, 2013.

NOBAR, M.E.R.; POUR, A.R.; NOBAR, M. R.; BEIG, F.A.; MIRHASHEMI, S.M. Total antioxidant capacity, superoxide dismutase and glutathion peroxidase in diabetic patients. **Medical Journal of Islamic Academy of Sciences** v.12, n.4, p.109-114, 1999.

OBBERGHEN, E.V.; BARON, V.; DELAHAVE, L.; EMANUELLI, B.; FILIPPA, N.; GIORGETTI-PERALDI S, LEBRUN P, MOTHE-SATNEY I, PERALDI P, ROCCHI S, SAWKA-VERHELLE D, TARTARE-DECKERT S, GIUDICELLI J. Surfing the insulin signaling web. **European Journal of Clinical Investigation**, v.31, p.966-977, 2001.

OLDFIELD, J. E. Physical status the use and interpretation of anthropometry. Genebra, WHO, **WHO Technical Reports**. n. 84, 452p, 1995.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Obesity: preventing and managing the global epidemic**. Report of a WHO Consultation (WHO Technical Report Series 894) 252p, 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Elementos traço na nutrição e saúde humana**. São Paulo: Roca, p. 63-91, 1998.

ORTUÑO, J.; ROS, G.; PERIAGO, M. J.; MARTINEZ, C.; LOPEZ, G.; RODRIGO, J. Importancia nutricional del selenio. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 47, n. 1, p. 6-13, 1997.

OPRIS, S.; CONSTANTIN, G.; VALUCH, A. Link between diabetes mellitus and gender-related glutathione peroxidase at elderly patients. **Journal of Diabetes and Metabolism**, v.3, p.154, 2012

OTTEN, J.J.; PITZI, HELLWIG, J.; MEYERS, L.D. (Eds) **Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirement**. Washigton DC: National Academies Press, 2006.

PACHECO, A.M., SCUSSEL V.M. Selenium and Aflatoxin Levels in Raw Brazil Nuts from the Amazon Basin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** , v.55, p.11087–11092, 2007

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

PALSAMY P, SUBRAMANIAN S. Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2-Keap1 signaling. **Biochim Biophys Acta**, v.1812, n.7, p.719–731, 2011.

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

PAZ-Y-MIÑO C, CARRERA C, LÓPEZ-CORTÉS A, MUÑOZ MJ, CUMBAL N, CASTRO B, CABRERA A, SÁNCHEZ ME: Genetic polymorphisms in apolipoprotein E and glutathione peroxidase 1 genes in the Ecuadorian population affected with Alzheimer disease. **American Journal of Medicine Science**, n.340, p.373 – 377, 2010.

PENA, S.D.J.; GIULIANO DI PIETRO, G.D.; FUCHSHUBER-MORAES, M.; GENRO, J.P.; HUTZ, M.H.; KEHDY, F.S.G.; KOHLRAUSCH, F.; MAGNO, L.A.V.; MONTENEGRO, R.C.; MORAES, M.O.; MORAES, M.E.A.; MORAES, M.R.; OJOPI, E.B.; PERINI, J.A.; RACCIOPI, C.; SANTOS, A.K.R.; RIOS-SANTOS, F.; ROMANO-SILVA, M.A.; SORTICA, V.A.; SUAREZ-KURTZ, G. The Genomic Ancestry of Individuals from Different Geographical Regions of Brazil Is More Uniform Than Expected. **PLoS ONE**, v.6, 2011.

PETRI, S.; KÖRNER, S.; KIAE, M. Nrf2/ARE Signaling Pathway: Key Mediator in Oxidative Stress and Potential Therapeutic Target in ALS. **Neurology Research International**. p.1-7, 2012.

PIRES, L. V. **Efeito da suplementação com castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K) na expressão gênica de citocinas inflamatórias e sua relação com o estresse oxidativo em pacientes com diabetes mellitus tipo 1. 2012. 130f.** Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

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

RAJPATHAKS; RIMM, E.; MORRIS, J.S.; HU, F. Toenail Selenium And cardiovascular disease in men with diabetes. **Journal American of College of Nutrition**. v.24, n.4, p.250-256, 2005.

RANGASAMY, T.; CHO, C.Y.; THIMMULAPPA, R.K.; ZHEN, L.; SRISUMA, S. S.; KENSLER, T.W.; YAMAMOTO, M.; PETRACHE, I.; TUDER, R.M.; BISWAL, S. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. **Journal of Clinical Investigation**. v.114, p.1248–1259, 2004.

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

RATNASINGHE D, TANGREA JA, ANDERSEN MR, BARRETT MJ, VIRTAMO J, TAYLOR PR, ALBANES D: Glutathione peroxidase codon 198 polymorphism variant increases lung cancer risk. **Cancer Research**., v.60, p.6381–6383, 2010.

RESZKA E; JABLONSKA E; GROMADZINSKA J; WASOWICZ W. Relevance of selenoprotein transcripts for selenium status in humans. **Genetics And Nutrition**, v.7, n.2, 2011.

- RIBEIRO, A. L. T.; SHIMADA, A. L. B.; HEBEDAA, C. B.; OLIVEIRA, T. F.; LOUREIRO, A. P. M.; PEREIRA-FILHO, W. R.; SANTOS, A. M. A.; LIMA, W. T.; FARSKY, S. H. P. *In: vivo* hydroquinone exposure alters circulating neutrophil activities and impairs LPS-induced lung inflammation in mice. **Toxicology**, v. 288, p.1-7, 2011.
- ROMERO, D. C.; BLANCO, L. F.; SÁNCHEZ, P. H.; RODRÍGUEZ, E.; MAJEM, L. S. Serum selenium concentration in a representative sample of the Canarian population. **Science of the Total Environment**, v. 269, p. 65-73, 2001.
- RORSMAN, P. The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint. **Diabetologia**, v.40, Suppl. 5, p.487-95, 1997.
- RUÍZ, C.; ALEGRÍA, A.; BARBERÁ, R.; FARRÉ, R.; LAGARDA, J. Selenium, zinc and copper in plasma of patients with type 1 diabetes mellitus in different metabolic control states. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.12, n. 2, p.91-95, 1998.
- SABÉ, A. R.; RUBIO, A.; GARCÍA-BELTRÁN, L. Determination of selenium in human blood specimens by electrothermal atomic absorption. **Analytica Chimica Acta**, v. 419, p. 121-35, 2000.
- SABET, E.E.; SALEHI, Z.; KHODAYARI, S.; ZARAFSHAN, S.S.; ZAHIRI, Z. Polymorphisms of glutathione peroxidase 1 (GPX1 Pro198Leu) and catalase (CAT C-262T) in women with spontaneous abortion. **System Biology Reproductive Medicine**, Early Online: 1–4, 2014.
- SALTIEL, A.R.; KAHN, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v.414, p.799-806, 2001.
- SAMBROOK, J.; GETHING, M. J. Protein structure. Chaperones, paperones. **Nature**, v. 342, p. 224-225, 1989.
- SCHNEIDER CD, OLIVEIRA AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.10, n.10, p.308-313, 2004.
- SCHOMBURG, L.; KOHRLE, J. On the importance of selenium and iodine metabolism for thyroid hormone biosynthesis and human health. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, n. 11, p. 1235-1246, 2008.
- SCHMID, H. Impacto cardiovascular da neuropatia autonômica do diabetes mellitus. **Arquivos Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v.51, n.2, 2007.

-
- SEIXAS, T. G.; KEHRIG, H. A. O selênio no meio ambiente. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n. 2, p. 264-276, 2007.
- SENGUPTA, A.; CARLSON, B.A.; WEAVER, J.A.; NOVOSELOV, S.V. FOMENKO, D.E., GLADYSHEV, V.N., HATFIELD, D.L. A functional link between housekeeping selenoproteins and phase II enzymes. **Biochemical Journal**, 2008.
- SHAW, J. E.; SICREE, R. A.; ZIMME, P.Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 87, p. 4-14, 2010.
- SHEENAN, T. M. T; HALL, D. J. Measurement of selenium in clinical specimens. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 36, p. 301-315, 1999.
- SHEN, X.; ZHENG, S.; METREVELI, N.S.; EPSTEIN, P.N. Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy. **Diabetes**, v.55, p.798-805, 2006.
- SHOELSON, S.E.; LEE, J.; GODFINE, A.B. Inflammation and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v.116, n.7, p.1793-1801, 2006.
- SHUVALOVA, YU. A.; KAMINNYI, A. I.; MESHKOV, A. N.; KUKHARCHUK, V. V. Pro198Leu Polymorphism of GPx-1 Gene and Activity of Erythrocytic Glutathione Peroxidase and Lipid Peroxidation Products. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v.149, 2010.
- SINDHU RK, KOO JR, ROBERTS CK, VAZIRI ND. Dysregulation of hepatic superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in diabetes: response to insulin and antioxidant therapies. **Clinical Experimental Hypertension**, v.26, p.43-53, 2004.
- SINGH A, RANGASAMY, T.; THIMMULAPPA RK, LEE H, OSBURN WO, BRIGELIUS-FLOHE R, KENSLE TW, YAMAMOTO M, AND BISWAL S. Glutathione peroxidase 2, the major cigarette smoke-inducible isoform of GPX in lungs, is regulated by Nrf2. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.35, p.639–650, 2006.
- SIGULEM, D.M.; VEIGA, V.G.; PRIORE, S.E. **Obesidade em adolescência de baixa renda**. In: FISBERG, M. Obesidade na infância e na adolescência. São Paulo: Fundo Editorial Byk; 1995.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES - SBD. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**, 2013 e 2014.

- STADTMAN, T.C.; OGASAWARA, Y.; LACOURCIERE, G.M.; ISHII, K. Characterization of potential selenium-binding proteins in the selenophosphate synthetase system. The National Academy of Sciences of the USA. **PNAM**, n.4, v.102, p.1012-1016, 2005.
- STEGHENS, J.P.; KAPPEL, A.L.V.; DENIS, I.; COLLOMBEL, C. Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum. **Free Radical Biology & Medicine**, v.182, p.135-141, 1998.
- STEINBRENNER H1, SPECKMANN B, PINTO A, SIES H. High selenium intake and increased diabetes risk: experimental evidence for interplay between selenium and carbohydrate metabolism. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v.48, n.5, p.40-45, 2011.
- SUN, S. S.; ALTENBACH, S. B.; LEUNG, F. W. **European Journal of Biochemistry**, v.26, p.477- 483, 1987.
- SURH, Y.J. NF- κ B and Nrf2 as potential chemopreventive targets of some anti-inflammatory and antioxidative phytonutrients with anti-inflammatory and antioxidative activities. *Asia Pac J Clin Nutr*, n.17(S1), p.269-272, 2008.
- SUZUKI, K. T. Metabolomics of selenium: Se metabolites based on speciation studies. **Journal of Science**, v.51; n.2, p.107-44, 2005
- SYKIOTIS, G. P.; BOHMANN, D. Stress-Activated Cap'n'collar Transcription Factors in Aging and Human Disease. **National Institute Health Public Access**, v.3, n.112, p.1-45, 2010. .
- TARASOVA; DUSONCHET, J.; ASHCROFT, F. Metabolic regulation of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K⁺ channel: a pas de deux. **Diabetes**, v.53, Suppl 3, p.S113-22, 2004.
- TAYLOR, R.W.; JONES, I.E.; WILLIAMS, S.M.; GOULDING, A. Evolution of waist circumference Evaluation of waist circumference, waist-to-hip ratio, and the conicity index as screening tools for high trunk fat mass, as measured by dual-energy X-ray absorptiometry, in children aged 3–19. **American Journal Clinical Nutrition**, 2000.
- THIMMULAPPA, R. K.; MAI, K. H.; SRISUMA, S.; KENSLER, T. W.; YAMAMOTO, M.; BISWAL, S. Identification of Nrf2-regulated genes induced by the

chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. **Cancer Research**, v.62, p.5196–5203, 2002.

THOMSON, C.D., CHISHOLM, A., MCLACHLAN, S.K., CAMPBELL, J.M. Brazil nuts: an effective way to improve selenium status. **The 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.

UKPDS Group. UKPDS 33: Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. **Lancet** v.352, p.837–851, 1998.

UTE BOETTLER, U.; VOLZ, N.; TELLER, N.; HAUPT, L.M., BAKURADZE, T.; EISENBRAND, G. Induction of antioxidative Nrf2 gene transcription by coffee in humans: depending on genotype? **Molecular Biology Reports**, v.39. p.:7155–7162, 2012.

UTOMO, A.; JIANG, X.; FURUTA, S.; YUN, J.; LEVIN, D.S.; WANG, Y.C.; DESAI, K.V.; GREEN, J.E.; CHEN, P.L.; LEE, W.H. Identification of a novel putative non-selenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential for alleviating oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.43522–43529, 2004.

VAN DAEL, P.; DEELSTRA, H. Selenium. **International Journal for Vitamin and Nutrition**, v. 63, p.312-316, 1993.

VANHAESEBROECK, B.; ALESSI, D.R. The PI3k-PDK1 connection: more than just a road to PKB. **Biochemical journal**, v. 346, p.561-576, 2000.

VARGAS, M.R. AND JOHNSON, J.A. The Nrf2–ARE cytoprotective pathway in astrocytes. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 11, p17, 2009.

VONDERHEIDE, A.P., WROBEL, K., KANNAMKUMARATH, S.S., N B'HYMER, C. MONTES-BAYOÄ, M., LEOÄ, C.P., CARUSO, J.A. Characterization of Selenium Species in Brazil Nuts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.20, 2002.

XIA, P. Identification of the mechanism for the inhibition of Na,K-adenosine triphosphatase by hyperglycemia involving activation of protein kinase C and cytosolic phospholipase A2. **Journal of Clinical Investigation**, n. 96: p. 733-740, 1995.

- XIA, Y.; HILL, K. E.; BYRNE, D. W.; XU, J.; BURK, R. F. Effectiveness of selenium supplements in a low selenium area of China. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 829-834, 2005
- XUE, P.; HOU, Y.; CHEN, Y.; YANG, B.; FU, J.; ZHENG, H.; YARBOROUGH, K.; WOODS, C.G.; LIU, D.; YAMAMOTO, M.; ZHANG, Q.; ANDERSEN, M.E.; AND JINGBO, P. Adipose Deficiency of Nrf2 in ob/ob Mice Results in Severe Metabolic Syndrome. **Diabetes**, v. 62, p.845-854, 2013.
- WALKER, J.N.; RAMRACHEYA, R.; ZHANG, Q.; JOHNSON, P.; BRAUN, M.; RORSMAN, P. Regulation of glucagon secretion by glucose: paracrine, intrinsic or both?! **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v.13, suppl.1, p.95-105, 2011
- WANG, Q; JIN, T. The role insulin signaling in th development of β -cell dysfunction and diabetes. **Landes Bioscience**, v. 2, p.95-101, 2009
- WAKABAYASHI, N.; DINKOVA-KOSTOVA, AT.; HOLTZCLAW, W.D.; KANG, M.I.; KOBAYASHI, A.; YAMAMOTO, M.; KENSLER, T.W.; and TALALAY, P. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.101, p.2040–2045, 2004.
- WEN-RUI, Z.; LI-MEI, L.; TAI-SHAN, Z.; MENG, W. Relationship between Pro198Leu polymorphism of GPx-1 gene and type 2 diabetes mellitus and diabetic coronary heart disease. **Journal of Shanghai Jiaotong University**, 2007.
- WELLS-KNECHT, K. J.; Zyzak, D.V.; Litchfield, J.E.; Thorpe, S.R.; Baynes, J.W. Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. **Biochemistry**, n. 34, p.3702-3709, 1995.
- WHITE, M.E. IRS proteins and the common path to diabetes. **American Journal Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v.282, p.413-422, 2002.
- WILLET, W.C. Issues in analysis and presentation of dietary data. In: _____. Nutritional epidemiology. 2.ed. New York: Oxford University Press, 1998. p.321-345. (Monographs in epidemiology and biostatistics, v.30).

ZACHARA, B. A.; UKLEJA-ADAMOWICZ, M.; NARTOWICZ, E.; LECKA, J. Increased plasma glutathione peroxidase activity in patients with acute myocardial infarction. **Medical Science Monitor**, v.7, p. 415-420, 2001.

ZEĬKOVA, T.V.; GOLUBENKO, M.V.; BUĬKIN, S.V.; BOTKINA, O.I.U.; MAKEEVA, O.A.; LEZHNEV, A.A.; KALIANOV, E.V.; TSIMBALIUK, I.V.; MAKSIMOV,

V.N.; VOEVODA, M.I.; SHIPULIN, V.M.; PUZYREV, V.P. The glutathione peroxidase 1 (GPX1) single nucleotide polymorphism pro198Leu: association with life span and coronary artery disease. **Molecellar Biology**, v.46, n.3, p.481-486, 2012.

ZHANG,H.; LIU, H.; DAVIES, K.J.; SIOUTAS, C.; FINCH, C.E.; MORGAN, T.E.; FORMAN, H.J. Nrf2-regulated phase II enzymes are induced by chronic ambient nanoparticle exposure in young mice with age-related impairments. **Free Radic Biology Medical**, v. 52, n. 9, p. 2038–2046, 2012.

ZHOU, W.; LIU, L.; ZHENG, T.; WEI, M. Relationship between Pro198Leu polymorphism of GPx-1 gene and type 2 diabetes mellitus and diabetic coronary heart disease. **Journal of Shanghai Jiaotong University**, 2007

ANEXOS

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

FICHA DE CADASTRAMENTO

Nº _____

GRUPO: _____

Identificação

Nome: _____ Data: ____/____/____

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

Escolaridade: _____

Escolaridade da mãe: _____ Escolaridade do pai: _____

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

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ Estado: _____

CEP: _____ - _____ Telefones: _____

História Clínica

a) Antecedentes familiares:

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

b) Presença de Doenças? S () N ()

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

Tempo de doença (Diabetes *Mellitus*): _____

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

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

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

Qual? _____ Frequência/intensidade: _____

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

Qual? _____ Quanto/Frequência: _____

Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Grupo Suplementado)

Informações do Sujeito da Pesquisa

Nome:

Documento de Identidade nº: sexo: () M () F

Data de Nascimento: / /

Endereço: nº Compl.....

Bairro: Cidade: Estado:

CEP: Telefones:

Informações do Responsável Legal

Nome:

Documento de Identidade nº: sexo: () M () F

Data de Nascimento: / /

Endereço: nº Compl.....

Bairro: Cidade: Estado:

CEP: Telefones:

Titulo do Projeto de Pesquisa: **“Influência das variações genéticas nos genes da glutathione peroxidase-1, da selenoproteína S e do fator de transcrição Nrf2, no status de selênio e nos biomarcadores inflamatórios e de estresse oxidativo em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 após a suplementação com castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)”.**

Duração da pesquisa: 70 dias

Nome do Pesquisador Responsável: Silvia Maria Franciscato Cozzolino

Cargo / Função: Professora Titular do Programa de Pós-Graduação em Ciências dos alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade São Paulo
FCF/USP Nº do Registro do Conselho Regional: CRN3 / 0621

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade São Paulo - FCF/USP

Meu nome é Silvia Maria Franciscato Cozzolino, sou Prof.^a Titular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP gostaria de convidar você para participar do nosso projeto de pesquisa intitulado **“Influência das variações genéticas nos genes da glutathione peroxidase-1, da selenoproteína S e do fator de transcrição Nrf2, no status de selênio e nos biomarcadores inflamatórios e de estresse oxidativo em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 após a suplementação com castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)”**, com a colaboração da professora Liliane Viana Pires, e das alunas Luciane Luca de Alencar e Leila Leiko Hashimoto. Esta pesquisa terá a duração de 70 dias e é considerada de risco mínimo.

No diabetes *mellitus* existem alterações que afetam o equilíbrio e o bom desenvolvimento dos pacientes que estão com esta doença. Devido a isso, este estudo visa avaliar se o mineral chamado de selênio, importante para diminuir estas alterações, se encontra adequado no seu organismo.

A castanha-do-brasil é um alimento muito rico em selênio, os participantes do estudo deverão consumir ½ noz de castanha por dia, fornecida pela pesquisadora, durante dois meses.

A pesquisa contará com 100 voluntários com diabetes *mellitus* tipo 1, com idade entre 10 e 25 anos, tanto do sexo masculino quanto do feminino e 100 voluntários sem a diabetes *mellitus*, da mesma faixa etária que fará parte do grupo controle.

Serão realizadas análises, no sangue e na urina para avaliar o mineral selênio e também substâncias que indicam o aumento do risco para o desenvolvimento das complicações tardias do diabetes *mellitus*. Também será feita uma análise de alguns componentes dos genes para verificar se estes influenciam a resposta do organismo quanto à suplementação de selênio por meio da castanha-do-brasil. Para isso, serão necessárias no início do acompanhamento e após o término do consumo das castanhas-do-brasil: uma (1) coleta de sangue (12 mL), estando o (a) participante em jejum de no mínimo 10 horas; coletas de urina de 24 horas, em um frasco fornecido pela pesquisadora, o participante deverá guardar este frasco em geladeira até o momento de ser entregue a pesquisadora.

Medidas de peso, altura e da circunferência da cintura, também serão obtidas antes e após a suplementação com a castanha. Será necessário que durante três dias (dois dias durante a semana e um dia no final de semana) sejam anotados todos os alimentos consumidos pelo participante, antes e após a suplementação, para avaliar se o consumo está adequado às necessidades.

Os participantes e responsáveis receberão todas as orientações necessárias para a realização da pesquisa. Na coleta do sangue poderá ocorrer um pequeno desconforto, devido à dor da picada da agulha, podendo surgir uma mancha arroxeadada no local, que logo passa (serão utilizadas seringas e agulhas descartáveis e esterilizadas, e as amostras serão colhidas por profissional experiente).

Além da avaliação nutricional completa que o participante receberá, e se houver necessidade receberá orientação quanto à alimentação que deverá ser seguida para a melhora do quadro, sem nenhum custo financeiro para a família esta pesquisa trará benefícios para a população com diabetes *mellitus* tipo 1, pois existem evidências de que os minerais exercem um efeito protetor ao organismo, equilibrando e contribuindo para bom funcionamento do mesmo.

O participante tem direito de receber informações sobre o andamento da pesquisa, procedimentos utilizados, riscos e benefícios relacionados a esta pesquisa, a fim de esclarecer eventuais dúvidas, e receberão os resultados das análises realizadas.

Também é direito do participante recusar, desistir e/ou retirar seu consentimento de participar desta pesquisa a qualquer momento, sem nenhum transtorno ou prejuízo ao tratamento. Haverá indenização no caso de algum dano decorrente da pesquisa. Não haverá nenhuma despesa financeira para o participante. Também não haverá recompensa financeira relacionada à participação na pesquisa.

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

CONTATO

**Profa Silvia Cozzolino (pesquisadora responsável) ou
Luciane Luca de Alencar (colaboradora - aluna de mestrado)
Telefone: (11) 3091-3625
Laboratório de Nutrição-Minerais / USP.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas/FCF
Av. Lineu Prestes, 580 – Bloco 14 - Cidade Universitária “Armando de Salles
Oliveira” CEP 05508-000 – São Paulo – SP**

CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

Você autoriza o armazenamento do material biológico colhido (sangue e urina):

☐

SIM

☐

NÃO

Caso você autorize o armazenamento do material biológico colhido, um novo projeto de pesquisa poderá ser elaborado e será encaminhado ao Comitê de Ética em

Pesquisa; nesse caso, você será novamente contato, para manifestar-se quanto às novas pesquisas.

Caso você não autorize o armazenamento do material biológico colhido, ao término do presente projeto de pesquisa todo o material biológico colhido será descartado, conforme procedimentos apropriados.

São Paulo, de de

Assinatura do sujeito de pesquisa
Ou responsável legal

Assinatura do pesquisador responsável

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

Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Grupo Controle)

Informações do Sujeito da Pesquisa

Nome:

Documento de Identidade nº: sexo: () M () F

Data de Nascimento: / /

Endereço: nº Compl.....

Bairro: Cidade: Estado:

CEP: Telefones:

Informações do Responsável Legal

Nome:

Documento de Identidade nº: sexo: () M () F

Data de Nascimento: / /

Endereço: nº Compl.....

Bairro: Cidade: Estado:

CEP: Telefones:

Titulo do Projeto de Pesquisa: **“Influência das variações genéticas nos genes da glutathione peroxidase-1, da selenoproteína S e do fator de transcrição Nrf2 no status de selênio e nos biomarcadores inflamatórios e de estresse oxidativo em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 após a suplementação com castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)”.**

Duração da pesquisa: 7 dias

Nome do Pesquisador Responsável: Silvia Maria Franciscato Cozzolino

Cargo / Função: Professora Titular do Programa de Pós-Graduação em Ciências dos alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade São Paulo FCF/USP

Nº do Registro do Conselho Regional: CRN3 / 0621

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade São Paulo -
FCF/USP

Meu nome é Silvia Maria Franciscato Cozzolino, sou Prof.^a Titular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, gostaria de convidar você para participar do nosso projeto de pesquisa intitulado **“Influência das variações genéticas nos genes da glutathione peroxidase-1, da selenoproteína S e do fator de transcrição Nrf2, no status de selênio e nos biomarcadores inflamatórios e de estresse oxidativo em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 após a suplementação com castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.)”**, com a colaboração da professora Liliane Viana Pires e das alunas Luciane Luca de Alencar e Leila Leiko Hashimoto. Esta pesquisa terá a duração de 7 dias e é considerada de risco mínimo.

Na doença diabetes *mellitus* tipo1 existem alterações que afetam o equilíbrio e o bom desenvolvimento do organismo. Nesta pesquisa, queremos comparar resultados de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e voluntários saudáveis. Este estudo tem como objetivo avaliar o estado nutricional de indivíduos relativo ao mineral selênio, importante para diminuir alterações causadas pela doença.

Ao todo, a pesquisa contará com 100 voluntários com diabetes *mellitus* tipo 1, com idade entre 10 e 25 anos, tanto do sexo masculino quanto do feminino e 100 voluntários sem a doença e da mesma faixa etária que fará parte do grupo controle.

Serão realizadas análises no sangue e na urina, para avaliar o mineral selênio e também substâncias que indicam o aumento do risco para o desenvolvimento do diabetes mellitus. Também será feita uma análise de alguns componentes dos genes para verificar se estes influenciam a resposta do organismo quanto à suplementação de selênio por meio da castanha-do-brasil. Para isso, serão necessárias uma (1), coleta de sangue (12 mL), estando o participante em jejum de no mínimo 10 horas; e, coleta de urina de 24 horas, em um frasco fornecido pela pesquisadora. O participante deverá guardar esse frasco em geladeira até o momento de ser entregue a pesquisadora.

Medidas de peso, altura e da circunferência da cintura também serão obtidas. Será necessário que durante três dias (dois dias durante a semana e um dia no final de semana) sejam anotados todos os alimentos consumidos pelo participante para avaliar se o consumo está adequado às necessidades.

Os participantes e responsáveis receberão todas as orientações necessárias para a realização da pesquisa. Na coleta do sangue poderá ocorrer um pequeno desconforto, devido à dor da picada da agulha, podendo surgir uma mancha arroxeadada no local, que logo passa (serão utilizadas seringas e agulhas descartáveis e esterilizadas e as amostras serão colhidas por profissional experiente).

Além da avaliação nutricional completa, que o participante receberá, sem nenhum custo financeiro para a família, esta pesquisa trará benefícios para a população com diabetes *mellitus* tipo 1, pois existem evidências de que os minerais exercem um efeito protetor no organismo, equilibrando e contribuindo para bom funcionamento do organismo.

O participante tem direito de receber informações sobre o andamento da pesquisa, procedimentos utilizados, riscos e benefícios relacionados a esta pesquisa, a fim de esclarecer eventuais dúvidas, e receberão os resultados das análises realizadas.

Também é direito do participante recusar, desistir e/ou retirar seu consentimento de participar desta pesquisa a qualquer momento, sem nenhum transtorno. Haverá indenização no caso de algum dano decorrente da pesquisa. Não haverá nenhuma despesa financeira para o participante. Também não haverá recompensa financeira relacionada à participação na pesquisa.

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

CONTATO

**Profª Silvia Cozzolino (pesquisador responsável) ou
Luciane Luca de Alencar (colaboradora - aluna de mestrado)**
Telefones: (11) 3091-3625
Laboratório de Nutrição-Minerais
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas/FCF
Universidade São Paulo/USP
Av. Lineu Prestes, 580 – Bloco 14 - Cidade Universitária “Armando de Salles
Oliveira” CEP 05508-000 – São Paulo – SP**

CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

Você autoriza o armazenamento do material biológico colhido (sangue e urina):

☐

SIM

☐

NÃO

Caso você autorize o armazenamento do material biológico colhido, um novo projeto de pesquisa poderá ser elaborado e será encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa; nesse caso, você será novamente contato, para manifestar-se quanto às novas pesquisas.

Caso você não autorize o armazenamento do material biológico colhido, ao término do presente projeto de pesquisa todo o material biológico colhido será descartado, conforme procedimentos apropriados.

São Paulo, de de

Assinatura do sujeito de pesquisa
Ou responsável legal

Assinatura do pesquisador responsável

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

FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência das variações genéticas nos genes da glutathione peroxidase-1, da selenoproteína S e do fator de transcrição Nrf2 no status de selênio e nos biomarcadores inflamatórios e de estresse oxidativo em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 após a suplementação com castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.).

Pesquisador: Sílvia Maria Franciscato Cozzolino

Área Temática: Área 1. Genética Humana.

(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

Versão: 3

CAAE: 10951313.7.0000.0067

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

Patrocinador Principal: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 353.246

Data da Relatoria: 06/08/2013

Apresentação do Projeto:

Considerando que a castanha-do-brasil é uma excelente fonte de selênio e que este elemento, além de participar do sistema de defesa antioxidante, possui propriedades anti-inflamatórias, por meio da inibição do NF- κ B, reduzindo a expressão de genes que codificam proteínas envolvidas nesta resposta, este trabalho foi proposto. Cabe destacar que polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) presentes nos genes de selenoproteínas, como a GPx1 e a selenoproteína S, e do fator de transcrição Nrf2, podem influenciar diferentes processos oxidativos e, portanto a inflamação. Assim, o objetivo deste trabalho será avaliar a influência dos SNPs: PRO198LEU, presente no gene da glutathione peroxidase 1, do 105G>A, presente na região promotora do gene da selenoproteína S e do -617C>A, na região promotora do gene do fator de transcrição Nrf2, sobre o estado nutricional relativo ao selênio, o estresse oxidativo e os biomarcadores inflamatórios de pacientes com diabetes mellitus tipo 1 após a suplementação com castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). Este estudo será de natureza longitudinal. Serão selecionados 100 pacientes com diabetes mellitus tipo 1, com idade entre 10 e 25 anos, que receberão a suplementação com cerca de

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112

Bairro: Butantã

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-3622

Fax: (11)3031-8986

E-mail: cepfcf@usp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 353.246

290 ug de selênio, por meio da ingestão de castanha-do-brasil, durante sessenta dias. Antes e após a intervenção, serão avaliados os parâmetros bioquímicos relativos ao status de selênio, perfil lipídico, glicemia, estresse oxidativo, resposta inflamatória, bem como a genotipagem dos SNP presentes nos genes da GPx1 (PRO198LEU), da selenoproteína S(105G>A) e do fator de transcrição Nrf2 (-617C>A) e a expressão gênica de TNF- α , IL-1 β , IL-6, GPx1 e selenoproteína S em células do sangue total. A avaliação da composição corporal será realizada por meio de bioimpedância e de medidas de peso, estatura e circunferência da cintura. Será avaliada a ingestão alimentar por meio de registro alimentar de três dias e a análise será feita por meio do software NutWin, da Escola Paulista de Medicina/UNIFESP.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a influência genética de alguns SNPs sobre o estado nutricional relativo ao selênio, estresse oxidativo e biomarcadores inflamatórios em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 após a suplementação com castanha-do-brasil.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Esta pesquisa poderá trazer benefícios para a população com diabetes mellitus tipo 1, pois existem evidências de que os minerais exercem efeito protetor no organismo, equilibrando e contribuindo para bom funcionamento do organismo. Todos os participantes passarão por uma avaliação nutricional completa, sem nenhum custo financeiro para a família e, será dada orientação quanto à alimentação que deverá ser seguida para a melhora do quadro. Além disso, alguns dos exames realizados nesta pesquisa não são realizados rotineiramente pelo sistema de saúde. Os riscos são ops inerentes à coleta de amostras biológicas: sangue (12 mL) e urina de 24h.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está bem descrito e a metodologia está adequada. A pesquisa é importante, pois deverá fornecer importantes informações a respeito do papel do selênio e das características genéticas sobre o sistema de defesa antioxidante do organismo em pacientes com diabetes mellitus tipo 1.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi acrescentado o texto no TCLE, conforme recomendação do CEP.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Tendo em vista as considerações acima, este CEP entende que o projeto está aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

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

FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 353.246

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista as considerações acima, este CEP entende que o projeto está aprovado.

SAO PAULO, 08 de Agosto de 2013

Assinador por:
Mauricio Yonamine
(Coordenador)

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

DADOS ANTROPOMÉTRICOS:

Estatura _____ cm Peso _____ kg CC: _____ cm

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

BIOIMPEDÂNCIA

% massa gordura: ____/____/____

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

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

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

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

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

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

OBSERVAÇÕES:

ACOMPANHAMENTO NUTRICIONAL

Nome: _____

☐ Grupo: _____ Nº _____

Responsável: Nutricionista Lilliane Viana Pires
Nº USP: 5507230
Telefone: (11) 8518-6420

INFORMAÇÕES

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

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

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

Lilliane Viana Pires
Doutoranda em Ciência dos Alimentos – FCF/USP

São Paulo/SP - 2010

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

1. Nome do Paciente: _____

Documento de Identidade Nº: _____ Sexo: () M () F

Data de Nascimento:/...../.....

Endereço: Nº: Apto:

Bairro: Cidade:

CEP: Telefone:

2. Responsável Legal: _____

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

Documento de Identidade Nº: _____ Sexo: () M () F

Data de Nascimento:/...../.....

Endereço: Nº: Apto:

Bairro: Cidade:

CEP: Telefone:

INSTRUÇÕES QUANTO À OBTENÇÃO DE URINA DE 24 HORAS

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

A urina deverá ser obtida da seguinte forma:

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

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

ORIENTAÇÕES QUANTO AO REGISTRO DOS ALIMENTOS

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

4

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

5

MEDIDAS CASEIRAS

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

6

MEDIDAS CASEIRAS

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

7