UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS
Área de Nutrição Experimental

Status de selênio de uma população residente em área de risco de contaminação por mercúrio. Influência de polimorfismos e ação sobre o estresse oxidativo.

Ariana Vieira Rocha

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientadora: Prof^a. Titular Silvia Maria Franciscato Cozzolino

Co-orientadora: Prof^a. Déborah Inês Teixeira Fávaro

SÃO PAULO

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS
Área de Nutrição Experimental

Status de selênio de uma população residente em área de risco de contaminação por mercúrio. Influência de polimorfismos e ação sobre o estresse oxidativo

Ariana Vieira Rocha

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientadora: Prof^ª. Titular Silvia Maria Franciscato Cozzolino

Co-orientadora: Prof^ª. Déborah Inês Teixeira Fávaro

SÃO PAULO

2015

Ariana Vieira Rocha

Status de selênio de uma população residente em área de risco de contaminação por mercúrio. Influência de polimorfismos e ação sobre o estresse oxidativo

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof^a. Titular Silvia Maria Franciscato Cozzolino
(Orientadora/Presidente)

1º. Examinador

2º. Examinador

3º. Examinador

4º. Examinador

SÃO PAULO, ____ de _____ de 2015.

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

<p>Rocha, Ariana Vieira</p> <p>R672es Status de selênio de uma população residente em área de risco de contaminação por mercúrio. Influência de polimorfismos e ação sobre o estresse oxidativo / Ariana Vieira Rocha. -- São Paulo, 2015.</p> <p>123p.</p> <p>Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental</p> <p>Orientador : Cozzolino, Silvia Maria Franciscato</p> <p>Co-orientador : Fávaro, Déborah Inês Teixeira</p> <p>1. Nutrição experimental : Ciência dos alimentos 2. Selênio 3. Estresse oxidativo 4. Mercúrio 5. Polimorfismo I. T. II. Cozzolino, Silvia Maria Franciscato, orientador, III. Fávaro, Déborah Inês Teixeira, co-orientador.</p> <p style="text-align: right;">641.1 CDD</p>

Gastei uma hora pensando um verso que a pena não quer escrever.

No entanto ele está cá dentro, inquieto, vivo.

Ele está cá dentro e não quer sair.

Mas a poesia deste momento inunda minha vida inteira.

Carlos Drumonnd de Andrade.

A todas as **voluntárias** desta pesquisa, pelo carinho, esforço e dedicação.

Às amigas **Daniela Zancan, Dayane Zancan, Laís Maria e Larissa Matheus**, pela ajuda imensurável durante a coleta de dados.

Especialmente, aos meus tios, **Ivanilde Rocha e Cristovão Vieira**, que me ergueram no momento em que mais precisei.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que me ilumina e dá forças para seguir sempre em frente, e ao **Espírito Santo**, por todas as bênçãos.

À luz da minha vida, minha mãe, **Nair Lima**, por tudo que tem feito e ainda faz por mim. Meu modelo de índole e dignidade. Meu amuleto!

À orientadora, **Silvia Maria Franciscato Cozzolino**, exemplo de serenidade em momentos de dificuldades. Sou muito grata pela oportunidade de ter sido sua aluna e orientanda. Obrigada ainda, por ter me abraçado desde o primeiro momento.

À professora **Déborah Fávaro**, pensar em você me causa garra e alegria! Obrigada pela parceria e disponibilidade na realização das análises de mercúrio. Foi um prazer indescritível tê-la ao meu lado na bancada.

À **Julie Christine, Luana Janaína, Cleonilce Oliveira, Gisele Dias, Natsue Kosin, Larissa Freitas, Luana Cardozo e Yara Salviano**, por disponibilizarem do seu tempo por uma causa, a ciência!

À **Jamile Sadeck, Dina Horeay e Analu Barofaldi**, seres de luz que deram ajuda a uma desconhecida sem pedir nada em troca, e se hoje esta jornada está sendo concretizada... também é graças a vocês. Ensinarão-me, na prática, a fazer o bem sem olhar a quem! Que esta bondade esteja sempre comigo para que eu possa passá-la adiante.

À **Gabriela Pellucio (Gabi pelúcia)** e sua mãe **Mirian Guizelini**, que abraçaram a minha causa e pela ampla ajuda em conseguir voluntárias. Querida Gabi, obrigada pelo carinho, você foi um anjinho na minha vida!

À amiga **Silvane Maziero**, assim como ao **Flávio Terassini**, ao **Thiago Abiorana** e à **Helen Queite**, pela divulgação da pesquisa em seus ambientes de estudo e/ou trabalho. Obrigada de coração!

À **Juliana Closs**, por permitir a divulgação do projeto no curso de nutrição da Faculdade São Lucas (FSL).

À **Mariana Modesto, Roberta Valmorbida, Simone Oliveira e Alcione Altini** por não hesitarem em ajudar esta colega de classe na divulgação da pesquisa no ambiente das Faculdades Integradas Aparício Carvalho (FIMCA).

À “nossa” equipe do laboratório de Nutrição-Minerais, **Alexandre Pimentel, Bárbara Cardoso, Bruna Reis, Graziela Biude, Isabela Saraiva, Janaina Donadio, Kaluce Almondes**,

Kátia Callou, Larissa Bezerra, Leila Hashimoto, Luciane Alencar e Verônica Bandeira, por serem apoio, companhia e ajuda nos trabalhos realizados no cotidiano. Especialmente,

À **Bruna Reis (Rabin) e Isabela Saraiva (Isa nojentinha do meu coração)**, que me proporcionaram uma amizade de cunho profissional e pessoal, tornando esta jornada mais viva, leve e muito alegre! Por todos os braços e abraços servidos nos momentos de ajuda sem horário para acabar. Por me fazerem lembrar desse trio com um enorme sorriso no rosto!

À **Kaluce Almondes (Kaká)**, querida companheira de análises que pareciam intermináveis (risos), obrigada pela parceria, conversas filosóficas e gargalhadas constantes, inclusive em momentos de aflição.

À **Liliane Viana Pires (Lili medalhinha)**, luz em todos os momentos (desde 2006). Mesmo com a distância geográfica existente entre nós, você é sempre presente! Agradeço ainda, por despertar em mim a vontade de ser sempre melhor.

Às florzinhas da Liliane Pires, **Leila Hashimoto (Leilinha), Luciane Alencar (Lu) e Verônica Bandeira (Vê)**, pela ajuda durante as análises de enzimas, mesmo com tantos afazeres e por me tratarem sempre com muito carinho e atenção.

À **Bárbara Cardoso**, pelo abraço apertado que diz muito em cada encontro!

Às **Fernandas, Santana e Shinagawa**, agradeço a ajuda, a companhia, a diversão e a amizade construída, principalmente, nos momentos extras de trabalho, já que nem sempre conseguíamos acabar no horário do expediente em virtude do número de amostras (risos).

À **Lilian Mendes**, apoio e alicerce fundamentais nos últimos meses, que através do seu coração, profissionalismo e vivência de mundo, ensinou-me a aceitar e conviver com o meu eu interior e com a minha alma!

Ao meu irmão de coração, **Guilber Diniz Barros**, pela força e energia enviada, por todas as conversas na tentativa de me distrair ou esquecer algo, por me ajudar à distância, e principalmente, por me ensinar a levantar sem lágrimas nos olhos e de cabeça erguida.

À **Fabiana Yasuhara**, da Assessoria Científica *Life Technologies*, pelo suporte fundamental realizado durante as análises do polimorfismo de deleção GSTM1.

À funcionária **Maria de Lurdes Pedrosa (Lurdinha)**, pelo otimismo, carinho e pelas palavras “no fim tudo dá certo”.

RESUMO

ROCHA, A.V. **Status de selênio de uma população residente em área de risco de contaminação por mercúrio. Influência de polimorfismos e ação sobre o estresse oxidativo.** 2015. 133f. (Tese de Doutorado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF), Universidade de São Paulo (USP). 2015.

Estudos apontam que a região Amazônica apresenta concentrações significativas de selênio nos solos e que, por isso, a população não estaria susceptível à deficiência desse mineral. Em contrapartida, a região também apresenta dados de concentrações elevadas de mercúrio nos solos e rios, entretanto, a população não apresenta sinais clínicos evidentes de contaminação. Acredita-se que o selênio, um mineral antioxidante, possa ser um possível colaborador para a aparente tolerância ao mercúrio, pois uma das ações desse mineral é a de destoxificar o organismo contra metais tóxicos. Dependendo das concentrações no organismo, o mercúrio pode potencializar a geração das espécies reativas de oxigênio e, dessa forma, as defesas antioxidantes intrínsecas das células podem ser prejudicadas, resultando na condição conhecida por estresse oxidativo. A contaminação por mercúrio pode, ainda, comprometer a saúde tanto das mulheres quanto das crianças, pois esse metal, na forma de metilmercúrio, pode atravessar a barreira placentária e se concentrar, principalmente, no cérebro do feto. Aliado a isso, a presença de polimorfismos em certos genes podem alterar a expressão de enzimas antioxidantes como a glutathione peroxidase 1, que é dependente de selênio, assim como da glutathione S-transferase, que atua na destoxificação do mercúrio no organismo. Vários estudos apresentam dados de concentrações de mercúrio em ribeirinhos da Amazônia, no entanto, resultados referentes às concentrações de selênio, ao estresse oxidativo e a polimorfismos genéticos na população da área urbana são raros. Diante disso, este estudo objetivou avaliar o estado nutricional relativo ao selênio, concentrações de mercúrio e a possível relação desses parâmetros com o estresse oxidativo e os polimorfismos Pro198Leu (rs 1050450) no gene da glutathione peroxidase 1 e GSTM1 no gene da glutathione S-transferase em mulheres em idade fértil residentes em área de risco de exposição ao mercúrio, da cidade de Porto Velho (RO). As voluntárias foram avaliadas por meio de medidas antropométricas (peso, estatura e circunferência da cintura) e aplicou-se o registro alimentar para avaliação do consumo alimentar. Realizou-se uma coleta de sangue para análise de selênio, atividade da enzima glutathione peroxidase, marcadores de estresse oxidativo e polimorfismos genéticos. O selênio foi determinado por espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos acoplados à cela de quartzo (HGQTAAS). Para análise de mercúrio, foi coletada uma amostra do cabelo das voluntárias, sendo sua concentração determinada pelo método de espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV AAS). Para avaliar o estresse oxidativo foram determinadas: a concentração plasmática de Malondialdeído (MDA) e a Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio (ORAC). Participaram do estudo 200 mulheres com idade entre 19 e 50 anos. A ingestão alimentar média de selênio foi de $49,3 \pm 19,2$ µg/dia e a prevalência de ingestão inadequada foi de 40,9%. As concentrações médias do mineral no plasma e nos eritrócitos foram, respectivamente, $49,8 \pm 18,6$ µg/L e $75,4 \pm 29,9$ µg/L. A atividade média da glutathione peroxidase foi de $45,1 \pm 19,4$ U/g Hb. A concentração média de mercúrio nos cabelos foi de 625 ± 766 ng g⁻¹. Ao avaliar a presença do SNP Pro198Leu, observou-se que 56,7% das participantes apresentaram genótipo selvagem, 36,8% heterozigotos e 6,8% homoizgotos para leucina. Quanto ao polimorfismo de deleção GSTM1, 42,5% das voluntárias apresentaram o genótipo nulo ou deletado, ou seja, relacionado a ausência de expressão da glutathione S-transferase. Esses resultados permitem concluir que a maioria das participantes apresentou estado nutricional deficiente em relação ao selênio. Apesar disso, tanto a atividade enzimática da glutathione peroxidase, como os biomarcadores

do estresse oxidativo não sofreram interferência desta deficiência. O polimorfismo Pro198Leu, também não interferiu no *status* de selênio e no estresse oxidativo. Quanto à avaliação do polimorfismo GSTM1, o genótipo nulo ou deletado também não mostrou associação com as concentrações de mercúrio e o estresse oxidativo.

Palavras-chave: selênio, estresse oxidativo, polimorfismo genético e mercúrio.

ABSTRACT

ROCHA, A.V. **Selenium status of a population living in a mercury contamination risk area. Influence of polymorphisms and action on oxidative stress.** 2015. 133f. (Tese de Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Studies have shown that the Amazon region has significant concentrations of selenium in soils and therefore, the population is not susceptible to deficiency of this mineral. However, the region also presents data from high levels of mercury in soils and rivers, however, the population has no obvious clinical signs of contamination. It is believed that selenium, an antioxidant mineral may be a possible contributor to the apparent tolerance because of its actions in the detoxification of the body from toxic metals. Depending on the concentrations in the body, mercury can increase the generation of reactive oxygen species and thus the intrinsic antioxidant defenses of cells can be damaged, resulting in the condition known as oxidative stress. The mercury contamination may also compromise the health of both women and children, since this metal in the form of methylmercury can cross the placental barrier and concentrate mainly in the fetal brain. In addition, the presence of genetic polymorphisms can alter the expression of antioxidant enzymes such as glutathione peroxidase 1, which is selenium dependent, as well as glutathione S-transferase, which can be responsible for the mercury detoxification in the body. Several studies have shown mercury levels of riverine people from Amazon, however, results regarding selenium concentrations, oxidative stress and polymorphisms in the urban population are area. Thus, this study aimed to evaluate selenium status, mercury levels and the possible relationship of these with oxidative stress and genetic polymorphisms Pro198Leu (rs 1050450) in glutathione peroxidase 1 gene and GSTM1 in the glutathione S-transferase gene in women living in mercury exposure risk area, from the city of Porto Velho (RO). The of the volunteers was assessed using anthropometric measurements (weight, height and waist circumference) and evaluation of food consumption, by the food record. Blood samples were collected for selenium analysis, glutathione peroxidase enzyme's activity, oxidative stress and genetic polymorphisms. Selenium was determined by hydride generation quartz tube atomic absorption spectroscopy (HGQT AAS). For mercury analysis, a hair sample of volunteers was collected, and its concentration was determined by atomic absorption spectrometry method with cold vapor (CV AAS). To evaluate oxidative stress plasma concentrations of malondialdehyde (MDA) and Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) were determined We enrolled 200 volunteers aged between 19 and 50. The average of selenium intake was $49,3 \pm 19,2$ $\mu\text{g/day}$ and the prevalence of inadequate intake was 40,9%. Mean selenium concentration on plasma and erythrocytes were respectively $49,8 \pm 18,6$ $\mu\text{g/L}$ and $75,4 \pm 29,9$ $\mu\text{g/L}$. Glutathione peroxidase showed mean activity of $45,1 \pm 19,4$ U/g Hb and mercury levels of 625 ± 766 ng g^{-1} . Evaluating the presence of the SNP Pro198Leu, it was observed that 56,7% of the were participants had wild type genotype, 36,8% heterozygous and 6,8% were homozygous for leucine. For the GSTM1 null deletion polymorphism, 42,5% of the volunteers had a null genotype, ie, do not express the enzyme glutathione S-transferase. These results indicate that the majority of participants had selenium deficiency in plasma and erythrocytes. Nevertheless, most of them had adequate activity of glutathione peroxidase. There was no association between selenium concentrations and the biomarkers used to assess oxidative stress. The Pro198Leu polymorphism did not interfere in selenium concentrations, as well as in the oxidative stress. The evaluation of GSTM1 polymorphism had no association with mercury levels and oxidative stress.

Keywords: selenium, oxidative stress, polymorphisms and mercury.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Concentração de Se ($\mu\text{g/g}$) em castanha-do-brasil da região Amazônica	22
Quadro 2.	Ingestão Dietética de Referência (DRIs) relativas ao Se em $\mu\text{g/dia}$ a partir de um ano de idade de acordo com o <i>Institute of Medicine</i> (IOM, 2006)	23
Quadro 3.	Frequência genotípica do polimorfismo Pro198Leu (rs 1050450) no gene que codifica para GPx 1 encontrada em pesquisas realizadas no Brasil por pesquisadores do Laboratório de Nutrição e Minerais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP)	37
Quadro 4.	Distribuição da frequência do polimorfismo GSTM1(A/B/AB/0) no gene da GST em diferentes etnias	39
Quadro 5.	Classificação do Índice de Massa Corpórea (IMC) para adultos, segundo WHO, (2000).....	45
Quadro 6.	Intervalos de recomendação da distribuição de macronutrientes em percentual de contribuição energética (AMDR) de acordo com IOM (2006)	46
Quadro 7.	Valores de referências adotados para concentração de Se no plasma e eritrócitos	47
Quadro 8.	Resultados das análises dos materiais de referência utilizados na determinação de Hg total	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características socioeconômicas das voluntárias.....	55
Tabela 2.	Classificação das participantes segundo o IMC.....	56
Tabela 3.	Ingestão alimentar de Se ($\mu\text{g}/\text{dia}$) das participantes ($n = 194$).....	59
Tabela 4.	Concentração de Se ($\mu\text{g}/\text{L}$) no plasma e nos eritrócitos das participantes ($n=194$).....	61
Tabela 5.	Coeficiente de regressão da ingestão alimentar de Se ($\mu\text{g}/\text{dia}$) como variável independente que influenciou a concentração do mineral no plasma ($\mu\text{g}/\text{L}$) das participantes.....	64
Tabela 6.	Coeficiente de regressão da ingestão alimentar de Se ($\mu\text{g}/\text{dia}$) como variável independente que influenciou a concentração do mineral nos eritrócitos ($\mu\text{g}/\text{L}$) das participantes.....	64
Tabela 7.	Coeficiente de regressão das variáveis independentes que influenciaram as concentrações de Hg (ng g^{-1}) nos cabelos (variável dependente) das participantes.....	71
Tabela 8.	Coeficiente de regressão das variáveis independentes que influenciaram a capacidade antioxidante – ORAC (mmol eq. trolox/g de amostra) (variável dependente) das participantes.....	71
Tabela 9.	Coeficiente de regressão das variáveis independentes que influenciaram a concentração plasmática de MDA (μM) (variável dependente) das participantes.....	72
Tabela 10.	Distribuição do SNP Pro198Leu (rs 1050450) no gene que codifica para a GPx 1 nas participantes ($n=190$).....	73
Tabela 11.	Concentrações de Se plasmático e eritrocitário, atividade da enzima GPx, MDA e ORAC, de acordo com o genótipo para o polimorfismo Pro198Leu (rs1050450) no gene que codifica a GPx.....	76
Tabela 12.	Distribuição do polimorfismo GSTM1 no gene da GST das participantes ($n = 180$).....	76
Tabela 13.	Concentrações de Hg, de MDA e ORAC de acordo com o genótipo para o polimorfismo GSTM1 no gene da GST das participantes.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

Se	- Selênio
Hg	- Mercúrio
MeHg	- Metilmercúrio
dimetilHg	- Dimetilmercúrio
GPx	- Glutathione Peroxidase
GST	- Glutathione S-Transferase
GR	- Glutathione Redutase
GSH	- Glutathione Reduzida
SOD	- Superóxido Dismutase
Hb	- Hemoglobina
T₃	- Tri-iodotironina
T₄	- Tiroxina
SeO₃²⁻	- Selenito
SeO₄²⁻	- Selenato
Cd	- Cádmio
Rd	- Rádio
As	- Arsênio
Cu	- Cobre
Ag	- Prata
Pb	- Chumbo
Pt	- Platina
DRI	- Recomendação de Ingestão de Referência
EAR	- Necessidade Média Estimada
UL	- Nível Máximo de Ingestão Tolerável
RDA	- Ingestão Dietética Recomendada
EER	- Necessidade Energética Estimada
AMDR	- Acceptable Macronutrient Distribution Range
IOM	- Institute of Medicine
ADI	- Ingestão Diária Aceitável
PTWI	- Ingestão Semanal Tolerável Provisória
DCNT	- Doenças Crônicas não Transmissíveis

WHO	- World Health Organization
AP	- Amapá
PA	- Pará
RO	- Rondônia
AM	- Amazonas
EDTA	- Ácido Etilenodiamino Tetracético
O₂	- Oxigênio
ERO	- Espécies Reativas de Oxigênio
ERN	- Espécies Reativas de Nitrogênio
RSS e SR	- Selenosulfidos
SNP	- Single Nucleotide Polymorfism
STR	- Simple Tandem Repeats
VNTR	- Variable Number of Tandem Repeats
PCK	- Proteína Quinases
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
C	- Citocina
T	- Timina
SDM	- Seleno Dimetil – Mercúrio
MDA	- Malondialdeído
ORAC	- Capacidade Antioxidante
8-OHdG	- 8 Hidroxidodesoxiguanosina
CONAMA	- Conselho Nacional do Meio Ambiente
Na	- Sódio
Se-Met	- Selenometionina
m/v	- Massa/Volume
P.A.	- Pureza Analítica
LAN	- Análise por Ativação Neutrônica
AOAC	- Association of Official Analytical Chemists
NCHS	- National Center of Health and Statistics
HGQTAAS	- Espectrometria de Absorção Atômica por Geração de Hidretos Acoplados à Cella de Quartzo
CVAAS	- Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio
IPEN	- Instituto de Pesquisa Energética Nuclear
IMC	-Índice de Massa Corpórea

CC	- Circunferência da Cintura
LD	- Limite de Detecção
LQ	- Limite de Quantificação
PNJ	- Parque Nacional do Jaú
IAEA	- Agência Internacional de Energia Atômica
UNIR	- Universidade Federal de Rondônia
SEDUC	- Secretaria de Educação
SESAU	- Secretaria da Saúde
ABESO	- Associação Brasileira para Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica
LAN/CRPq	- Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica
IPEN/CNEN	- Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares
FCF	- Faculdade de Ciências Farmacêuticas
USP	- Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 SELÊNIO	20
2.1.1 Fontes, Biodisponibilidade e Recomendação	21
2.1.2 Aspectos Fisiológicos: Absorção, Biodisponibilidade, Armazenamento e Excreção	24
2.1.3 Funções e Ações	25
2.1.4 Deficiência e Toxicidade	29
2.2 MERCÚRIO.....	30
2.3 ESTRESSE OXIDATIVO.....	33
2.4 POLIMORFISMOS.....	35
2.4.1 Polimorfismo Pro198Leu (rs 1050450) no Gene da GPx	36
2.4.2 Polimorfismo GSTM1 no Gene da GST	38
3. OBJETIVOS	41
3.1 OBJETIVO GERAL.....	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4. METODOLOGIA.....	42
4.1 CASUÍSTICA E DELINEAMENTO.....	42
4.2 COLETA DE DADOS.....	42
4.3 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA	45
4.4 CONSUMO ALIMENTAR.....	46
4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SELÊNIO NO PLASMA E ERITRÓCITOS	47
4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GPx.....	48
4.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE MERCÚRIO NOS CABELOS	48
4.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE MALONDIALDEÍDO ...	50
4.9 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DE RADICAIS DE OXIGÊNIO..	51
4.10 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS....	52
4.10.1 Determinação do Polimorfismo Pro198Leu (rs 1050450).	52
4.10.2 Determinação do Polimorfismo GSTM1.....	53
4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO	54
5.2 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA	55
5.3 CONSUMO ALIMENTAR.....	57

5.4	MARCADORES BIOQUÍMICOS DO ESTADO NUTRICIONAL RELATIVO AO SELÊNIO	60
5.5	SEÊNIO E ATIVIDADE DA ENZIMA GP _x 1	65
5.6	SELÊNIO E CONCENTRAÇÕES DE MERCÚRIO	67
5.7	SELÊNIO E AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO: MDA E ORAC	71
5.8	POLIMORFISMO PRO198LEU	73
5.9	POLIMORFISMO GSTM1	76
6.	CONCLUSÃO	80
7.	CRONOGRAMA	81
	REFERÊNCIAS	82
	APÊNDICES	100
	ANEXOS	118

1. INTRODUÇÃO

O selênio (Se) é um mineral traço essencial para a biologia humana e esta essencialidade foi reconhecida em 1979, apesar deste elemento ter sido descoberto em 1817. Dentre as funções atribuídas a este mineral, destacam-se a função antioxidante e proteção contra ação nociva de metais tóxicos, além de atuar em nível de sistema imunológico (NAVARRO-ALARCON e LÓPEZ-MARTINEZ, 2000; REILLY, 1996). A função antioxidante está relacionada às selenoproteínas como a P e às glutathionas peroxidases (GPx) que são dependentes de Se (HSIEH *et al.*, 2006). As GPx são selenoproteínas encontradas em todos os tecidos de mamíferos em que há processos oxidativos, cuja ação é reduzir a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) contribuindo para a proteção das macromoléculas e membranas do organismo contra a oxidação (GONZAGA *et al.*, 2005).

O homem obtém Se por meio da alimentação (REILLY, 1996, FÁVARO *et al.*, 2000; GONZAGA, 2002; THOMSON, 2006) e a quantidade do mineral presente nos alimentos reflete a concentração do solo, sendo essa distribuição heterogênea, ou seja, um alimento da mesma espécie proveniente de áreas distintas pode apresentar concentrações de Se diferentes (AMOUROUX *et al.*, 2001; MARTENS e COZZOLINO, 2012). No Brasil, Cozzolino *et al.* (2007) evidenciaram que feijões produzidos no estado de São Paulo tinham menores concentrações de Se (0,016 µg de Se/g) quando comparados aos feijões do Ceará (1,2 µg de Se/g).

Dessa forma, pode-se supor que as regiões norte e nordeste apresentam maiores concentrações de Se no solo enquanto as regiões centro-oeste e sudeste tendem a apresentar concentrações menores, indicando maior risco de desenvolvimento da deficiência do mineral nas duas últimas regiões (COZZOLINO *et al.*, 2007; MARTENS e COZZOLINO, 2012). A região norte, além de ser considerada uma das áreas com solos mais ricos em Se, também apresenta de forma abundante o alimento considerado a melhor fonte do mineral, a castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) (ROCHA *et al.*, 2014).

Um estudo realizado por Gonzaga (2002) avaliou o estado nutricional relativo ao Se em 41 crianças de Macapá (AP) e de Belém (PA), de acordo com os resultados as crianças avaliadas não apresentaram deficiência em Se.

Rocha *et al.* (2014) também avaliaram crianças da região norte em duas localidades ribeirinhas da cidade de Porto Velho (RO), obtendo um total de 42 participantes. As crianças ribeirinhas de Demarcação apresentaram concentrações plasmáticas de Se abaixo da

referência para a faixa etária, enquanto as crianças da segunda localidade, Gleba do Rio Preto, apresentaram concentrações elevadas, constituindo risco de toxicidade.

Bortoli (2010), avaliou 55 mulheres de uma comunidade ribeirinha de Manaus (AM) denominada de Novo Airão e observou que a média de Se plasmático e eritrocitário estava dos valores da normalidade.

Com base nesses estudos, observa-se que não é possível estabelecer um diagnóstico preciso sobre o *status* de Se na região norte, sendo necessários mais estudos, principalmente com a população das cidades.

Em contrapartida à suposição que a região norte ou amazônica pode ter solos ricos em Se, a mesma também é considerada uma área de risco de exposição ao mercúrio (Hg), um metal tóxico que não exerce função biológica. Segundo Fadini e Jardim (2001), esta contaminação é devida aos processos naturais e antrópicos.

Alguns autores sugerem que a população da Amazônia apresenta a mais alta exposição ao Hg relatada no mundo, e isso pode exigir um aumento da quantidade de Se no organismo na tentativa de compensar tanto o estresse oxidativo quanto os efeitos tóxicos provocados pelo metal, bem como para manter a atividade ideais de enzimas antioxidantes (FORDYCE, 2005; RAYMAN, 2008; LEMIRE *et al.*, 2010; PASSOS; MERGLER, 2008).

Diante desse cenário, este projeto avaliou o estado nutricional relativo ao Se, concentrações de Hg, estresse oxidativo e a presença dos polimorfismos genéticos Pro198Leu no gene da GPx e GSTM1 no gene da glutathione S-transferase (GST) de mulheres residentes na cidade de Porto Velho (RO). Vale mencionar que estudos sobre o Se são inexistentes nesta população e a maioria das pesquisas realizadas com o Hg na Amazônia, avaliou apenas populações ribeirinhas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 SELÊNIO

O Se foi descoberto pelo químico sueco Jons Jakob Berzelius no ano de 1817, em seus experimentos sobre a oxidação do ácido sulfúrico, pesquisando agentes tóxicos (FOX; FAIRWEATHER, 1999). Em 1957, Schwartz e Foltz descobriram a sua importância para a saúde animal quando verificaram que pequenas quantidades de Se apresentavam ação protetora em ratos com necrose hepática e deficiência em vitamina E (NAVARRO-ALARCON; LÓPEZ-MARTINEZ, 2000). Em 1973, Rotruck isolou a enzima GPx e verificou a presença de Se em seu sítio ativo (BAYOUMY-EL, 2001). A essencialidade do Se para os humanos foi reconhecida em 1979, quando cientistas chineses descobriram uma doença por deficiência de Se em uma região da China chamada Keshan, a qual deu origem ao nome desta doença e quando a suplementação com Se atuou em caso de distrofia muscular (ESTADOS UNIDOS - IOM/FNB, 2001).

No processo de evolução da terra, o Se foi incorporado ao solo oriundo dos magmas e gases vulcânicos e, após o degelo da era glacial, esse semi-metal foi espalhado por algumas áreas do globo terrestre de forma heterogênea (KOHRLER, 1999). Dessa forma as características geológicas de cada região influenciaram as concentrações de Se nos solos, existindo locais onde esta concentração é tão elevada que pode causar intoxicação em animais que consomem as pastagens cultivadas (REILLY, 1996) e em outras é tão baixa que pode causar deficiência (SILVA *et al.*, 1993).

Solos com concentração de Se ao redor de 0,05 µg/g tendem a proporcionar dietas com concentrações menores que 0,1 µg/g causando deficiência do mineral, enquanto solos com mais de 5 µg/g do mineral contribuem para a intoxicação (OLDFIELD, 1999). Por isso, a quantidade de Se existente nos alimentos, na água e no ar, reflete o teor deste mineral no solo, sendo dependente de fatores geoquímicos, como o pH, sendo que solos com pH menor que 5,5 (ácido) apresentam baixa biodisponibilidade de Se e solos com pH maior que 7,5 (alcalino) apresentam Se mais biodisponível. A natureza da rocha originária também interfere nas quantidades de Se no ambiente, sendo aquelas ricas em granito e basalto pobres em Se e as vulcânicas incandescentes, calcárias, de carvão e de pirita, mais ricas no mineral (BAOYAN; ZHANG, 2002; REILLY, 1996; FOX; FAIRWEATHER-TAIT, 1999; GONZAGA; MARTENS; COZZOLINO, 2007, 2012). Isso explica porque a quantidade de Se no mesmo tipo de alimento proveniente de áreas diferentes pode ser muito heterogênea (AMAROUX *et al.*,

2001). Estima-se que cerca de 50 a 77% do Se presente na superfície da terra seja oriundo dos oceanos que se depositou por via úmida ou seca por meio dos gases dimetilselenido e dimetilselenilsulfido produzidos de forma sazonal por fitoplânctons, em especial pelas bactérias *Coccolithophorid* e, por isso, as áreas mais próximas de oceanos possuem solos com maior concentração de Se (AMAROUX *et al.*, 2001).

No Brasil, Martens e Cozzolino (2002) avaliaram alguns cultivares de feijões de cada região do país e verificaram que a concentração de Se foi maior nos alimentos cultivados nas regiões Norte e Nordeste, sugerindo que os solos destes locais apresentam maiores concentração do mineral. Os pesquisadores constataram também que os solos com elevadas concentrações de Se produziram alimentos mais ricos neste nutriente e, conseqüentemente, um consumo alimentar adequado. Por outro lado, em estados como São Paulo e Mato Grosso foram encontradas menores concentrações de Se nos solos e os indivíduos residentes nestes estados apresentaram maiores inadequações da ingestão alimentar de Se (COZZOLINO, 2007).

Na natureza, o Se se encontra em 4 quatro estados de oxidação: nos solos ácidos como Se elementar (0), selenido (+2) e selenito (+4) que são menos solúveis e assimiláveis, enquanto em terras alcalinas têm mais selenato (+6), mais solúvel e assimilável pelas plantas e animais (ORTUÑO *et al.*, 1997; GONZAGA, MARTENS; COZZOLINO, 2012). Nos alimentos, o Se pode ser encontrado sob as formas orgânica e inorgânica; na forma orgânica como selenometionina (alimentos de origem vegetal e animal e em alguns suplementos alimentares), como selenocisteína, principalmente em fontes de origem animal e como selenometilselenocisteína, principal forma encontrada em vegetais (NAVARRO-ALARCON, 2008). Na forma inorgânica, como selenito (SeO_3^{2-}) e selenato (SeO_4^{2-}) em suplementos, pois essas formas aparecem em poucas quantidades nos alimentos (RAYMAN, 2000).

2.1.1 Fontes, Biodisponibilidade e Recomendação

A castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*, família *Lecythidaceae*) é considerada o alimento mais rico em Se, com concentrações que variam de 8 a 126 µg/g (GONZAGA, 2002; REILLY, 1996; THOMSON, 2006; GONZAGA; MARTENS; COZZOLINO, 2012). Diversos estudos com essa amêndoa foram conduzidos com a finalidade de determinar o seu teor de Se. Souza e Menezes (2004) avaliaram 70kg de castanha-do-Brasil com casca, da safra de 2001, obtidas de lote a granel na Centrais de Abastecimento de Campinas S.A. (CEASA) em São Paulo e observaram concentração de 2,04 µg/g (correspondente a 204

µg/100g) de Se. Chang *et al.* (1995) analisaram dois lotes de castanha-do-brasil, um proveniente da região do Acre/Rondônia e outro da região de Manaus/Belém e as concentrações de Se variaram de 3,06 a 4,01 µg/g e 36,0 a 50,0 µg/g, respectivamente. Trabalhos realizados pelos pesquisadores do Laboratório de Nutrição-Minerais da Universidade de São Paulo, também avaliaram as concentrações de Se em castanha-do-brasil oriundas da região norte (Quadro 1).

Quadro 1. Concentração de Se (µg/g) em castanha-do-brasil da região norte do Brasil.

	Concentração de Se (µg/g)
COUTINHO (2001)	19
GONZAGA (2002)	40
BEHR (2004)	17
MARTENS e COZZOLINO (2002)	43
ROCHA (2014)	5,83
STOCLER PINTO (2009)	58
COMINETTI (2010)	58
PIRES (2012)	115

*Dados não publicados - Média referente à determinação de Se em dezoito lotes de castanha-do-brasil (safra 2011).

As frutas e as verduras, em geral, são pobres em Se, com exceção dos vegetais que são considerados acumuladores, tais como: o alho, a mostarda indiana, o brócolis, a couve-de-bruxelas, a couve-flor, o repolho, a cebola e alguns cogumelos, os quais podem fornecer boas quantidades do mineral. Nas regiões cujos solos têm quantidades significativas de Se, o trigo é uma boa fonte do mineral, assim como os pães e cereais (NAVARRO-ALARCON e LÓPEZ-MARTINEZ, 2008).

A quantidade de proteína presente no alimento deve ser considerada, pois os alimentos proteicos incorporam o Se de forma mais eficiente, principalmente aqueles que possuem maior concentração de aminoácidos que contenham enxofre, como metionina e cisteína (BURK, 1998). Alimentos como carne bovina, frango, peixe e ovos também apresentam quantidades significativas de Se, assim como, leite e seus derivados, de acordo com a espécie animal e quantidade de gordura, pois tanto o leite de vaca quanto os outros tipos que apresentam maior quantidade de gordura possuem menores concentrações do mineral (NAVARRO-ALARCON, 2008).

As melhores fontes de Se não são necessariamente as de maior biodisponibilidade. Os vegetais, por exemplo, em geral são pobres no mineral, entretanto apresentam uma biodisponibilidade elevada, variando de 85 a 100%. Nos pescados, que também são

considerados ótimas fontes de Se, a biodisponibilidade varia de 20 a 50%. Alguns pesquisadores relacionam esta baixa biodisponibilidade à interação do Se com o metal Hg que pode estar presente nesses alimentos (ORTUÑO, 1997; MARTENS *et al.*, 2012).

Com a descoberta da doença de Keshan, uma cardiomiopatia ocasionada pela deficiência de Se, foi possível estabelecer recomendação desse nutriente, pois a doença não se manifestava quando a quantidade consumida era igual ou maior que 19,1 µg/dia em indivíduo adulto com 60 kg. Acreditava-se que essa concentração seria o menor valor de associação com o não aparecimento dos sinais clínicos da deficiência do mineral (SHILS, *et al.*, 1994). Entretanto, atualmente sabe-se que a deficiência de Se ocorre quando a ingestão diária por longos períodos é menor ou igual a 11 µg/dia. Outro dado utilizado para determinar a recomendação de Se foi realizado através da relação entre a atividade da GPx no plasma e a ingestão do Se em indivíduos adultos chineses residentes em uma área com solos considerados pobres no mineral. Os voluntários foram distribuídos em cinco grupos e receberam doses graduais de 0, 10, 30, 60 e 90 µg/dia de Se por via oral na forma de DL-selenometionina. Após cinco a oito meses, a atividade da GPx respondeu de forma similar para os três concentrações mais altos e esses resultados mostraram que uma ingestão em torno de 41 µg/dia, o equivalente a 30 µg da suplementação mais 11 µg da dieta normal, em um homem de 60 kg, eram suficientes para saturar a atividade da GPx (IOM, 2001).

Com bases nesses dados foi possível estabelecer uma recomendação de Se, de acordo com o *Institute of Medicine* (2001). A Ingestão Dietética Recomendada (RDA) de Se para indivíduos adultos a partir dos 19 anos de idade foi estabelecida em 55 µg/dia não devendo ultrapassar o nível máximo de Ingestão Tolerável (UL) estabelecido de 400 µg/dia. O Quadro 2 apresenta as Ingestões Dietéticas de Referência (DRI) de Se propostas pelo IOM (2006) para população adulta.

Quadro 2. Ingestão Dietética de Referência (DRIs) relativas ao Se em µg/dia a partir de 1 ano de idade de acordo com o *Institute of Medicine* (IOM, 2006).

Idade (anos)	EAR Se µg/dia	RDA Se µg/dia	UL Se µg/dia
> 14	45	55	400

EAR – Necessidade Média Estimada: valor de ingestão diária de um nutriente suficiente para suprir a necessidade de metade dos indivíduos saudáveis de um determinado grupo do mesmo gênero e estágio de vida;
RDA – Ingestão Dietética Recomendada: é o nível de ingestão dietética diária suficiente para atender às necessidades de um determinado nutriente de praticamente todos (97 a 98%) os indivíduos saudáveis de um determinado grupo do mesmo gênero e estágio de vida;

UL – Nível Máximo de Ingestão Tolerável: é o valor mais alto da ingestão diária continuada de um nutriente que aparentemente não oferece nenhum efeito adverso à saúde para todos os indivíduos de um mesmo estágio de vida ou gênero.

2.1.2 Aspectos Fisiológicos: Absorção, Biodisponibilidade, Armazenamento e Excreção

A absorção do Se acontece no duodeno, ceco e cólon, onde a selenometionina é absorvida por um mecanismo de transporte ativo, o selenito por difusão simples, o selenato em conjunto com o sulfato por meio de carreadores mediados por sódio e a selenocisteína, por transporte ativo, comum aos aminoácidos básicos (histidina, lisina e arginina). A selenometilselenocisteína não é incorporada como selenometionina, sendo convertida rapidamente em metilselenol (FAIRWEATHERTAIT *et al.*, 2011).

Nos enterócitos, o Se é reduzido a selenito (H_2Se) e em seguida transportado no sangue ligado a proteínas, principalmente a frações de β -lipo proteína de muito baixa densidade e em menor quantidade em outros tipos de proteínas como a albumina, especialmente quando a selenometionina é a principal forma presente nos alimentos (REILLY, 1996; PAPP *et al.*, 2007).

A biodisponibilidade do Se pode ser prejudicada por alguns fatores: quantidade ingerida a partir da dieta, origem do Se consumido, interação com metais tóxicos, eficiência da digestão, formação de compostos absorvíveis, tempo do trânsito intestinal, estado nutricional do organismo em relação ao Se, doenças do trato gastrointestinal, conversão para formas biologicamente ativas após absorção e incorporação à enzima GPx (IOM, 2001). Na determinação da biodisponibilidade do Se alimentar a etapa limitante é a incorporação da forma biologicamente ativa, selenocisteína, à GPx ou às 5' deiodinases nos tecidos (HOLBEN; SMITH, 1999).

A excreção do Se ocorre principalmente pela via urinária (REILLY, 1996; PAPP *et al.*, 2007) e os compostos de Se, tanto aqueles que entram no *pool* de selenito como os convertidos a metilselenol, são metilados por tióis-metiltransferases e geram diferentes formas metabólicas metiladas do mineral que serão excretadas, contribuindo para a homeostase. Na urina predominam as formas monometiladas, nos casos de baixas ingestões, e o trimetilselenônio, quando o Se é consumido em altas quantidades. Quando os íons de trimetilselenônio atingem seu platô metabólico ocorre a excreção pulmonar de dimetilselenônio volátil, responsável pelo odor característico de alho na respiração (LETAVAYOVÁ *et al.*, 2006; PAPP *et al.*, 2007).

A Figura 1 ilustra o metabolismo do Se em mamíferos, onde os metabólitos de Se provenientes da alimentação entram na célula e se juntam ao *pool* existente gerando selenito, que será utilizado como fonte de Se para a síntese da selenocisteína, precursora das selenoproteínas (PAPP *et al.*, 2007).

Figura 1. Aspectos fisiológicos do Se em mamíferos.

Adaptado de PAPP *et al.* (2007).

(GSH = glutationa; TrxR/Trx = tioredoxina redutase/tioredoxina).

2.1.3 Funções e Ações

A propriedade antioxidante do Se está relacionada às GPx que são dependentes deste mineral. As GPx agem na proteção celular contra os danos provocados por radicais livres, juntamente com um sistema antioxidante complexo que envolve outras substâncias (HOLBEN; SMITH, 1999).

O Se é incorporado na forma de selenocisteína no sítio ativo de um grande número de proteínas. Acredita-se que cerca de 100 selenoproteínas possam existir no organismo de mamíferos. Atualmente são conhecidas 22 selenoproteínas organizadas em grupos diferentes,

em função da localização e das propriedades funcionais da selenocisteína, sendo que metade destas apresenta características antioxidantes. O grupo das GPx é o mais abundante. Estas selenoproteínas são encontradas em todos os tecidos de mamíferos em que há processos oxidativos e podem reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio, contribuindo para a proteção das macromoléculas e membranas do organismo contra a oxidação (BROWN *et al.*, 2001; TAPIERO *et al.*, 2003; GONZAGA *et al.*, 2005).

A GPx 1, também conhecida como GPx citosólica, foi a primeira enzima dependente de Se a ser identificada em 1953, em eritrócitos, onde protege a hemoglobina de danos oxidativos. Essa GPx é encontrada no citosol das células, sendo expressa em todos os tecidos (BROWN, 2001; LEI, 2007) e tem como função reduzir o peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos livres, transformando-os em água e álcool, respectivamente (GONZAGA *et al.*, 2005).

A segunda isoforma, GPx 2 ou gastrintestinal, é encontrada no trato gastrintestinal e no fígado e age protegendo o organismo contra os hidroperóxidos na passagem pelo trato gastrintestinal (GONZAGA *et al.*, 2005). A GPx 3 ou plasmática, é sintetizada primeiramente nas células tubulares renais e sua função é servir de barreira antioxidante para o sangue filtrado e proteger as células endoteliais do dano oxidativo (DUMONT, 2006). A quarta isoforma, GPx 4 ou fosfolípídio hidroperóxido, tem como função proteger as membranas das células contra a ação dos hidroperóxidos de ácidos graxos e também reduzir a formação de hidroperóxidos de colesterol e de éster de colesterol nas membranas e nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (SAVASKAN *et al.*, 2007).

Além dessas quatro isoformas, foram descobertas também a GPx 6 no epitélio do olfato e tecidos embrionários e outras variantes na qual o resíduo de selenocisteína é substituído por cisteína, incluindo a GPx 5 com expressão restrita no epidídimo e a GPx 7 (PAPP *et al.*, 2007). Entretanto, ainda não se sabe exatamente qual a ação dessas GPx (HERBETTE *et al.*, 2007).

O Se pode interagir com um grande número de metais tóxicos, como: arsênio (As), cádmio (Cd), Hg, cobre (Cu), prata (Ag), chumbo (Pb) e platina (Pt), podendo alterar a toxicidade e prevenir possíveis manifestações toxicológicas em razão da exposição aos mesmos (ORTUÑO *et al.*, 1997). Uma das hipóteses para explicar essa interação seria uma reação direta desses metais com o Se na forma inorgânica, formando substâncias biologicamente inativas no interior do trato gastrintestinal. Este mecanismo de interação foi encontrado em estudos com o Cd, Pt, Pb, Ag e Hg. Uma segunda hipótese seria a reação do Se com grupos tióis de algumas moléculas para formar selenosulfidos (RSSeSR), que

possuem forte afinidade por metais (ORTUÑO *et al.*, 1997; ALARCÓN e MARTINEZ, 2000).

A interação entre o Hg e o Se tem sido estudada há mais de três décadas e envolve uma variedade de processos bioquímicos e toxicológicos ainda desconhecidos (CHEN *et al.*, 2006). Estudos conduzidos em animais foram realizados para tentar esclarecer os mecanismos dessa interação, mesmo assim, estes não foram completamente elucidados (GREGUS *et al.*, 2001). Pesquisas *in vitro* sugerem que o efeito protetor do Se em relação aos efeitos tóxicos do Hg seja em razão da formação de um complexo inerte Hg-Se (1:1) ligado à selenoproteína P (Sepp1) no sangue (DRASCH *et al.*, 2000).

A Figura 2 ilustra um possível mecanismo de destoxificação mútua de Se e Hg, elaborado por Gailer *et al.* (2000), onde o Se, na forma de selenito, ao ser incorporado nos eritrócitos é reduzido através da glutathiona e no plasma, liga-se à albumina, proteína responsável pelo transporte sanguíneo de Hg. Sendo assim, o Se não reagiria de forma direta com o Hg livre, mas com o Hg ligado à albumina, formando o complexo Hg-Se que, por sua vez, liga-se à selenoproteína P e também aos resíduos de histidina e cisteína presentes na proteína.

Vale mencionar que a selenoproteína P é uma glicoproteína que transporta a maior parte de Se no plasma, dessa forma, nos casos em que há deficiência em Se, a síntese de selenoproteína P pode estar prejudicada, assim como a sua concentração no plasma. A existência da selenoproteína P foi relatada há aproximadamente 30 anos, porém o progresso na tentativa de esclarecer as suas funções têm se destacado nos últimos anos (BURK; HILL, 2009).

Figura 2. Esquema de um possível mecanismo de destoxificação mútua de Se e Hg.

Adaptado de Gailer *et al.* (2000).

SeO_3^{2-} e Se^{2-} = selenito, Hg^{2+} = mercúrio livre, HgSe = complexo Hg Se.

Concentrações adequadas de Se também estão relacionadas ao funcionamento adequado do sistema imunológico. Propriedades como: quimiotaxia, migração e atividade fungicida são indicadores claramente dependentes da concentração de Se nas células fagocitárias. Efeitos reguladores do sistema imunológico são explicados pela manutenção da integridade das membranas das células imunocompetentes em condições adequadas de Se. Por isso são atribuídas ao Se funções nas células do sistema imunológico, como manutenção da integridade das células imunocompetentes; redução dos peróxidos orgânicos e inorgânicos formados por reações originadas dos radicais livres na célula; regulação do metabolismo dos hidroperóxidos que levam à síntese de leucotrienos, tromboxanos, prostaglandinas e lipóxidos; e modulação dos produtos oxidativos na respiração das células fagocitárias (ORTUÑO *et al.*, 1997).

O Se também participa na conversão de tiroxina (T₄) em tritiodotironina (T₃), por meio das deiodinases tipo I, II e III. A deficiência em Se no organismo causa um decréscimo de 15 a 20% na conversão de T₄ em T₃. A enzima 5'-deiodinase tipo 1 (IDI) é uma selenoproteína encontrada principalmente no fígado e rins, responsável pela conversão da forma inativa do pró-hormônio T₄ que é secretado pela tireoide à forma metabolicamente ativa triiodotironina (T₃). Nos casos de deficiência em Se, o T₄ está aumentado no plasma, enquanto o T₃ está diminuído (KÖHRLE, 2000).

Outras ações protetoras do Se têm sido descritas no contexto das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT). Alguns mecanismos foram propostos para esclarecer a inibição do aparecimento do câncer pela ação do Se, como redução da hipermetilação do DNA causada pelo aumento da atividade da DNA metiltransferase, regulação da hipometilação do DNA que, paradoxalmente, ocorre durante a progressão do tumor; e proteção antioxidante, que promove equilíbrio entre a formação de radicais livres e o funcionamento celular normal (DAVIS e UTHUS, 2002). Quando esse equilíbrio é interrompido pelo acúmulo de radicais livres a célula entra em estresse oxidativo e, conseqüentemente, em instabilidade genética, alterando certos fatores de transcrição ou oxidando o DNA na sua base 8-hidroxidodesoxiguanosina (8-OHdG) (BAYOUMY-EL, 2001).

Estudos epidemiológicos mostram correlação positiva entre maior ingestão de Se e menor incidência de câncer de tireoide, pele, mama, ovário, próstata e trato gastrointestinal, especialmente o coloretal (ORTUÑO *et al.*, 1997; NAVARRO-ALARCON e LÓPEZ-MARTINEZ, 2000; DAVIS e UTHUS, 2002). O Se também pode diminuir o risco de outras doenças crônicas não transmissíveis como: aterosclerose, trombose arterial e diabetes *melito* (NAVARRO-ALARCON e LÓPEZ-MARTINEZ, 2000).

2.1.4 Deficiência e Toxicidade

A deficiência em Se ocorre quando a ingestão diária é menor ou igual a 11 µg/dia, enquanto ingestões acima de 400 µg/dia podem levar à toxicidade (IOM/FNB, 2001; ZHANG *et al.*, 2002). Os grupos mais vulneráveis à deficiência são fumantes, idosos, gestantes, lactentes, crianças de 2 a 10 anos, adolescentes do gênero feminino, indivíduos submetidos à nutrição parenteral total sem suplementação com Se por um período superior a 20 ou 30 dias, enfermos de doenças crônicas não transmissíveis, indivíduos sujeitos a elevado estresse e doenças debilitantes (AIDS, hepatite C, hanseníase), populações que habitam áreas com solos pobres em Se, além de populações que habitam áreas antropogênicas ou naturalmente contaminadas por Hg (ORTUÑO *et al.*, 1997; BURKE e OPESKIN, 2002; MARTENS *et al.*, 2012).

A doença de *Kesha*, definida como uma cardiomiopatia que afeta crianças e mulheres jovens, está diretamente relacionada à baixa ingestão alimentar de Se; a forma aguda é caracterizada por insuficiência súbita da função cardíaca e a fase crônica degeneração dos músculos (especialmente necrose multifocal e fibrose no miocárdio), cardiomegalia, isquemia do miocárdio, eletrocardiograma anormal e edema pulmonar. Outra consequência associada à deficiência é a doença de *Kashin-Beck*, osteoartrite endêmica, que ocorre durante a pré-adolescência ou adolescência, podendo resultar em nanismo e deformação das articulações (HOLBEN e SMITH, 1999). Ressalta-se que no Brasil não há relatos dessas deficiências graves.

Já os sintomas da intoxicação por Se são distúrbios gastrintestinais graves, paladar metálico, odor de alho exalado pelas vias respiratórias, distúrbios neurológicos, síndrome do estresse respiratório, infarto do miocárdio e falência renal (HOLBEN e SMITH, 1999). A toxicidade crônica, tanto pelas formas orgânicas quanto inorgânicas, apresenta características clínicas semelhantes, porém as concentrações teciduais do mineral são diferentes (IOM, 2000).

De acordo com Yang *et al.* (1983) os tecidos e órgãos mais afetados pela toxicidade de Se são as unhas, cabelos, pele e sistema nervoso. As unhas tornam-se quebradiças, com pontos brancos e estrias longitudinais na superfície, seguido de queda da parede da unha, iniciada nos polegares. Os cabelos tornam-se sem brilho e quebram-se facilmente na raiz, e aqueles que nascem, em geral, são despigmentados. Esta característica pode ser observada em outros locais, como axilas, braços e área púbica. As lesões de pele ocorrem principalmente em quatro pontos: palma das mãos e pés, nuca, cotovelos e pernas, com aparência inflamada e eruptiva, às vezes ulcerada. As anormalidades no sistema nervoso só ocorrem nos casos de

maior gravidade e os sintomas incluem paralisia periférica, formigamentos, hiper-reflexão dos tendões, espasmos, distúrbio motor e hemiplegia (YANG *et al.*, 1983).

Vários fatores podem influenciar a gravidade e o tempo de aparecimento dos sinais clínicos da intoxicação por Se, como idade, estado de nutrição e saúde do indivíduo e recidivas de alta ingestão do mineral (IOM/FNB, 2001). Segundo Zhang *et al.* (2002), indivíduos que já sofreram intoxicação por alta ingestão de Se são mais susceptíveis a outra intoxicação provocada por menores quantidades do mineral. Ingestão de 910 µg/dia pode causar alterações nas unhas (IOM/FNB, 2001). Registros sobre intoxicação por Se foram encontrados em Enshi (China), onde a prevalência da doença ocorreu entre os anos de 1961 e 1964, com uma taxa de mortalidade de 50% da população de 248 habitantes (REILLY, 1996). Na Venezuela, em um local chamado Vila Bruzual, foram registrados casos de intoxicação nas crianças em fase escolar, sendo esta região considerada selenífera (JAFFÉ *et al.*, 1972).

2.2 MERCÚRIO

O Hg é o único metal que se apresenta no estado líquido em temperatura ambiente e a 0°C (BISINOTI, 2005), presente naturalmente na crosta terrestre, água e atmosfera. Dentre as diferentes formas químicas, a espécie de distribuição mais ampla é o Hg na forma de vapor, predominante na atmosfera, seguido da forma inorgânica, dominante em águas naturais, e do metilmercúrio que é de extrema importância ambiental em razão de sua elevada toxicidade, principalmente em mamíferos (GALVÃO *et al.*, 2007).

As primeiras evidências dos efeitos neurotóxicos do Hg em consequência da ingestão materna de alimentos contaminados foram observadas em crianças na cidade de Minamata, no Japão, onde o metilmercúrio liberado de uma indústria química contaminou as águas da baía e os peixes consumidos pela população. Em 1953, a doença de Minamata foi reconhecida como uma doença neurológica e chamou atenção do mundo para o problema da intoxicação por metais tóxicos (TAKEUCKI e ETO, 1999; FARIAS *et al.*, 2006). O Hg então passou a ser considerado um dos metais mais perigosos no que diz respeito à contaminação ambiental e à saúde humana (FARIAS *et al.*, 2006).

Após a intoxicação por Hg em Minamata, as pesquisas foram direcionadas para os possíveis efeitos da exposição crônica, assim como, concentrações baixas de metilmercúrio, principalmente em crianças, em virtude da transferência materna infantil durante a gestação, uma vez que esse metal ultrapassa facilmente a barreira placentária e pode causar

consequências graves à saúde do bebê, que é sensível a menores concentrações quando comparados aos adultos (GALVÃO *et al.*, 2007).

A exposição e acúmulo do Hg durante o desenvolvimento fetal e amamentação estão diretamente relacionados com a carga materna e a transferência desse metal para a placenta e leite materno (STEUERWALD *et al.*, 2000; CÉZAR, 2002; MARQUES, 2002). O alimento que mais contribui para a contaminação por Hg é o peixe, pois as espécies aquáticas absorvem o Hg na forma de metilmercúrio (DOMINGUES, 2000) e o grau de exposição é influenciado por fatores como a frequência da ingestão de pescados, a preferência (peixes carnívoros apresentam maiores quantidade de Hg), tamanho e nível trófico (PARADIS *et al.*, 1997).

O Hg, ao entrar na circulação sanguínea, se liga a proteínas e se distribui pelos tecidos, concentrando-se nos rins, fígado, medula óssea, cérebro, ossos e pulmões (SÁ *et al.*, 2006). Os sinais e sintomas da intoxicação dependem de vários fatores, como gênero, idade, hormônios, taxa de hemoglobina e capacidade de indução das metalotioneínas que podem funcionar como barreiras protetoras do cérebro e cerebelo (EPA, 1997). No homem, o sistema nervoso central é o principal órgão acometido pelo metilmercúrio e os sintomas clínicos incluem: parestesia (alterações sensoriais), ataxia (falta de coordenação nos movimentos) e disartria (dificuldade na articulação das palavras), além de distúrbios visuais e auditivos. A ocorrência dos sintomas clínicos também é dose dependente (IPCS, 1990). Além de tremor, vertigem, entorpecimento, dor de cabeça, câimbra, fraqueza, depressão, dispneia, tosse, inflamações gastrintestinais, queda de cabelo, náusea e vômitos (CANELA, 1995). O quadro clínico típico das crianças geradas sob tais exposições inclui microcefalia (má formação no crescimento do cérebro), hiper-reflexia (reflexos muito ativos ou responsivos em excesso) e deficiência visual, auditiva, mental e motora (IPCS, 1990).

A excreção do Hg do corpo humano ocorre por via urinária ou fecal, diferindo de acordo com a forma, dose e tempo após a exposição. Uma pequena fração é eliminada pela respiração, mas a excreção fecal é a maior e a principal via após a exposição ao Hg (FORD *et al.*, 2001).

Segundo Fadini e Jardim (2001), a presença do Hg na região Amazônica se deve, principalmente, à extração de ouro e aos processos naturais e antrópicos. Além disso, como os solos da bacia Amazônica são antigos, apresentam capacidade elevada de reter o Hg e acumulá-lo durante anos (MIRETZKY *et al.*, 2005). A poluição do Hg na Amazônia é um problema ambiental grave, pois 70 a 170 toneladas deste metal são lançados anualmente no meio ambiente pela atividade informal de mineração de ouro e queimadas, o que representa uma fonte primária de emissão do Hg. Como resultado, uma grande quantidade do metal sofre

metilação e se acumula nos peixes da cadeia alimentar (MEECH, 1997; PINHEIRO *et al.*, 2000).

Em relação à genotoxicidade do Hg, têm-se descrito que este metal pode ser responsável por mutações em níveis cromossômico e gênico, sendo a compreensão destes efeitos de grande importância em razão de suas consequências para a saúde humana (AZEVEDO, 2003). O Hg produz depleção dos principais antioxidantes celulares, principalmente os que contêm grupos tiólicos e pode também aumentar a geração das espécies reativas de oxigênio, como os radicais hidroxila ($\text{HO}\cdot$), os radicais superóxido (O_2^-) ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2), aumentando o estresse oxidativo e, assim, causar alterações nas funções das células (ERCAL *et al.*, 2001; PEROTTONI *et al.*, 2004).

A Figura 3 apresenta possíveis mecanismos moleculares de genotoxicidade do Hg, o qual entra na célula através da membrana plasmática ou por meio de transportadores, podendo afetar o DNA de diversas formas. Uma delas é aumentando a produção de EROS as quais podem reagir diretamente com o DNA ou indiretamente, ao induzir mudanças conformacionais nas proteínas responsáveis pela formação e manutenção do mesmo. Também pode reagir de forma direta nos microtúbulos, evitando a organização em fuso dos cromossomos durante a atividade mitótica. Esses danos ao DNA podem ser causados tanto pelos radicais livres gerados pelo Hg como pelo próprio metal (CRESPO-LÓPEZ *et al.*, 2009).

Figura 3. Mecanismos moleculares de genotoxicidade do Hg.

Fonte: Adaptado de Crespo-López *et al.* (2009).
EROS: Espécies Reativas de Oxigênio.

De acordo com os pesquisadores Pinheiro *et al.* (2006) e Harada *et al.* (2001) concentrações de Hg dez vezes menores que os valores de referência estabelecidos pela World Health Organization (WHO), foram relacionados com a genotoxicidade no sistema nervoso central, apontando para a necessidade de uma revisão dos padrões adotados pela WHO (1990).

Evidencia-se, que populações residentes em áreas de risco de contaminação por Hg podem estar mais susceptíveis a um aumento do estresse oxidativo. Entretanto, a intensidade dos danos dependerá de fatores como, a amplitude da geração de ERO nos alvos celulares, da atividade dos sistemas de defesa antioxidante e da presença ou da ausência de metais de transição (HALLIWELL e CHIRICO, 1993). Dependerá, ainda, da ingestão de nutrientes, pois o consumo inadequado de Se está relacionado com uma redução da atividade da GPx, prejudicando o sistema de defesa antioxidante do organismo (COMINETTI, 2011).

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre substâncias antioxidantes e oxidantes e o efeito das espécies reativas é equilibrado pela ação antioxidante enzimática e não enzimática do sistema biológico (VALKO *et al.*, 2006).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) bem como as Espécies Reativas de Nitrogênio (RNS) são moléculas que contêm oxigênio ou nitrogênio, respectivamente, com um ou mais elétrons desemparelhados, o que as torna instáveis e reativas. Essas moléculas são produtos do metabolismo celular normal que exercem um papel duplo no organismo, uma vez que podem atuar de forma benéfica ou prejudicial. Os efeitos benéficos ocorrem em baixas e/ou moderadas concentrações e envolvem funções fisiológicas, como atuação na defesa do organismo contra agentes infecciosos e em sistemas de sinalização celular, além da indução de resposta mitogênica (RIDNOUR *et al.*, 2005; VALKO *et al.*, 2006).

Com o objetivo de emparelhar seus elétrons, estas substâncias podem adquirir elétrons de outras moléculas tornando-as instáveis e convertendo-se em radicais livres. Como exemplo de radicais livres, destacam-se o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), a hidroxila ($OH^{\cdot}$), o tiol ($SH^{\cdot}$), o triclorometil ($CCl_3^{\cdot}$) e o óxido nítrico ($NO^{\cdot}$). Vale ressaltar que, caso essas espécies não sejam removidas ou neutralizadas, podem reagir com lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, causando danos nas funções celulares (CHAUHAN e CHAUHAN, 2006). Dentre os prejuízos ao metabolismo celular, podem ocorrer ruptura das fitas do DNA, aumento na concentração

de cálcio intracelular livre, danos em transportadores de íons ou em outras proteínas específicas e peroxidação de lipídios (HALLIWELL e CHIRICO, 1993).

Além disso, os ácidos graxos poli insaturados, que estão presentes em grande quantidade nas células, são mais susceptíveis à oxidação em razão da presença de grupos metilênicos entre duplas ligações e, por isso, tornam-se alvos mais prováveis quando comparados ao DNA (LOUREIRO *et al.*, 2002). A peroxidação lipídica se inicia com o ataque à bicamada lipídica por qualquer espécie reativa capaz de abstrair um átomo de hidrogênio de um ácido graxo poli insaturado e, após a iniciação, esse processo é catalítico, o que favorece a formação de hidroperóxidos. Com a abstração do átomo de hidrogênio do ácido graxo poli insaturado (LH) é formado o radical lipídico (L'), que é rapidamente adicionado a uma molécula de oxigênio levando à formação do radical peroxil (LOO'), sendo capaz de reagir com outro ácido graxo poli insaturado, iniciando uma nova cadeia de oxidação a partir da formação de outro radical lipídico (L') (LOUREIRO *et al.*, 2002). O radical peroxil pode ser rearranjado via reações de ciclização de endoperóxidos e como produto final o malondialdeído (MDA), que é considerado mutagênico em células de mamíferos, pois pode reagir com as bases nitrogenadas guanina, adenina e citosina, formando adutos que levam a ligações cruzadas de DNA-DNA ou DNA-proteínas, ocasionando aumento do estresse oxidativo (VALKO *et al.*, 2006). Menciona-se, também, as oxidações enzimáticas do ácido araquidônico, que ocorrem durante a síntese de eicosanóides, bem como as reações catalisadas por ciclo oxigenases ou lipoxigenases, que são importantes fontes de ERO ou hidroperóxidos lipídicos (LOUREIRO *et al.*, 2002).

Por outro lado, o organismo dispõe de mecanismos que têm a finalidade de proteção contra os processos oxidativos. Estas defesas antioxidantes são de extrema importância, pois são responsáveis pela remoção direta dos radicais livres, promovendo máxima proteção aos sítios biológicos (VALKO *et al.*, 2006).

O principal sistema antioxidante é o enzimático, que inclui enzimas como a superóxido dismutase (SOD) que converte radicais superóxido em peróxido de hidrogênio, a catalase e a GPx, as quais reduzem peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos (COMINETTI *et al.*, 2011; HAMANASHI *et al.*, 2004). A glutathione redutase (GR) também é uma enzima que participa desse processo, pois é responsável pela regeneração da glutathione em sua forma reduzida (GSH), que é utilizada como substrato da enzima GPx (PRADA *et al.*, 2004). Existem

Quanto ao sistema antioxidante não enzimático, inclui compostos antioxidantes de origem alimentar, que muitas vezes são utilizados como cofatores pelas enzimas antioxidantes

(BARBOSA *et al.*, 2010). Como exemplo de compostos que atuam por meio da neutralização das ERO produzidas tanto no meio intra quanto extracelular tem-se o tocoferol (vitamina E), o beta-caroteno (pró-vitamina A), o Se cofator enzimático da GPx, o cobre, o zinco e o ácido ascórbico (BERGER, 2005; PRADA *et al.*, 2004; PAPP *et al.*, 2007). Além do Se, como exemplo de cofator enzimático antioxidante, destacam-se o zinco e o cobre, que participam da estrutura das enzimas Zn-Cu-SOD (SOD1) e SOD extracelular (SOD3) (FORMIGARI *et al.*, 2007; COMINETTI *et al.*, 2011). Existem ainda varredores de radicais livres hidrofílicos, como o ascorbato e flavonóides (CASTRO e FREEMAN, 2001).

Além da relação entre estresse oxidativo e sistema de defesa antioxidante, ressalta-se a importância de se avaliar as características genéticas individuais, como por exemplo, a presença de polimorfismos genéticos, uma vez que estes podem interferir nas concentrações de nutrientes organismo (VIVANCO *et al.*, 2006).

2.4 POLIMORFISMOS GENÉTICOS

Por meio do projeto genoma humano foi possível revelar não somente o sequenciamento completo dos genes humanos, mas também as interações entre os genes e o meio ambiente. Diversas mutações foram descobertas após o sequenciamento e os polimorfismos são resultantes destas alterações, sendo os diferentes modelos decorrentes do tipo de mutação que os originou (BROOKES, 1999; YAMADA, 2010). Os polimorfismos podem ser de inserções de pares de base única, de deleções ou substituições de um par de bases por outro.

O tipo mais comum de polimorfismo é denominado SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) ou polimorfismo de nucleotídeo único, que é uma mutação simples na qual acontece a troca de um nucleotídeo por outro em determinado ponto do DNA. A ocorrência de SNPs é de aproximadamente um em cada mil bases do genoma humano, estimando a ocorrência em milhões (BROOKES, 1999).

Os polimorfismos que resultam da inserção ou da deleção de nucleotídeos em fragmentos da molécula de DNA ocorrem em um décimo de frequência dos SNP. Os tipos mais comuns de polimorfismo de inserção e/ou deleção são os de bases repetidas, chamados de STR (*Simple Tandem Repeats*) ou microssatélites e os de padrões de nucleotídeos repetidos em uma região do DNA, conhecidos como VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) ou minissatélites (SCHORK *et al.*, 2000).

Aqueles polimorfismos que podem causar alterações nas sequências de aminoácidos codificados, acarretando danos nas funções, como alteração nos sítios de interação, na solubilidade e na estabilidade da proteína, estão localizados nos éxons, região codificadora do gene, e são chamadas de *non-synonymous SNP – nsSNP* (RAMENSKY *et al.*, 2002).

Estudos que envolvem genômica nutricional têm sido relacionados a importantes associações entre polimorfismos e consumo de nutrientes, permitindo melhor compreensão de como a nutrição influencia as vias de homeostase metabólica. Essa descoberta possibilitou uma perspectiva na redução do risco de doenças, uma vez que as interações existentes entre os genes e os nutrientes permitem descrever a modulação dos efeitos dos componentes alimentares em um fenótipo específico associado a um polimorfismo genético (STRATIGOPOULOS *et al.*, 2008; KAUWELL, 2005).

Como exemplo de SNP que pode estar relacionado ao *status* de Se, pode-se destacar o Pro198Leu no gene da GPx 1. Já como exemplo de um polimorfismo de deleção, que pode interferir nas concentrações de Hg no organismo, destaca-se o GSTM1, no gene da GST.

2.4.1 Polimorfismo Pro198Leu (rs 1050450) no Gene da GPx 1

De acordo com Hesketh (2008), polimorfismos na região codificadora dos genes de selenoproteínas podem alterar a incorporação do Se e influenciar a capacidade antioxidante. No gene humano da GPx 1, que é a isoforma intracelular citosólica mais abundante nos sistemas biológicos, localizado na região cromossômica 3p21.3 foram descobertos vários polimorfismos, sendo mais de 30 SNP, dentre eles o Pro198Leu (rs 1050450). Nesse SNP ocorre uma substituição da base nitrogenada citosina por timina (C→T) no exón 2 do nucleotídeo 594 do gene, resultando na troca do aminoácido prolina por leucina no códon 198 (FOSBERG *et al.*, 1999). A troca do aminoácido prolina por leucina pode causar consequências na atividade da enzima GPx 1, pois a prolina é o único aminoácido sem grupo amino livre no carbono alfa, ocasionando uma torção na estrutura secundária dos peptídeos (FOSBERG *et al.*, 2000; JABLONSKA *et al.*, 2009; ARSOVA-SARAFINOVSKA *et al.*, 2009).

Segundo Suzen *et al.* (2010), que avaliaram a frequência dos alelos e genótipos de diversas populações do mundo, o maior percentual geralmente é de indivíduos com genótipos selvagens (Pro/Pro), seguidos por heterozigotos para o polimorfismo, ou seja, com um alelo variante (Pro/Leu) e depois por indivíduos homozigotos (Leu/Leu).

No Brasil, em relação à frequência desse polimorfismo, além desse estudo, pesquisadores do Laboratório de Nutrição - Minerais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, determinaram por meio de vários estudos a frequência genotípica do Pro198Leu em várias populações de cidades do Brasil e os resultados estão ilustrados no Quadro 3 a seguir.

Quadro 3. Frequência genotípica em relação ao polimorfismo Pro198Leu (rs 1050450) no gene que codifica GPx1 encontrada em pesquisas realizadas no Brasil, no Laboratório de Nutrição e Minerais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP).

	Estado	Número de participantes	Pro/Pro (%)	Pro/Leu (%)	Leu/Leu (%)
SANTOS (2013)	Ceará	176	55	38	7
ROCHA (2015)	Rondônia	190	56	37	7
NISHIMURA (2010)	São Paulo	175 (Caso)	50	43	7
		203 (Controle)	51	43	6
DONADIO (2011)	São Paulo	124	49	48	3
COMINETTI <i>et al.</i> (2011)	São Paulo	37	49	38	13
CARDOSO <i>et al.</i> (2012)	São Paulo	28 (Caso)	75	14	11
		29 (Controle)	72	14	14

Uma das principais descobertas dos estudos sobre o polimorfismo Pro198Leu está relacionada à presença do alelo Leu, pois algumas pesquisas verificaram que esse genótipo pode diminuir a atividade da GPx 1 e, além disso, estudos associaram a concentração eritrocitária de Se com a sua atividade, indicando que o genótipo Leu/Leu, pode influenciar também o estado nutricional dos indivíduos relativo ao Se (JABLONSKA *et al.*, 2009).

Em indivíduos não doentes, Forsberg *et al.* (2000) e Jablonska *et al.* (2009) não observaram associações entre a atividade da enzima GPx 1 e o genótipo. Porém, na pesquisa de Jablonska *et al.* (2009), foi obtida uma associação significativamente diferente entre cada grupo de genótipo avaliado em relação à atividade da GPx 1 e a concentração de Se. Dessa forma, os pesquisadores presumiram que a resposta à ingestão ou à suplementação de Se, assim como a atividade da enzima, pode estar relacionadas aos genótipo do indivíduo. Além disso, os autores sugeriram que carregavam indivíduos que possuíam ao menos um alelo Pro teriam maior atividade da enzima quando comparados àqueles com ambos alelos Leu.

Ravn-Haren *et al.* (2006) observaram em mulheres com câncer de mama, que a atividade da GPx 1 foi significativamente menor nas participantes com a presença do genótipo Leu em comparação às aquelas com genótipo Pro. Isso foi observado tanto nas mulheres doentes quanto naquelas do grupo controle. Além de alguns tipos de câncer, como o de bexiga, colorretal, de pulmão e de mama, outras doenças são relacionadas com o polimorfismo Pro198Leu, tais como síndrome metabólica (KUZUYA *et al.*, 2008) e concentrações elevadas de triacilgliceróis em pacientes com diabetes melito tipo 2 (CHEN *et al.*, 2012).

2.4.2 Polimorfismo GSTM1 no Gene da GST

A GST é uma família de enzimas intracelulares localizadas no citosol que modulam a ação de toxinas endógenas e exógenas sobre as células, evitando danos ao DNA (MANNERVICK *et al.*, 1985; MORAIS *et al.*, 2008; CASTRO e LIMA, 2013). Este grupo de enzimas tem sido amplamente estudado, pois estão envolvidas no metabolismo de muitos carcinógenos, poluentes ambientais e drogas anticancerígenas. Dessa forma, supõe-se que a inexistência de enzimas específicas ou deleções homozigóticas possam ocasionar ao organismo maior susceptibilidade a desenvolver neoplasias, como câncer de bexiga, cólon, pulmão, pele, estômago e mama, além de diabetes e asma (ZHENG *et al.*, 2002; CHARRIER *et al.*, 1999; PARK *et al.*, 2003; ANTON *et al.*, 2010; CASTRO e LIMA, 2013).

Existem cinco classes de genes da GST (*alfa, mu, pi, theta e zeta*). Nos genes da classe *mu*, têm-se o *GSTM1*, *GSTM2*, *GSTM3*, *GSTM4* e *GSTM5* na região cromossômica 1p13.3. O polimorfismo no *locus* M1 é o mais estudado e apresenta três alelos, dois considerados ativos, *GSTM1*A* e *GSTM1*B*, e o terceiro alelo nulo ou deletado (*GSTM1*0*). O que difere o *GSTM1*A* do *GSTM1*B*, apesar de serem proteínas funcionalmente idênticas, é que o *GSTM1*A* contém a proteína lisina na posição 172 e o *GSTM1*B* contém a asparagina nessa mesma posição (DEJONG *et al.*, 1988; WIDERSTEN *et al.*, 1991).

Dessa forma, o polimorfismo *GSTM1*0* no gene da GST é classificado como polimorfismo de deleção, ou seja, indivíduos homozigotos que carregam o genótipo *GSTM1*0* apresentam deleção do gene inteiro e não expressam a proteína GST (KLATAU-GUIMARÃES *et al.*, 2005; JAIN *et al.* 2006; MANNERVICK *et al.*, 2005).

Klatau-Guimarães *et al.* (2005) avaliaram a suscetibilidade à contaminação por Hg e a relação com o polimorfismo da enzima GST através de biomarcadores moleculares em algumas tribos indígenas da Amazônia. Após a obtenção dos resultados, observou-se que fatores genéticos podem influenciar o acúmulo de Hg no organismo, pois os indivíduos que

carreavam o genótipo GSTM1*0 (deletado) apresentaram concentrações maiores deste metal nos cabelos quando comparados aos indivíduos com genótipo GSTM1. Com a ausência desta enzima o organismo pode não estar apto a destoxificar o Hg de forma adequada, uma vez que esta é uma das funções atribuídas à GST. Sendo assim, esses indivíduos podem apresentar maiores concentrações ou retenção de Hg no organismo.

Naganuma *et al.*, (1990) e Choi *et al.*, (1996) afirmam que a deficiência de GST está associada com a sensibilidade ao cloreto de Hg e ao metilmercúrio. Entretanto, ainda existem inconsistências na relação entre o polimorfismo GSTM1 e a concentração de Hg no organismo (GUNDACKER *et al.*, 2007). De acordo com Hatagima *et al.* (2000), a frequência do polimorfismo no gene da classe mu está ausente ou deletado (GSTM1*0) de forma homozigótica em torno de 40 a 50% em diferentes populações étnicas, conforme ilustrado no Quadro 4, que mostra a frequência deste alelo, assim como do GSTM1*A, GSTM1*B, GSTM1*A/B, inclusive na população brasileira.

Quadro 4. Distribuição da frequência do polimorfismo GSTM1(A/B/AB/0) no gene da GST em diferentes etnias.

Etnias	GSTM1			
	A	B	AB	0
Brasileiros (Rio de Janeiro)	197 (30%)	105 (16%)	51 (8%)	305 (46%)
Brasileiros (Distrito Federal)	43 (24%)	33 (18,4)	16 (9%)	87 (48.6%)
Brasileiros (São Paulo)	21 (29%)	10 (14%)	7 (9%)	35 (48%)
Nigerianos	49 (71%)	4 (6%)	1 (1,3%)	15 (21.7%)
Japoneses	13 (8%)	68 (41%)	5 (3%)	80 (48.2%)
Chineses	10 (10%)	28 (30%)	2 (2%)	56 (58.3%)
Indígenas	15 (35%)	7 (16%)	6 (14%)	15 (35%)
Franceses	24 (43%)	5 (9%)	3 (5%)	24 (43%)
Inglese	158 (28%)	74 (13,5%)	23 (4%)	306 (54.5%)

Fonte: Hatagima *et al.*, (2000).

Considerando a importância do polimorfismo GSTM1*0 no gene da GST e o fato da população deste estudo residir em área de risco de contaminação por Hg, a análise de tais

dados torna-se necessária, uma vez que o genótipo nulo ou deletado pode influenciar as concentrações do metal no organismo.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o estado nutricional relativo ao Se, concentrações de Hg e suas relações com o estresse oxidativo e os polimorfismos Pro198Leu no gene da GPx 1 e GSTM1 no gene da GST em mulheres residentes em área de risco de contaminação por Hg.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o estado nutricional das voluntárias em relação à antropometria;
- Analisar a ingestão alimentar de energia, macronutrientes e Se;
- Determinar as concentrações plasmáticas e eritrocitárias de Se e a atividade eritrocitária total da enzima GPx;
- Avaliar as concentrações de Hg nos cabelos;
- Associar a presença dos polimorfismos Pro198leu e GSTM1 com os biomarcadores do estado nutricional relativo ao Se e Hg, respectivamente, bem como com as concentrações de MDA e ORAC.

4. METODOLOGIA

4.1 CASUÍSTICA E DELINEAMENTO

O estudo foi do tipo transversal descritivo com abordagem quantitativa e qualitativa dos dados. Participaram da pesquisa mulheres entre 19 e 50 anos residentes da cidade de Porto Velho, Rondônia (RO). Para o cálculo do tamanho da amostra, considerou-se a prevalência do alelo variante Pro198Leu de 32%. Fixou-se o nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$) e um erro amostral de 6,5%. Esses valores aplicados na equação abaixo, indicada para populações infinitas, proporcionou uma amostra de tamanho n igual a 200 mulheres.

$$n = \frac{z^2_{5\%} \times P \times Q}{e^2}$$

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), parecer 119 e protocolo 574 (ANEXO 1). Na Figura 4 abaixo, está representado o mapa do Brasil com destaque para o estado de Rondônia e a cidade de Porto Velho, onde a pesquisa foi realizada.

Figura 4. Representação do mapa do Brasil, do estado de Rondônia e da cidade de Porto Velho (RO).

Adaptado de Campos *et al.* (2002).

Para ampla divulgação da pesquisa, cartazes com informações a respeito do estudo foram espalhados pela cidade de Porto Velho em pontos de ônibus, na secretaria de educação (SEDUC), na secretaria de saúde (SESAU), em academias de ginástica, em faculdades particulares e também na Universidade Federal de Rondônia (UNIR) (APÊNDICE 1). Após as procuras e declarações de interesse em participar da pesquisa, as voluntárias que se adequavam ao perfil do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE 2) e, em seguida, responderam um questionário com informações socioeconômicas, presença de doenças e estilo de vida (APÊNDICE 3). Não foram incluídas no estudo mulheres com idade inferior a 19 ou superior a 50 anos, fumantes, com doenças crônicas não transmissíveis e infecciosas (auto-relatadas), pós-menopausa, que realizavam atividade física de forma intensa, que utilizavam suplementos vitamínicos e/ou minerais e que residiam em local diferente do estabelecido.

4.2 COLETA DE DADOS

A coleta dos dados (consumo alimentar, antropometria, material biológico) foi realizada no laboratório Alphaclin (Porto Velho – RO), entre os meses de fevereiro a maio de 2011, entretanto, todas as análises em material biológico foram realizadas em Laboratórios da Universidade de São Paulo (USP).

Para avaliar o consumo alimentar todas as participantes foram instruídas pela responsável da pesquisa a preencher um formulário de registro alimentar de 24 horas (APÊNDICE 4) que continha instruções de preenchimento e fotos ilustrativas de medidas caseiras de alguns alimentos com a finalidade de facilitar a obtenção dos dados de consumo, bem como para o melhor entendimento das voluntárias, reduzindo, dessa forma, as dúvidas e os erros de preenchimento. Além do registro de 24 horas, as voluntárias responderam um formulário a respeito do consumo de peixes da região que poderiam estar relacionados com o risco de contaminação de Hg (ANEXO 2).

Os dados antropométricos (peso, estatura e circunferência da cintura) foram obtidos após a entrega dos formulários de registros alimentares. Em seguida, para determinar as concentrações de Hg total, cortou-se uma pequena quantidade de cabelo das voluntárias (aproximadamente 1g de amostra) da parte posterior da cabeça, próximo à região occipital (nuca), com auxílio de uma tesoura de aço inoxidável que foi higienizada com acetona a cada corte.

Com a finalidade de avaliar o estado nutricional das participantes em relação ao Se, atividade da enzima GPx, estresse oxidativo e determinação dos polimorfismos, foram coletados 20 mL de sangue por punção venosa. Esse procedimento foi realizado no período da manhã por um profissional de enfermagem capacitado, estando as voluntárias em jejum de 10 a 12 horas.

A coleta foi realizada com seringas plásticas descartáveis e agulhas de aço inoxidável, estéreis e descartáveis. Todos os materiais biológicos foram distribuídos em tubos de vidro contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetracético), sendo que uma pequena quantidade (sangue total) de todas as amostras foi armazenada em microtubos estéreis e autoclavados para análise dos polimorfismos.

O plasma foi separado do sangue total por centrifugação a 3.000 rpm durante 15 minutos a 4°C, sendo extraído com pipeta automática e acondicionado em microtubos previamente desmineralizados, para determinação da concentração plasmática de Se, malondialdeído (MDA) e da capacidade de absorção de radicais livres de oxigênio (ORAC). Em seguida, o resíduo contendo os eritrócitos foi lavado três vezes com 5 mL de solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%, homogeneizado lentamente por inversão e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado e, dessa forma, obtendo-se a massa eritrocitária que foi extraída cuidadosamente com micropipeta e armazenada em tubos de polipropileno desmineralizados para determinação do Se eritrocitário e da atividade da enzima GPx.

Todas as amostras foram acondicionadas em gelo seco e transportadas em um recipiente térmico por via aérea de Porto Velho para São Paulo, onde as amostras foram armazenadas em freezer -80°C até o momento das análises no laboratório de Nutrição - Minerais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP). Quanto às amostras de cabelo coletadas, estas foram armazenadas em envelopes de papel e acondicionados em temperatura ambiente até o momento das análises no Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica - LAN/CRPq – Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares (IPEN/CNEN) – SP.

Todos os materiais utilizados (vidrarias, plásticos, ponteiras etc.) foram desmineralizados em banho de ácido nítrico a 20%, por no mínimo 12 horas e enxaguados pelo menos 10 vezes consecutivas com água ultra pura Milli-Q (resistividade de 18,2 MΩ.cm a 25°C) para evitar a contaminação por minerais. Os reagentes utilizados nas análises tinham um grau de pureza analítica (P.A.) e a água ultrapura Milli-Q foi utilizada no preparo das soluções e diluição das amostras.

4.3 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

Para avaliação antropométrica foram aferidos o peso, a estatura e a circunferência da cintura (CC). Todas as aferições foram realizadas por nutricionista segundo técnicas preconizadas pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2004).

O peso foi mensurado em balança antropométrica da marca Filizola®, modelo “Welmy”, com capacidade de 150 kg e graduação de 100 g. A estatura foi aferida em estadiômetro com régua antropométrica de até 2 m e divisão de 0,5 cm acoplado à balança. A adequação do peso das participantes foi avaliado pelo indicador Índice de Massa Corporal – IMC (Kg/m^2), calculado pela razão do peso corporal em quilos pelo quadrado da altura em metros. Em seguida, utilizou-se a classificação da World Health Organization (WHO, 2000) de acordo com o Quadro 5 a seguir, como um dos critérios para classificar o IMC das participantes.

Quadro 5. Classificação do Índice de Massa Corpórea (IMC) para adultos.

Classificação	IMC (kg/m^2)	Risco de Comorbidades
Baixo Peso	$\leq 18,5$	Baixo
Peso Normal ou Eutrofia	18,5 - 24,9	Médio
Sobrepeso	$\geq 25 - 29,9$	Aumentado
Obesidade I	30,0 - 34,9	Moderado
Obesidade II	35,0 – 39,9	Grave
Obesidade III	≥ 40	Muito Grave

Fonte: (WHO, 2000).

A circunferência da cintura (CC) foi aferida com uma trena antropométrica inelástica e flexível, com 2 m de comprimento da marca Sanny®. Para classificação utilizou-se também a referência da World Health Organization (WHO, 2000), citada pela Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO, 2009/2010), a qual estabelece como ponto de corte para risco cardiovascular aumentado a medida da circunferência igual ou superior a 80 cm em mulheres caucasianas.

4.4 CONSUMO ALIMENTAR

O consumo alimentar foi avaliado por meio do registro alimentar de 24 horas, aplicado durante três dias, sendo dois dias da semana e um dia no final de semana. A ingestão alimentar das participantes foi calculada com auxílio do *software NUTWIN* (Departamento de Informática da Escola Paulista de Medicina - UNIFESP). Considerando que as tabelas de composição de alimentos disponíveis em alguns *softwares* não dispõem de dados completos acerca do teor de Se nos alimentos, estes dados foram incluídos manualmente baseados em análises realizadas no Laboratório de Nutrição e Minerais da USP.

Como houve correlação significativa entre os valores de energia e de Se, os macronutrientes e o mineral foram ajustados pela energia e correção da variabilidade intrapessoal e interpessoal (WILLET *et al.*, 1997; WILLET *et al.*, 1998; SLATER *et al.*, 2004).

A avaliação da ingestão alimentar dos macronutrientes foi realizada de acordo com a contribuição energética em percentual da ingestão calórica total, utilizando o *Acceptable Macronutrient Distribution Ranges* (AMDR) do *Institute of Medicine* (IOM, 2006), conforme Quadro 6. As participantes foram classificadas em três categorias, sendo elas: abaixo da recomendação, dentro do intervalo de recomendação e acima da recomendação.

Quadro 6. Intervalos de recomendação da distribuição de macronutrientes em percentual de contribuição energética (AMDR) de acordo com IOM (2006).

Macronutrientes	AMDR (Adultos >18 anos)
Carboidratos	45 – 65%
Proteínas	10 – 35%
Lipídios	20 – 35%

Fonte: IOM, 2006. AMDR: *Acceptable Macronutrient Distribution Ranges*.

Em relação à prevalência de ingestão inadequada de Se, esta foi calculada utilizando a fórmula proposta por Beaton (1994):

$$Z = (\text{EAR} - \text{média}) / \text{desvio padrão}$$

Os valores da Necessidade Média Estimada (EAR) utilizados para avaliar a adequação da ingestão de Se também foram estabelecidos pelo IOM, 2006.

4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SELÊNIO NO PLASMA E ERITRÓCITOS

Com a finalidade de determinar as concentrações de Se no plasma e nos eritrócitos, as amostras foram pesadas em triplicata (300µL) em tubos de micro kjehdal, em seguida, foram adicionados 5 mL de ácido nítrico 65% (Merck®) e os tubos foram acondicionados em bloco digestor. O material foi digerido por via úmida ácida a uma temperatura máxima de 150⁰ C. Após este procedimento, o Se contido nas amostras foi reduzido da forma VI para a forma IV com adição de ácido clorídrico (HCl) 1,2 N durante duas horas a temperatura de 100⁰ C. As soluções finais foram diluídas para um volume de 25 mL e realizou-se a leitura por espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos acoplados à cela de quartzo (HGQTAAS) (HITACHI®, modelo Z-5000). A curva de calibração foi preparada utilizando os respectivos pontos 0,0 µg/L, 0,1 µg/L, 0,3 µg/L, 0,5 µg/L, 1,0 µg/L, 3,0 µg/L e 5,0 µg/L. O limite de detecção (LD) foi de 0,0016 µg/L e adotou-se um limite de confiança de 95%. O desvio padrão adotado para cada amostra < que 5% e os resultados foram expressos em µg/L.

O controle de qualidade externo foi realizado utilizando o material de referência certificado (SERONORM SERO®) que também foi submetido aos mesmos procedimentos realizados com as amostras. O estado nutricional em relação ao Se das participantes foi classificado de acordo com os parâmetros descritos no Quadro 7.

Quadro 7. Valores de referências adotados para concentração de Se no plasma e eritrócitos.

Se	Valores de Normalidade (µg/L)
Plasmático	60 – 120
Eritrocitário	90 - 190

Fonte: VAN DAEL; DEELSTRA (1993); ORTUÑO (1997).

As participantes que apresentaram concentrações plasmáticas abaixo de 60 µg/L foram consideradas deficientes, enquanto aquelas com concentrações acima de 120 µg/L, em risco de toxicidade. Em relação às concentrações nos eritrócitos, foram consideradas deficientes aquelas abaixo de 90 µg/L e em risco de toxicidade, acima de 190 µg/L.

Além dos valores de referência descritos na Tabela 9, adotaram-se, ainda, os parâmetros propostos por Thomson (2004), que estabelece a concentração mínima de Se

plasmático para o não surgimento da doença de Keshan como 21 µg/L, o valor aceitável para otimização da atividade das enzimas deiodinases como > 65 µg/L, o intervalo de 80 a 95 µg/L para maximização da atividade da GPx e selenoproteína P e o valor superior a 115 µg/L para proteção contra alguns tipos de câncer.

4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GPx

A atividade da enzima GPx foi determinada nos eritrócitos com o auxílio de *kit* comercial (*Ransel 505-RANDOX Laboratories, Crumlin/UK*) adaptado para o uso no analisador bioquímico automático (*Liasys®MAS, Rome, Italy*). Este método se baseia na reação em que a enzima GPx catalisa a oxidação da GR por um hidroperóxido. Na presença de GPx e NADPH, a GSH é convertida à forma reduzida com a oxidação concomitante do NADPH em NADH+. A diminuição na absorbância a 340 nm é, então, determinada (PAGLIA e VALENTINE, 1967). A faixa de normalidade proposta pelo kit comercial utilizado é de 27,5 - 73,6 U/gHb. A concentração da hemoglobina (Hb) também foi determinada, uma vez que a atividade da enzima foi expressa em U/gHb.

4.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE MERCÚRIO NOS CABELOS

Na primeira etapa do processamento para determinação do Hg total, os cabelos foram picotados em pedaços de aproximadamente 0,5 mm de comprimento com tesoura de aço inox higienizada com acetona a cada troca de amostra. Depois disso, transferiram-se os cabelos para um béquer limpo onde foram submersos em acetona e, em seguida, enxaguados três vezes com água Milli Q e mais uma vez com acetona, conforme procedimento recomendado pela Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) (FARIAS, 2006). As amostras foram secas em temperatura ambiente e o armazenamento foi realizado em envelopes de papel devidamente identificados.

Para análise das amostras e materiais de referência, foram pesados cerca de 0,1 a 0,15 g de amostra diretamente em um frasco de *teflon* fechado da marca Savillex® com capacidade de 18,2 mL. Após a pesagem, foram adicionados 4 mL de ácido nítrico (HNO₃) e 2 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄), ambos concentrados e da marca Merck®, que foram mantidos assim durante a noite. No dia seguinte, para digestão das amostras em sistema fechado, os frascos foram colocados em bloco digestor na temperatura de 90° durante 3 h. Depois da digestão os

frascos foram colocados em banho de gelo até o completo resfriamento e, em seguida, foram adicionados 250 μL de solução de dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) a 10% (m/v) para a estabilização do Hg.

A determinação de Hg total nos cabelos foi realizada pelo método de espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV AAS) em equipamento *FIMS-100* (*Perkin Elmer*[®]). A validação da metodologia, em relação à precisão e exatidão, foi realizada por meio da análise em triplicata dos materiais de referência (*Human Hair*- IAEA 086, GBW 09101 - *Human Hair* e BCR CRM 397 - *Human Hair*) com valor certificado de concentração para Hg total, e os resultados obtidos estão presentes no Quadro 8.

As determinações de Hg total em cabelos foram realizadas no Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica (LAN) do Centro do Reator de Pesquisas (CRPq) do IPEN – CNEN/SP.

Quadro 8. Resultados (média $\pm$ desvio padrão da média) das análises dos materiais de referência utilizados na determinação de Hg total (n= número de determinações).

Amostras	Valores Certificados ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Valores Obtidos (Média $\pm$ desvio) ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	DPR (%)	ER (%)
IAEA 086 (n=8)	573 $\pm$ 39	615 $\pm$ 68	11,1	7,3
GBW 09101 (n=4)	2160 $\pm$ 210	1975 $\pm$ 86	4,3	8,6
BCR CRM 397 (n=2)	12300 $\pm$ 500	11688 $\pm$ 32	0,27	5,0

IAEA- International Atomic Energy Agency.

IAEA 086 - Methylmercury, Total Mercury and other trace elements in Human Hair (IAEA, May 2000).

CRM 397 - Certified Reference Material, Trace Elements in Human Hair, BCR- Community Bureau of Reference, (Brussels, January 1991).

GBW 09101 - Certified Reference Material, Human Hair (China, April 1988).

DPR- Desvio Padrão Relativo

ER- Erro relativo

Quanto ao limite de detecção (LD) – a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob determinadas condições experimentais – foi determinado diretamente da curva de calibração, construída utilizando a

técnica de regressão e considerando um nível de confiança de 95%. O valor encontrado para o limite inferior de detecção foi da ordem de $0,01 \text{ ng mL}^{-1}$, resultado compatível com os estudos encontrados na literatura para determinação de Hg (HORVAT, 1996; SKOOG *et al.*, 2002; FARIAS, 2009). Em relação ao limite de quantificação (LQ), também conhecido como limite de determinação, que indica qual a menor concentração do analito que pode ser detectada por um método qualquer que está sendo empregado, com um nível aceitável de precisão e veracidade. Pode ser considerado ainda como a concentração do analito correspondente ao valor médio do branco, mais 5 e 6 ou 10 desvios padrão (FARIAS, 2009). O valor encontrado para o limite de quantificação para esta pesquisa foi da ordem de 1 ng mL^{-1} .

Os resultados das análises dos materiais de referência apresentaram desvio padrão relativo (DPR) variando de 0,27 a 11% e ER (Erro Relativo) de 5 a 8,6%, comprovando a precisão e exatidão do método, respectivamente.

Para classificar o diagnóstico em relação as concentrações de Hg nos cabelos das participantes, os resultados encontrados foram comparados aos estabelecidos pela WHO (1990), o qual considera 2000 ng g^{-1} para populações não expostas e 6000 ng g^{-1} como indicador de exposição para Hg.

4.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE MALONDIALDEÍDO (MDA)

A peroxidação lipídica foi determinada por meio das concentrações de MDA no plasma, obtidas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC/PDA), quantificando a reação do MDA com dinitrofenilhidrazina (DNPH) utilizando absorvância de 308 nm, de acordo com o método adaptado de Rezaei, Jamshidzadeh e Sanati (2013). Antes do processamento das amostras foi construída uma curva de calibração utilizando uma solução estoque de MDA com $22 \text{ } \mu\text{L}$ de tetrametoxipropano e 10 mL de ácido sulfúrico a 1%. Os pontos da curva utilizados foram 0,0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e $12,0 \text{ } \mu\text{M}$. Utilizou-se o aparelho de HPLC da marca Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com coluna Phenomenex Reverse-phase C18 de $240 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ com partículas de $5 \mu\text{m}$ (Phenomenex, Torrance, CA). A temperatura no amostrador foi mantida em 4°C e a temperatura da coluna a 25°C . A eluição foi realizada em modo isocrático com uma fase móvel constituída de 50% de H_2O deionizada e 50% de acetonitrila, acidificada com 2% de ácido acético. A taxa de fluxo de ingestão da amostra foi de 1 mL/minuto e o tempo de corrida de 15 minutos.

Com o objetivo de liberar o MDA das proteínas plasmáticas, foram adicionados 10 µL de hidróxido de sódio 4M nos microtubos que continham 100 µL de plasma e, em seguida, estes foram agitados em vórtex. Após este procedimento, as amostras foram incubadas no aparelho Vortemp® a 60°C durante 30 minutos para posteriormente serem acondicionadas no gelo por 5 minutos. Depois do resfriamento foram adicionados 150 µL de ácido sulfúrico a 1% e agitou-se em vórtex vigorosamente para precipitação das proteínas. Novamente, incubou-se no gelo por mais 5 minutos, seguindo-se de uma centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos. Foram retirados 175 µL do sobrenadante que foram transferidos para um novo microtubo, onde foi adicionado 25 µL de DNPH (0,001 g/mL) permanecendo à temperatura ambiente por 30 minutos protegidos de luz. Centrifugou-se novamente o microtubo a 14000 rpm por 5 minutos e 150 µL do sobrenadante foi transferido para um vial, do qual foi injetado 100 µL no aparelho HPLC.

A determinação da concentração plasmática de malondialdeído foi realizada no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas no laboratório de Toxicologia, que tem como responsável a professora Ana Paula de Melo Loureiro da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP).

4.9 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DE RADICAIS DE OXIGÊNIO (ORAC)

A capacidade antioxidante total do plasma foi realizada por meio do método ORAC, proposto por Prior *et al.* (2003), que baseia-se na mensuração da inibição do radical peroxil, o que demonstra resistência aos danos oxidativos. Para isso, o plasma foi desproteínizado com ácido perclórico e, posteriormente, as amostras foram diluídas 10x com tampão fosfato (pH 7,4).

As análises foram realizadas em triplicata utilizando 25 µL de amostra em microplaca de 48 poços, adicionando-se, posteriormente, 150 µL de solução de fluoresceína e 25 µL de 2,2-azobis (aminopropano) di-hidroclorido (AAPH) por injetores automáticos do leitor de microplacas (Biotech Synergy H1).

Utilizou-se uma curva padrão de Trolox preparada com as seguintes concentrações: 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM e os resultados foram expressos em µmol de Trolox (µmol TE/mL).

4.10 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS

Para extração do DNA de sangue total utilizou-se o *kit PureLink™ Genomic DNA* (Invitrogen, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. Em seguida foi feita a leitura em espectrofotômetro (Nanodrop®) nos comprimentos de onda (λ) de 260nm (DNA) e 280nm (proteína). O DNA foi considerado íntegro e de boa qualidade quando a razão 260/280 foi maior que 1,8, sendo descartadas aquelas com valores abaixo deste parâmetro. A quantificação do DNA das amostras foi realizada neste mesmo equipamento, sendo os resultados obtidos em ng/ μ L. As amostras com concentrações inferiores a 10 ng/ μ L foram descartadas, tendo em vista que esta era concentração mínima padronizada.

4.10.1 Determinação do Polimorfismo Pro198Leu (rs 1050450).

Para análise de genotipagem, o DNA do sangue total será extraído a partir do *kit Purelink Genomic DNA*, da *Invitrogen, Life Technologies*, e, em seguida, o mesmo será quantificado no espectrofotômetro Nanodrop, sendo o resultado expresso em ng/mL. Será utilizada a razão 260/280 superior a 1,7 e inferior a 2,0 como parâmetro de qualidade do DNA. Amostras com a razão abaixo desse valor serão reextraídas. O DNA genômico de todas as amostras será ajustado em água autoclavada para uma concentração de 10 ng/mL e volume final de 20 μ L. Um total de 2 μ L de DNA será usado para a reação em cadeia da polimerase e 18 μ L de solução contendo o master mix específico para o ensaio de genotipagem (*TaqMan® genotyping master mix – Applied Biosystems®*) com sondas *TaqMan (Custom TaqMan® SNP Genotyping Assay, Human; Alelo 1: VIC/MGB-NFQ; Alelo 2: FAM/MGB-NFQ; part number 4331349)* e *primers* específicos para o SNP (RS1050450), *primer forward* CATCGAAGCCCTGCTGTCT e *primer reverse* CACTGCAACTBCCAAGCA.

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

4.10.2 Determinação do Polimorfismo GSTM1

As reações de PCR em tempo real (qPCR) foram realizadas em placas específicas de 96 poços no equipamento *StepOne Plus*, utilizando o sistema para detecção de produtos de amplificação *TaqMan*[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para o polimorfismo GSTM1 foram selecionados *primers forward* 5'-AAGATTCGTGTGGACATTTTGGA-3' e *reverse* 5' TCTGGATTGTAGCAGATCATGCC-3' e *probes* (FAM-CAGACCATGGACA-ACCA-MGB; 100 µM) marcados com fluoróforo FAM. Para controle endógeno utilizou-se a β -2-microglobulina (B2M) *forward* 5'-TTGTTTCACTGTCCTGAGGACTATTTAT-3' e *reverse* 5'-ATGTTACTCTGTCAATGTTCTCCACAT-3'. Os *probes* utilizados foram marcados com fluoróforo VIC (VIC-CTCTAACATGATAACCCTCAC-MGB; 100 µM) (COVAULT *et al.*, 2003).

As amostras foram submetidas à seguinte termociclagem: 50°C por 2 min; 95°C por 10 min seguidos de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 min. Ao final, eram considerados válidos apenas os resultados cuja reação apresentasse curva de dissociação com apenas um pico, referente à temperatura de *melting* do *primer* utilizado em cada reação. A presença da deleção no gene GSTM1 foi estabelecida quando os valores de Ct (*threshold cycle*) foram superiores a 35 ciclos, conforme padronização realizada por Covault *et al.* (2003). De forma aleatória, foram selecionadas 20% das amostras deletadas para confirmar a deleção e em 100% delas houve concordância dos resultados.

4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram analisados no *software* SPSS versão 20.0 e os resultados expressos como média, desvio padrão, valores mínimos e máximos. Testou-se a normalidade dos dados usando o teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variância, o de Levene. O teste T-Student para amostras independentes e o ANOVA seguido de Tukey para comparação de médias entre os parâmetros. Para o teste de correlação, utilizou-se o de Pearson. Nas análises de regressão, empregou-se o modelo de regressão linear simples e o modelo de regressão linear múltipla para selecionar as variáveis de ajuste. As variáveis testadas nos ajustes dos modelos múltiplos foram idade, índice de massa corpórea, escolaridade, renda e ingestão energética. Para estes adotou-se o método de *backward*.

Foram consideradas estatisticamente significantes as análises com $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO

Participaram do estudo 200 mulheres voluntárias da cidade de Porto Velho (RO), selecionadas de uma amostra de conveniência. A média de idade das participantes foi de $26,3 \pm 7,5$ anos. Conforme a etnia relatada pelas voluntárias, 93% informaram ser pardas e a maioria cursava o ensino superior. Quanto à renda, houve uma maior prevalência de participantes que ganhavam mais de quatro salários mínimos e 75% afirmaram não realizar atividade física. Em relação ao histórico de doenças crônicas não transmissíveis na família, as mais descritas foram hipertensão arterial e diabetes. Nenhuma participante era fumante ou fazia uso de bebidas alcoólicas. Todas residiam no estado de Rondônia há no mínimo 10 anos. Os dados acima mencionados estão representados de forma detalhada na Tabela 1.

De acordo com o censo realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2011), a população brasileira era constituída de 190.755.799 de habitantes, sendo que 428.527 pertenciam à cidade de Porto Velho. Desse total, 49,2% eram do gênero feminino.

Ainda neste censo, 47,7% dos habitantes do Brasil classificaram-se como brancos, 7,6% como pretos, 43% como pardos, 1,1% como amarelos e 0,4% como indígenas. A distribuição por cor ou raça reflete padrões históricos de ocupação e movimentos relacionados à dinâmica econômica. As maiores proporções de pardos (5,8%) estão nas regiões norte e nordeste, enquanto os pretos estão mais presentes na Bahia (17%) e no Rio de Janeiro (12,4%). Em Rondônia, 35,3% se declararam brancos, 55,6% pardos e 6,9% pretos, corroborando com dados obtidos nesta pesquisa.

Dentre os dados apresentados ressalta-se, ainda, a presença de DCNT nos antecedentes familiares das participantes. De acordo com Silva-Junior (2009) e Schmidt *et al.*, (2011), 72% das mortes ocorridas em 2007 no Brasil, foram atribuídas às DCNT. O aumento da prevalência de diabetes e hipertensão paralelamente ao excesso de peso está associado à mudanças desfavoráveis na dieta e na atividade física (SCHMIDT *et al.*, 2011).

O Brasil tem colocado em prática importantes políticas para prevenção das DCNT. Como exemplo, destaca-se a implantação do plano de ação de 2008 a 2013 da Organização Mundial da Saúde (WHO) que teve como foco quatro doenças: cardiovasculares, diabetes, câncer e doenças respiratórias crônicas, responsáveis por 58% das mortes no Brasil em 2007 (WHO, 2010; SCHMIDT *et al.*, 2011). O elevado número de casos dessas doenças nos dias

atuais justifica os resultados da porcentagem relatada pelas participantes do estudo sobre o histórico de doenças na família.

Tabela 1. Características socioeconômicas das voluntárias.

		n	%
Etnia (n=200)	Parda	186	93,0
	Branca	11	5,5
	Negra	2	1,0
	Indígena	0	0
	Oriental	1	0,5
Escolaridade (n=173)	Fundamental	8	5,0
	Ensino Médio	19	10,0
	Superior Incompleto	103	60,0
	Superior Completo	40	23,0
	Pós-Graduação	3	2,0
Renda (n=163)	Até 1 Salário Mínimo ¹	9	6,0
	2 a 3 Salários Mínimos	58	35,0
	Acima de 4 Salários Mínimos	96	59,0
Atividade Física (n=200)	Sim	51	25,0
	Não	149	75,0
DCNT (n=186)	Dislipidemias	16	8,6
	Obesidade	37	20,0
	Diabetes	62	33,3
	Hipertensão Arterial	58	31,1
	Outras	13	7,0

¹Salário Mínimo vigente no ano de 2011 (R\$ 545,00)

5.2 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

Os resultados antropométricos, de acordo com o Índice de Massa Corpórea (IMC) estão apresentados na tabela 2 a seguir.

Tabela 2. Classificação das participantes segundo o Índice de Massa Corporéa (IMC).

Classificação do IMC (kg/m ²)	n	%
Eutrofia (18,5 - 24,9)	186	93%
Sobrepeso (≥ 25 - 29,9)	13	6,5
Obesidade grau I (30,0 - 34,9)	1	0,5

A Figura 5 apresenta os resultados da Circunferência da Cintura (CC) das participantes. Do total, 172 voluntárias (89,1%) apresentavam CC dentro dos valores de normalidade e 21 (10,9%) em risco aumentado de DCNT.

Figura 5. Circunferência da Cintura das voluntárias de acordo com WHO (2000). Ponto de corte assinalado em azul (80 cm) constitui risco aumentado para o desenvolvimento de DCNT. Porto Velho, 2015.

Considerando as estimativas de prevalência das condições déficit e excesso de peso de acordo com o IMC, os dados da POF 2008/2009 da população brasileira acima de 19 anos de idade revelaram que 3,6% das mulheres brasileiras foram classificadas com déficit de peso, principalmente nas mulheres muito jovens (20 a 24 anos de idade) ou muito idosas (75 anos

ou mais). O excesso de peso foi diagnosticado em cerca de metade das mulheres, excedendo em 13 vezes a frequência de déficit de peso nestas, e o diagnóstico de obesidade foi de 16,9%.

Ainda de acordo com a POF 2008/2009, observou-se que tanto o excesso de peso como a obesidade aumentaram de frequência nas idades entre 55 a 64 anos, declinando nas idades subsequentes. Em relação às mulheres da região norte, o déficit de peso foi de 3,5% no domicílio urbano e 4,2% no rural, o excesso de peso, 48% no urbano e 47,9% no rural, e a obesidade, 17% e 16,5%, respectivamente.

5.3 CONSUMO ALIMENTAR

A ingestão média de energia das voluntárias foi $1318,01 \pm 265,48$ kcal/dia. Os macronutrientes foram avaliados de acordo com os intervalos de recomendação da distribuição em percentual da contribuição energética (AMDR) do *Institute of Medicine* (2006). Verificou-se que a maioria (59%) das participantes apresentou uma ingestão de carboidratos abaixo da recomendação, enquanto, em relação às proteínas, uma elevada porcentagem (76%) apresentou ingestão dentro do intervalo de referência e o consumo de lipídios foi acima da recomendação em 48% delas (Figura 6).

Figura 6. Distribuição das participantes segundo a adequação da ingestão dos macronutrientes de acordo com a recomendação da distribuição em percentual da energia (IOM, 2006). Porto Velho, 2015.

A Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF 2008/2009) avaliou o consumo alimentar de 34.003 brasileiros, levando em consideração o gênero e a faixa etária. Foi observado que o consumo energético médio da população brasileira em geral variou de 1.490 a 2.289 kcal. Na região norte, observaram-se médias de ingestão energética acima da média nacional e das demais regiões do país, variando de 1.660 a 2.496 kcal. Entre as mulheres, a faixa etária de 19 a 59 anos apresentou ingestão energética média de 1.710 kcal, sendo a média na área urbana de 1.713 e na área rural 1.694 kcal.

Dados do Estudo Nacional de Despesa Familiar (ENDEF) de 1974/75 e as POFs (1987/88; 1995/96 e 2002/03), verificaram diminuição de cerca de 9% na participação relativa de carboidratos, acarretando valores considerados mínimos para este macronutriente (55,9%). No entanto, no estudo da POF 2008/2009, a porcentagem de contribuição dos macronutrientes obedeceu às faixas de recomendação. A média da porcentagem de contribuição de carboidratos nas dietas das mulheres brasileiras foi de 56,2 a 57,6%, a de proteína de 16,4% e de lipídio 27,2%. Ao avaliar as participantes da região norte, as médias de contribuição foram: 56,5% para carboidrato, 17,6% para proteína e 25,6% para lipídio.

A manutenção do peso corpóreo é primariamente determinada pelo consumo e utilização de carboidratos e lipídeos. As proteínas contribuíram com uma fração pequena e relativamente constante no consumo energético total. A auto regulação dos estoques de carboidratos e proteínas no organismo humano ocorre de maneira eficiente, enquanto o mecanismo de regulação de armazenamento de lipídios é pouco eficiente. O papel fundamental dos carboidratos (açúcares e amido) é o de fornecer energia para as células do organismo, particularmente para o cérebro, único órgão dependente exclusivamente destes nutrientes (EGASHIRA; MIZIARA; LEONI, 2014).

Os lipídios são importantes na alimentação, pois fornecem energia de alta densidade e participam no valor energético total da dieta. Ao longo dos últimos anos, rápidas mudanças na dieta e no estilo de vida vêm ocorrendo com a industrialização, urbanização, desenvolvimento econômico e, mais recentemente, a globalização, propiciando significativo impacto na saúde e no estado nutricional da população do mundo. As DCNT, incluindo obesidade, diabetes melito, doenças cardiovasculares, hipertensão arterial e alguns tipos de câncer, têm comprometido o período de vida economicamente ativo de vários indivíduos. Com relação às mudanças dietéticas, uma das principais alterações observadas é o incremento de óleos e gorduras em preparações e em alimentos industrializados (SANTOS e AQUINO, 2014). Apesar de as voluntárias não apresentarem doenças crônicas auto-relatadas, destaca-se que

houve histórico de várias DCNT na família, constituindo fator de risco para desenvolvimento destas nas participantes.

A ingestão alimentar de Se também foi avaliada nestas participantes, apresentando média de consumo de $49,3 \pm 19,1$ µg/dia (Tabela 3). Observou-se que esta média foi superior à recomendação da EAR (45 µg/dia), entretanto, em relação à prevalência de ingestão inadequada de Se, estimada conforme a fórmula de Beaton (1994), notou-se que 40,9% das participantes apresentaram inadequação da ingestão, ou seja, consumo abaixo da EAR.

Tabela 3. Ingestão alimentar de Se (µg/dia) das participantes (n = 193).

	Se (µg/dia)
Média	49,34
Desvio Padrão	19,15
Mediana	46,43
Mínimo	10,38
Máximo	185,20

Segundo os resultados da POF 2008/2009, a média do consumo de Se da população feminina com idade entre 19 e 59 anos foi de 76,2 µg/dia. Na região norte, este mesmo grupo apresentou consumo médio de 104,8 µg/dia, superior ao das outras regiões do Brasil, centro-oeste (69,7 µg), nordeste (79,3 µg), sudeste (71,4 µg) e sul (73,7 µg). Tais resultados, independente da região, foram superiores ao obtido neste estudo. A prevalência de inadequação da ingestão de Se neste mesmo grupo foi de 13,7% no país, sendo de 9,1% na região norte.

Silva (2013), ao avaliar a ingestão alimentar de Se de adultos saudáveis da cidade de Fortaleza (CE) observou consumo médio de 79 µg/dia e somente 15,1% dos participantes apresentaram média de ingestão abaixo da EAR.

De acordo com as pesquisas realizadas no Laboratório de Nutrição - Minerais, a ingestão de Se na população brasileira varia de 18 a 200 µg/dia (CINTRA, 1990; BORTOLI, 2010; DONADIO 2011; MAIA, 2008; SILVA, 2013).

Donadio (2011) avaliou indivíduos adultos saudáveis do estado de São Paulo e observou um consumo médio de 41,2 µg/dia. No estudo de Bortoli (2010), realizado com mulheres da cidade de São Paulo, Cubatão (SP) e Novo Airão (AM), verificou-se um consumo médio de 57,1 µg/dia, 53,3 µg/dia e 53,9 µg/dia, respectivamente. Esses dados

mostraram que não houve diferença significativa entre as cidades e/ou estados avaliados. Rocha *et al.* (2014) ao avaliarem o consumo alimentar de Se de crianças de duas comunidades ribeirinhas de Porto Velho (RO), verificaram que as crianças que residiam na localidade de Demarcação consumiam menos Se (41,8 µg/dia) que a localidade denominada Gleba do Rio Preto (179 µg/dia). A diferença observada foi atribuída ao fato de as crianças da segunda comunidade consumirem mais alimentos *in natura*, enquanto as crianças da primeira, em virtude da sua localização geográfica, tinham mais acesso a alimentos industrializados.

Ressalta-se, que todos esses dados referentes ao consumo brasileiro de Se, independente da região, não ultrapassaram o Limite Superior Tolerável de Ingestão (UL) de 400 µg/ dia (IOM, 2006).

A determinação do consumo de Se não é uma tarefa fácil em virtude das dificuldades existentes em relação aos métodos que avaliam a ingestão alimentar e, além disso, em razão do número reduzido de tabelas que apresentam a concentração do mineral nos alimentos brasileiros (FERREIRA, 2002). Aliado a essas questões, é preciso ressaltar que as concentrações do mineral nos alimentos são proporcionais à quantidade do mesmo nos solos, dessa forma, um mesmo alimento pode conter concentrações de Se muito diferentes. Por isso, os valores de ingestão de Se apresentados poderiam ser diferentes caso houvesse dados da concentração do mineral em alimentos cultivados em solo rondoniense. Mesmo assim, a dificuldade em estimar a ingestão do Se continuaria existindo, pois não seria fácil rastrear de forma rigorosa a origem dos alimentos consumidos pelas participantes.

A ingestão de castanha-do-brasil também foi mensurada, visto que é considerado o alimento mais rico em Se. Apenas uma voluntária afirmou ter o hábito de consumi-la regularmente, coincidindo ser justamente aquela que apresentou o maior consumo de Se (438,97 µg/dia), bem como as maiores concentrações do mineral no sangue. Por isso, essa participante não foi incluída nas análises por ser considerada como *outlier*.

5.4 MARCADORES BIOQUÍMICOS DO ESTADO NUTRICIONAL RELATIVO AO SELÊNIO

A tabela 4 apresenta as concentrações de Se (µg/L) no plasma e eritrócitos das participantes.

Tabela 4. Concentração de Se ($\mu\text{g/L}$) no plasma e nos eritrócitos das participantes (n=192).

	PLASMA	ERITRÓCITOS
Média $\pm$ DP	49,8 $\pm$ 18,6	75,4 $\pm$ 29,9
Mediana	47,0	73,0
Mínimo	5,8	18,4
Máximo	109,4	153,2

DP: Desvio Padrão.

Destaca-se que o plasma reflete o estado nutricional atual (FAIRWEATHER-TAIT, 1997). De acordo com Thomson (2004) e Van Dael e Deelstra (1993), o Se plasmático é considerado o biomarcador mais acessível para avaliação do *status* do mineral, por isso é o mais utilizado, pois permite avaliar as mudanças em curto prazo, respondendo de forma rápida e sensível conforme a ingestão alimentar. É importante mencionar que essa resposta pode ser influenciada por fatores como a idade, o estado fisiológico do indivíduo e a forma do Se consumida.

De acordo com o parâmetro proposto por Van Dael e Deelstra (1993), verificou-se que a maioria das participantes apresentou deficiência de Se (69%), enquanto uma porcentagem menor apresentou adequação (29,5%), e outra mais reduzida em risco de toxicidade (1,5%).

A Figura 7 apresenta os resultados da concentração de Se plasmático conforme os parâmetros proposto por Van Dael e Deelstra (1993), assim como os intervalos estipulados por Thomson (2004), que propõe valores mínimos de Se no soro para prevenção da doença de Keshan, otimização da atividade das deiodinases, maximização da atividade da GPx e da selenoproteína P e, ainda, para proteção contra alguns tipos de câncer.

Apenas 4,1% das voluntárias apresentaram-se em risco para doença de Keshan e 78,4% delas baixa otimização para as deiodinases. Para o ponto de corte de otimização da GPx e selenoproteína P, a maioria (93,3%) apresentou baixa otimização. Quanto ao intervalo de proteção contra alguns tipos de câncer 99% não estavam protegidas.

Dessa forma, de acordo com as duas referências selecionadas para avaliar a concentração de Se no plasma, verifica-se que a maioria das voluntárias, além de apresentar deficiência do mineral.

No Brasil, poucos estudos avaliaram o estado nutricional relativo ao Se em adultos saudáveis. Coutinho (2003) avaliou este parâmetro em praticantes de capoeira residentes em São Paulo e observou a média de 78,7 $\mu\text{g/L}$ de Se no plasma. Maia (2008) avaliou 29

paulistanos e 28 cearenses e observou uma média de Se plasmático de 66,5 µg/L e 57,6 µg/L, respectivamente.

Figura 7. Distribuição da concentração plasmática de Se (µg/L) das participantes (n=194) segundo os parâmetros propostos por Van Dael e Deelstra (1993) e Thomson (2004). Porto Velho, 2015.

^a Intervalo proposto por Van Dael e Deelstra (1993) (60 - 120 µg/L).

Pontos de corte propostos por Thomson (2004):

^b Prevenção do surgimento da doença de Keshan (> 21 µg/L).

^c Otimização da atividade das deiodinases (> 65 µg/L).

^d Maximização da GPx e selenoproteína P (> 80 - 95 µg/L).

^e Proteção contra alguns tipos de câncer (> 115 µg/L).

Bortoli (2010) avaliou mulheres saudáveis e encontrou uma média de 81,7 µg/L nas voluntárias residentes em São Paulo, 60,7 µg/L no grupo de Cubatão (SP) e de 101,8 µg/L nas mulheres de Novo Airão (AM). A média de Se plasmático obtida na última localidade citada foi justificada pelo fato de a população ter como hábito o consumo regular de castanha-do-brasil. Donadio (2011), ao avaliar 124 indivíduos residentes em São Paulo, obteve a média de 54,1 µg/L. Santos (2013) também determinou as concentrações do mineral no plasma de 176 indivíduos do Ceará e observou uma média de 62,6 µg/L.

A Figura 8 apresenta a distribuição das concentrações eritrocitárias de Se das participantes. Nos eritrócitos, 125 participantes (64,5%) apresentaram concentrações abaixo do intervalo de referência.

Figura 8. Distribuição da concentração eritrocitária de Se das participantes (n=194). Intervalo assinalado em azul (90 - 190 µg/L) constitui os parâmetros de normalidade proposto por Van Dael e Deelstra (1993) e Ortuño (1997). Porto Velho, 2015.

Ao contrário do plasma, a concentração de Se eritrocitário reflete o estado nutricional pregresso por responder de forma mais lenta às alterações no estado nutricional. Essa resposta está relacionada com o tempo de meia vida das hemácias, que é de aproximadamente 120 dias (FAIRWEATHER-TAIT, 1997; VAN DAEL e DEELSTRA, 1993).

Houve correlação entre as concentrações de Se plasmático e eritrocitário ($r = 0,629$; $p < 0,001$), ou seja, quanto maior a concentração de Se no plasma, maior a sua concentração nos eritrócitos.

As Tabelas 5 e 6 apresentam os resultados das análises de regressão da ingestão alimentar de Se em relação às concentrações do mineral no plasma e nos eritrócitos, respectivamente.

Tabela 5. Coeficiente de regressão da ingestão alimentar de Se ($\mu\text{g}/\text{dia}$) como variável independente que influenciou a concentração do mineral no plasma ($\mu\text{g}/\text{L}$) das participantes.

Variável independente	β	p-valor ^a	R ² ajustado	p-valor ^b
Ingestão alimentar de Se ($\mu\text{g}/\text{dia}$)^c	0,278	0,112	0,277	0,026

Modelo ajustado pela escolaridade (anos de estudo), idade (anos), ingestão energética (kcal/dia) e circunferência da cintura (cm).

^a Valor de p referente ao coeficiente β .

^b Valor de p referente ao R² ajustado

As análises de regressão mostraram que houve associação positiva entre o consumo de alimentar de Se ($\mu\text{g}/\text{dia}$) e as concentrações do mineral no plasma ($\mu\text{g}/\text{L}$) e nos eritrócitos ($\mu\text{g}/\text{L}$). O coeficiente de correlação (R²) da ingestão alimentar de Se em relação ao plasma foi 27,7% e nos eritrócitos 36,3%. Estes coeficientes expressam a porcentagem da variabilidade das concentrações sanguíneas de Se que são explicadas pela ingestão alimentar do mineral.

Tabela 6. Coeficiente de regressão da ingestão alimentar de Se ($\mu\text{g}/\text{dia}$) como variável independente que influenciou a concentração do mineral nos eritrócitos ($\mu\text{g}/\text{L}$) das participantes.

Variável independente	β	p-valor ^a	R ² ajustado	p-valor ^b
Ingestão alimentar de Se ($\mu\text{g}/\text{dia}$)^c	0,154	0,301	0,363	0,001

Modelo ajustado pelo consumo alimentar de Se ($\mu\text{g}/\text{dia}$), idade (anos), circunferência da cintura (cm), índice de massa corpórea (kg/m^2), escolaridade (anos de estudo) e renda (salários mínimos).

^a Valor de p referente ao coeficiente β .

^b Valor de p referente ao R² ajustado

No estudo de Maia (2008), a média da concentração eritrocitária de Se em adultos residentes em São Paulo foi de 80 $\mu\text{g}/\text{L}$ e do Ceará 122,4 $\mu\text{g}/\text{L}$. Silva (2013), encontrou a média de 101,5 $\mu\text{g}/\text{L}$ de Se nos eritrócitos dos participantes do Ceará. Adame *et al.* (2012), que avaliou espanhóis, encontrou a média de 104, 6 $\mu\text{g}/\text{L}$.

Bortoli (2010), obteve a média de 83,3 $\mu\text{g}/\text{L}$ nas participantes de São Paulo, 85,9 $\mu\text{g}/\text{L}$ no grupo de Cubatão (SP) e de 199,8 $\mu\text{g}/\text{L}$ nas mulheres de Novo Airão (AM). A média elevada encontrada na comunidade de Novo Airão foi justificada pelo fato de a população do estado do Amazonas apresentar o hábito de consumir regularmente a castanha-do-brasil. Houve ainda, correlação positiva entre os valores de Se plasmático e eritrocitário, indicando

que aquelas participantes cujo o teor estava mais elevado em um dos compartimentos sanguíneos, também se encontrava da mesma forma no outro ($r = 0,7018$; $p < 0,0001$).

Segundo Lemire *et al.* (2006) a população da Amazônia brasileira apresenta concentração de Se no sangue total que varia de normal a relativamente alto. Entretanto, este resultado não foi observado no presente estudo, pois a maioria das participantes apresentou concentrações abaixo da referência. Todavia, esta pesquisa foi composta por mulheres residentes em uma capital urbana, diferente dos locais de trabalho das pesquisas de Lemire *et al.* (2006), realizados em comunidades ribeirinhas do Pará. Estes pesquisadores avaliaram 236 adultos de seis comunidades ribeirinhas ao longo do rio Tapajós e verificaram que 34,3% possuíam concentrações elevadas e nove indivíduos (3,8%) apresentaram valores acima dos estipulados para toxicidade. O valor mais baixo encontrado do mineral foi de 142 µg/L.

Em outra pesquisa realizada por Lemire *et al.* (2011) na mesma região, foram avaliados 407 voluntários e apenas seis participantes (1,5%) apresentaram deficiência de Se, enquanto 3,2% apresentaram concentrações entre 560 e 1000 µg/L e 10% concentrações superiores a 1000 µg/L. Segundo os pesquisadores, a concentração elevada de Se no sangue foi devida aos hábitos alimentares da população, uma vez que a mesma sobrevive de alimentos cultivados nas próprias comunidades.

De acordo com os estudos de Pinheiro *et al.* (2005), Rocha *et al.* (2014) e Lemire *et al.* (2006, 2009, 2010 e 2011), que avaliaram o *status* de Se em comunidades ribeirinhas da Amazônia, observa-se que há uma relação entre a concentração do mineral no sangue e a cultura alimentar regional.

Não existem muitos trabalhos realizados no Brasil e no mundo que tenham avaliado o *status* de Se de populações não acometidas por doenças, a maioria das pesquisas avaliou indivíduos doentes. Portanto, este trabalho contribuirá para o melhor conhecimento das condições dessa população quanto a esse mineral. Constatou-se que o hábito alimentar urbano não incluía o consumo de castanha-do-brasil nem de outros alimentos cultivados em solos da região, que constituiriam, dessa forma, uma excelente fonte do mineral.

5.5 SELÊNIO E ATIVIDADE DA ENZIMA GPx

A atividade da enzima GPx foi avaliada nos eritrócitos de 195 participantes e os seus valores foram corrigidos e ajustados pela concentração de hemoglobina, sendo apresentados em U/g Hb. Apenas 6% das voluntárias avaliadas apresentaram baixa atividade da enzima e

87% atividade normal (Figura 9). O valor médio da atividade da GPx foi de $45,1 \pm 19,3$ U/g Hb. Dessa forma, pode-se inferir que a ingestão alimentar de Se embora baixa, não teve influência na atividade enzimática da GPx que é um biomarcador sensível e que avaliado nos eritrócitos pode refletir a ingestão em longo prazo do mineral (BROWN, 2001; LEI, 2007).

Figura 9. A atividade da enzima GPx peroxidase das participantes. Intervalo assinalado em azul (27,5 a 73,6 U/g Hb) representa a referência proposta pelo Kit da Randox®. Porto Velho, 2015.

Dados da literatura sobre atividade eritrocitária da GPx são escassos, os existentes avaliaram a atividade da enzima no plasma, dificultando as comparações com os resultados deste trabalho. No entanto, Olusi (2002), ao realizar seu estudo no Kwait com adultos eutróficos observou média de 98,3 U/g Hb, sendo este valor considerado elevado. Ko *et al.* (2005), ao avaliar chineses, encontrou a média de atividade da GPx nos eritrócitos de 51,3 U/g Hb, enquanto Moradi *et al.* (2009), ao avaliar em mulheres iranianas observaram a média de 20,3 U/g Hb.

De acordo com os estudos brasileiros, Maia (2008) observou atividade média de 47,7 U/g Hb para adultos residentes em São Paulo e de 52,8 U/g Hb no Ceará. Bortoli (2010), observou a média de 73,3 U/g Hb nas mulheres amazonenses, 37,1 U/g Hb nas voluntárias de São Paulo e de 38,2 U/g Hb nas de Cubatão. A média na pesquisa de Donadio (2011) com paulistanos foi de 40,1 U/g Hb, e Silva (2013) em voluntárias do Ceará, obteve 38,6 U/g Hb.

A atividade da GPx está fortemente correlacionada com a concentração sanguínea de Se, portanto um consumo inadequado de Se pode ocasionar redução da atividade da GPx, o que, por sua vez, afeta a resposta celular em relação à ação de agentes oxidantes, desencadeando o surgimento do estresse oxidativo (COMINETTI *et al.*, 2011).

Segundo Crespo-López *et al.* (2009), as glutathionas podem atuar como a principal linha de defesa contra os compostos de Hg e conforme Herculano *et al.* (2006), altas concentrações da enzima podem servir de proteção contra a intoxicação do metal.

Pinheiro *et al.* (2008), realizou uma comparação entre concentrações de Hg e a defesa antioxidante de mulheres saudáveis residentes em três comunidades ribeirinhas da Amazônia, sendo duas comunidades consideradas expostas ao metal, localizadas na bacia do rio Tapajós e a outra localizada na bacia do rio Tocantins. O estudo tinha como finalidade detectar possíveis alterações no estado antioxidante em razão da exposição ao Hg. Dentre outros parâmetros, foram avaliados a concentração da GPx no sangue total e as concentrações de Hg nos cabelos. Foi observada correlação positiva entre as concentrações de Hg e o aumento da concentração da enzima, ou seja, os indivíduos com alto teor de Hg apresentaram também concentrações elevadas de GPx.

5.6 SELÊNIO E CONCENTRAÇÕES CAPILARES DE MERCÚRIO

Os resultados das análises de Hg nos cabelos das voluntárias encontram-se descritos na Figura 10. Das 200 participantes avaliadas apenas seis (3,0%) apresentaram concentrações de Hg superiores ao valor de referência estabelecido pela WHO (1990) e apenas uma apresentou concentração do metal abaixo do limite de quantificação ($< 1 \text{ ng g}^{-1}$).

Em relação aos resultados do formulário de Hg para coleta dos cabelos, foi perguntado para as participantes se estas possuíam tintura ou qualquer tipo de alisamento e a maioria (63,5%) não possuía nenhum tipo de alisamento e 58,5% não tinham cabelos pintados. A concentração média de Hg nos cabelos foi de $625 \pm 766 \text{ ng g}^{-1}$.

A concentração de Hg no sangue reflete a exposição ao metal nas formas orgânica e inorgânica e pode ser influenciada pelo consumo de alimentos contaminados. O Hg permanece na corrente sanguínea apenas alguns dias após a exposição, desta maneira a análise deve ser feita rapidamente a fim de detectar exposições recentes (EPA, 2005). Em relação à concentração de Hg nos cabelos, esta é proporcional à do sangue, uma vez que este metal se incorpora aos fios (WHO, 1990). A análise do cabelo reflete uma exposição mais prolongada

ao Hg, possibilitando a avaliação da concentração deste elemento durante períodos de tempo maiores (PASCALICCHIO, 2002).

Figura 10. Distribuição da concentração de Hg (ng g^{-1}) nos cabelos das participantes (n=200). Ponto de corte assinalado em azul representa o valor de referência (2.000 ng g^{-1}) proposto pela WHO (1990). Porto Velho-RO, 2015.

Os peixes da região Amazônica, segundo alguns pesquisadores, apresentam elevado risco de contaminação por Hg (MUCKE *et al.*, 2001; BÁRÁNY *et al.*, 2002; KARITA e SUZUKI, 2002; LINDBERG *et al.*, 2004; HANSEN *et al.*, 2004). Entretanto, 97,5% das participantes avaliadas informaram consumir este alimento de forma esporádica. Dessa forma, pode-se inferir que as participantes deste estudo não apresentaram alta contaminação por Hg em decorrência da baixa ingestão de peixes no hábito alimentar. Porém, Marques *et al.* (2007), ao avaliar as concentrações de Hg de 82 mulheres urbanas de Porto Velho (RO), observaram que, mesmo com um baixo consumo de peixes, o nível médio de Hg nos cabelos foi elevado (3.500 ng g^{-1}).

Em outra pesquisa realizada por Marques *et al.* (2013), foram avaliadas mulheres de comunidades ribeirinhas da bacia do rio Madeira. Os autores observaram que as concentrações médias de Hg nos cabelos (12.120 ng g^{-1}) daquelas que moravam às margens do rio foram superiores àquelas das residentes em área urbana (5.360 ng g^{-1}).

Rocha *et al.* (2014) determinaram as concentrações de Hg nos cabelos de crianças de duas comunidades ribeirinhas de Porto Velho, sendo elas: Demarcação, localizada as margens do rio Machado e Gleba do Rio Preto, no rio Preto. As crianças da primeira comunidade apresentaram concentração média de Hg de $3.570 \pm 1.860 \text{ ng g}^{-1}$, enquanto as crianças da Gleba do Rio Preto, concentrações médias de $6.240 \pm 5.890 \text{ ng g}^{-1}$, ou seja 50% acima do valor encontrado na comunidade Demarcação.

Bastos *et al.* (2006), ao avaliar as concentrações de Hg em 713 indivíduos do rio Madeira obtiveram a média de 15.200 ng g^{-1} . Boischio e Henshel (2000), ao avaliar 90 mães e 89 crianças encontraram médias de 12.600 ng g^{-1} e 10.200 ng g^{-1} , respectivamente.

Hacon *et al.* (2014) avaliaram cinco áreas na região de Porto Velho, no rio Madeira. Das cinco comunidades estudadas, quatro faziam parte da região ribeirinha de Santo Antônio. Participaram do estudo 1.945 indivíduos cujas concentrações de Hg foram avaliados em amostras de cabelos. Apenas 0,9% dos voluntários apresentaram concentrações de Hg superiores a 50.000 ng g^{-1} e 90% concentrações inferiores a 10.000 ng g^{-1} . O estudo ressaltou que as concentrações de Hg nas mulheres de 16 a 49 anos de idade variou de 2.400 a 5.300 ng g^{-1} dependendo da região onde residiam. Os pesquisadores concluíram que as concentrações de Hg foram altas em todas as comunidades e este resultado foi relacionado ao consumo de peixes da região.

Bortoli (2010), que também avaliou as concentrações de Hg nos cabelos de mulheres de São Paulo (SP), Cubatão (SP) e Novo Airão (AM), encontrou média de 180 ng g^{-1} nas paulistanas, 190 ng g^{-1} nas Cubatenses e de 5.670 ng g^{-1} , nas participantes do Amazonas. Dentre as participantes dos dois primeiros grupos, nenhuma apresentou concentração de Hg acima de 2.000 ng g^{-1} , concentração para adultos não expostos ocupacionalmente, de acordo com a WHO (1990). No grupo das mulheres amazonenses, 21,8% apresentaram valores abaixo dessa referência. De acordo com os valores máximos em regiões onde há exposição reconhecida por Hg (6.000 ng g^{-1}), foi observado que 30,9% destas participantes tinham concentrações de Hg nos cabelos acima desse valor de referência. A pesquisadora ressaltou que 92,7% das mulheres de Novo Airão relataram consumir peixes da região pelo menos uma vez por semana.

Pinheiro *et al.* (2005), ao avaliarem 40 mulheres de três comunidades da bacia do rio Tapajós, verificaram que não houve diferença estatística em relação às concentrações de Hg total nas amostras de cabelos nas diferentes comunidades. O primeiro grupo, composto por gestantes, apresentou a média de concentração de Hg de 8.250 ng g^{-1} enquanto o segundo, composto por mulheres não gestantes, 9.390 ng g^{-1} do metal. No entanto, os pesquisadores

observaram que as concentrações do Hg no terceiro trimestre de gravidez eram maiores (9.650 ng g^{-1}) que no primeiro (6.620 ng g^{-1}) e segundo trimestres (6.710 ng g^{-1}).

Pinheiro *et al.* (2008) analisaram novamente duas comunidades da mesma região que o estudo anterior. Porém, selecionaram mulheres de uma comunidade ribeirinha da bacia do rio Tocantins, que formaram o grupo controle do estudo, pois estas não pertenciam a uma região considerada contaminada por Hg. Os autores observaram que nas comunidades da bacia do rio Tapajós as voluntárias apresentaram concentrações de Hg no cabelo significativamente maiores (12.926 ng g^{-1}) em relação à comunidade da bacia do rio Tocantins (3.290 ng g^{-1}).

Estudos epidemiológicos têm evidenciado correlação positiva entre as concentrações de Se e Hg no sangue (MUCKE *et al.*, 2001; BÁRÁNY *et al.*, 2002; KARITA e SUZUKI, 2002; LINDBERG *et al.*, 2004; HANSEN *et al.*, 2004). Tal evidência foi verificada nesta pesquisa em relação às concentrações plasmáticas do mineral, conforme as análises de regressão. Os coeficientes de correlação (R^2) das concentrações de Se plasmático e eritrocitário foram 5,9% e 3,7%, respectivamente (Tabela 7). Estes coeficientes expressam a porcentagem da variabilidade no nível de Hg nos cabelos (ng g^{-1}) que é explicada pelas variáveis independentes.

De acordo com Gailer *et al.* (2000), o efeito protetor do Se tem sido associado a uma maior retenção de Hg ao invés de maior excreção. Desta forma, acredita-se que o Se juntamente com o Hg forme um complexo Hg-Se, que por sua vez, liga-se a selenoproteína P favorecendo uma redistribuição corporal do metal. Porém, segundo Bárány *et al.* (2005) e Lindberg *et al.*, (2004), os estudos sobre como esta interação acontece ainda não são suficientes para elucidar a dinâmica desse complexo. Sugere-se que uma ingestão adequada de Se possa promover um efeito de proteção contra o Hg e seus compostos tóxicos.

Apesar dos valores elevados de Hg encontrados na região Amazônica, poucos trabalhos avaliaram sintomas ou sinais clínicos referentes a essa intoxicação.

No estudo de Dorea *et al.* (2003) com mulheres vivendo em comunidades ribeirinhas do Rio Negro, os sintomas pesquisados foram fraquezas musculares, amortecimentos de membros, tremores, desequilíbrio e alterações sensoriais. No entanto, na população deste estudo tais sinais não foram observados. Malm *et al.* (1995) realizaram outra pesquisa com populações ribeirinhas no Pará e também não encontraram tais sinais (desequilíbrio sensitivo, constrição de campo visual, ataxia, redução da capacidade auditiva, tremores, reflexos de tendões e desequilíbrios mentais e salivares).

Tabela 7. Coeficiente de regressão das variáveis independentes que influenciaram as concentrações de Hg (ng g^{-1}) nos cabelos (variável dependente) das participantes.

Variáveis independentes	β	p-valor ^a	R ² ajustado	p-valor ^b
Se no Plasma ($\mu\text{g/L}$) ^c	3,117	0,177	0,059	0,020
Se no Eritrócito ($\mu\text{g/L}$) ^d	0,970	0,656	0,037	0,096

^a Valor de p referente ao coeficiente β .

^b Valor de p referente ao R² ajustado

^c Modelo ajustado pelo índice de massa corporéa (kg/m^2), escolaridade (anos de estudo), idade (anos) e renda (salários mínimos).

^d Modelo ajustado pelo índice de massa corporéa (kg/m^2), circunferência da cintura (cm), escolaridade (anos de estudo), idade (anos), ingestão energética (kcal/dia) e renda (salários mínimos).

5.7 SELÊNIO E AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO: MDA E ORAC

O método de ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio) avalia a capacidade do plasma de inibir o radical peroxil mostrando resistência aos danos oxidativos. Dessa forma, verifica-se que quanto maiores as concentrações do Se no sangue, maior será a capacidade antioxidante total, sendo este dado relacionado à ação ou função antioxidante do mineral.

De acordo com as análises de regressão, houve associação entre as concentrações de Se no plasma e nos eritrócitos com o ORAC (Tabela 8). Os coeficientes de correlação (R²) das concentrações de Se plasmático e eritrocitário foram 6,0% e 7,7%, respectivamente. Estes coeficientes expressam a porcentagem da variabilidade do ORAC que é explicado pelas variáveis independentes (Se plasmático e eritrocitário). Não foram encontrados estudos que avaliaram a capacidade antioxidante por meio do ORAC que relacionem ou associem com as concentrações de Se em indivíduos saudáveis.

Tabela 8. Coeficiente de regressão das variáveis independentes que influenciaram a capacidade antioxidante – ORAC (mmol eq. trolox/g de amostra) (variável dependente) das participantes.

Variáveis independentes	β	p-valor ^a	R ² ajustado	p-valor ^b
Se no Plasma ($\mu\text{g/L}$) ^c	-0,002	0,555	0,060	0,015
Se no Eritrócito ($\mu\text{g/L}$) ^d	-0,005	0,094	0,077	0,005

^a Valor de p referente ao coeficiente β .

^b Valor de p referente ao R² ajustado

^c Modelo ajustado pelo índice de massa corporéa (kg/m^2), circunferência da cintura (cm), renda (salários mínimos).

^d Modelo ajustado pelo índice de massa corporéa (kg/m^2), circunferência da cintura (cm), renda (salários mínimos).

Os radicais livres de oxigênio podem induzir a reação de peroxidação lipídica. Os ácidos graxos insaturados no plasma, em última instância, podem gerar produtos de peroxidação lipídica, tais como o malondialdeído (MDA). Dessa forma, as concentrações de MDA podem refletir o nível de estresse oxidativo do organismo. De acordo com as análises de regressão, não houve associação entre as concentrações de Se no plasma e nos eritrócitos com o MDA (Tabela 9).

Tabela 9. Coeficiente de regressão das variáveis independentes que influenciaram a concentração plasmática de malondialdeído (μM) (variável dependente) das participantes.

Variáveis independentes	β	p-valor ^a	R ² ajustado	p-valor ^b
Se no Plasma ($\mu\text{g/L}$) ^c	$1,0 \times 10^{-4}$	0,980	-0,015	0,675
Se no Eritrócito ($\mu\text{g/L}$) ^c	$1,0 \times 10^{-3}$	0,239	-0,005	0,505

^a Valor de p referente ao coeficiente β .

^b Valor de p referente ao R² ajustado

^c Modelo ajustado pelo índice de massa corporal (kg/m^2), idade (anos), ingestão energética (kcal/dia), circunferência da cintura (cm), renda (salários mínimos) e escolaridade (anos de estudo).

O estudo de Gác *et al.* (2014), tinha como objetivo definir a relação entre as concentrações de Se no sangue e estresse oxidativo (concentração de MDA) em 337 crianças saudáveis da Espanha. A concentração de Se não exerceu nenhum efeito direto nas concentrações de MDA ($r = 0,08$; $p > 0,05$). Em outro estudo espanhol, Galan-Chilet *et al* (2014) avaliaram em uma população adulta a associação entre o Se no plasma e as concentrações de MDA na urina. Os autores também não observaram correlações significativas entre esses marcadores.

Krishnan e Rani (2014) também não encontraram nenhuma correlação significativa entre a concentração de Se e MDA em pacientes com doença de Alzheimer ou demência de origem vascular. Entretanto, outros estudos verificaram uma diminuição das concentrações de MDA após a suplementação com Se (ZHANG *et al.*, 2005; FABIAN *et al.*, 2013; SITTA *et al.*, 2011; SMOLKOVÁ *et al.*, 2004; GRYGIEL-GÓRNIK *et al.*, 2014).

5.8 POLIMORFISMO PRO198LEU

Ao avaliar a presença do SNP (rs 1050450) no gene que codifica a enzima glutation peroxidase1 nas 190 amostras do estudo foi observado que 56,7% das participantes apresentaram genótipo selvagem (Pro/Pro), ou seja, homozigotos para prolina, 36,8% dos indivíduos heterozigotos (Pro/Leu) e 6,8% homozigotos para leucina (Leu/Leu). A frequência relativa do alelo variante foi de 0,25

Os resultados da genotipagem apresentaram-se de acordo com o equilíbrio de Hardy Weinberg, o qual determina que as frequências alélicas devem permanecer constantes ao longo das gerações, caso não sejam interferidas por nenhum fator evolutivo. Dessa forma, o teste de qui-quadrado (χ^2) foi aplicado e o valor encontrado foi de 0,1127 e a probabilidade associada a esse valor, considerando um grau de liberdade, foi maior que 5%, indicando que a população estava de acordo com o equilíbrio.

A Tabela 10 ilustra a distribuição das participantes de acordo com o SNP Pro198Leu.

Tabela 10. Distribuição do SNP Pro198Leu (rs 1050450) no gene que codifica GPx 1 nas participantes (n=190).

Genótipos códon 198 da GPx 1	n	%
Pro/Pro	107	56,3
Pro/Leu	70	36,8
Leu/Leu	13	6,8

Quatro pesquisas descrevem a frequência do polimorfismo Pro198Leu na população da cidade de São Paulo. Nishimura (2010) em seu estudo com 175 pacientes com câncer da cavidade orofaríngea, encontrou prevalência de 50% de indivíduos com genótipo selvagem (Pro/Pro), 43% heterozigoto (Pro/Leu) e 7% de homozigoto (Leu/Leu) para o polimorfismo. Em seu grupo controle, que foi constituído por 203 indivíduos da mesma cidade, 51% Pro/Pro, 43% Pro/Leu e 6% Leu/Leu.

Cominetti *et al.* (2011), no seu trabalho realizado com 37 mulheres obesas, observaram 49% de Pro/Pro, 38% de Pro/Leu e 13% de Leu/Leu. Donadio (2011), ao avaliar 124 indivíduos adultos não doentes, verificou que a prevalência de Pro/Pro foi de 49%, de Pro/Leu 47% e apenas 3% de Leu/Leu.

Cardoso *et al* (2012), ao determinar o polimorfismo em um grupo de 28 idosos com doença de Alzheimer, observaram que 75% apresentaram genótipo Pro/Pro, 14% de

heterozigotos e 11% de Leu/Leu. No mesmo estudo, no grupo controle, formado por 29 idosos sem a doença, os pesquisadores encontraram 72% com genótipo Pro/Pro, 14% de Pro/Leu e 14% de homozigotos Leu/Leu.

Silva (2013), em seu trabalho realizado com a população cearense, observou que 54,5% dos indivíduos apresentaram genótipo Pro/Pro, 38,1% genótipo Pro/Leu e 7,4% de genótipo Leu/Leu.

Hiragi *et al.* (2011), avaliaram a frequência do polimorfismo em 304 indivíduos pertencentes a três grupos étnicos diferentes. No grupo constituído por 60 adultos indígenas, 95% possuíam genótipo selvagem (Pro/Pro), 3% eram heterozigotos (Pro/Leu) e 2% homozigotos (Leu/Leu). No grupo composto por 72 indivíduos afrodescendentes, 71% eram Pro/Pro, 22% Pro/Leu e 7% Leu/Leu. O terceiro grupo, formado por 172 indivíduos que residiam no Distrito Federal, 47% eram Pro/Pro, 40% Pro/Leu e 13% Leu/Leu.

Fosberg *et al.* (1999), em análise realizada com 25 suecos, encontrou 52% de indivíduos homozigotos para prolina (selvagens), 36% de heterozigotos e 12% de homozigotos para leucina. Em outro estudo, Fosberg *et al.* (2000), determinaram a frequência de alelos para esse polimorfismo em uma população sueca e outra finlandesa. A população sueca foi formada por 101 indivíduos infartados e 214 formaram o grupo controle. A distribuição dos genótipos dos indivíduos do grupo caso foi de 55% homozigotos selvagens, 38% heterozigotos e 7% de homozigotos para leucina. No grupo controle, a frequência dos genótipos foi de 53%, 40% e 7%, respectivamente. No grupo da Finlândia, dos 66 indivíduos avaliados, 35% eram homozigotos para prolina, 48% heterozigotos e 17% homozigotos para leucina.

De acordo com os trabalhos citados, a menor distribuição conforme os genótipos está relacionada ao homozigoto Leu/Leu. Algumas pesquisas afirmam que a presença do alelo Leu reduz a atividade da enzima GPx nos indivíduos com este alelo variante (HANSEN *et al.* 2009; RAVN-HAREN *et al.*, 2006). Dessa forma, se há uma diminuição da atividade enzimática da GPx, o sistema antioxidante dos indivíduos que apresentam o alelo Leu pode ser afetado. Estudos também têm associado a presença deste alelo variante a um aumento do risco de alguns tipos de câncer (RATNASINGHE *et al.*, 2000; HU e DIAMOND, 2003; ZHAO *et al.*, 2005). Entretanto, essas associações não foram observadas em todas as populações estudadas, uma vez que a frequência do alelo Leu varia de acordo com o grupo étnico (ZHAO *et al.*, 2005).

De acordo com Pena *et al.* (2011), a origem genética da população brasileira é o resultado de várias miscigenações e, apesar disso, apresenta uma uniformidade maior que o

esperado. No trabalho desses pesquisadores foi avaliado a ascendência total de 934 brasileiros de diferentes raças residentes em quatro regiões do país, com exceção da região centro-oeste. Foram avaliados polimorfismos de inserção e deleção e os genótipos encontrados foram utilizados para estimar os componentes europeus, africanos e ameríndios dos indivíduos. Os resultados mostraram que a ancestralidade das diferentes populações das regiões do Brasil é semelhante.

A população de Rondônia é uma das mais diversificadas do Brasil, composta de migrantes oriundos de todas as regiões do país. O interior do Estado é formado por goianos, paranaenses, paulistas, mineiros, gaúchos, capixabas, baianos, mato grossenses e sergipanos, enquanto a capital, é formada por cearenses, maranhenses, amazonenses e acreanos (IBGE, 2014).

Poucos estudos associaram o polimorfismo Pro198Leu com biomarcadores do estado nutricional relativo ao Se em indivíduos saudáveis. A Tabela 11 apresenta uma comparação das médias das concentrações de Se plasmático, eritrocitário, atividade da GPx, MDA e ORAC de acordo com o genótipo para o polimorfismo Pro198Leu. Observou-se que não houve diferença significativa entre os parâmetros avaliados.

Donadio (2011) encontrou diferença significativa entre a atividade da GPx em mulheres paulistanas avaliadas de acordo com os genótipos do Pro198Leu. Silva (2013), também encontrou a mesma diferença em mulheres cearenses, indicando que a influência do gênero é um importante fator que deve ser considerado em estudos sobre esse polimorfismo.

Cominetti *et al.* (2011) não observaram diferenças nas concentrações de Se plasmático, eritrocitário e atividade da GPx entre os genótipos em ambas as fases de seu estudo (pré e pós suplementação de castanha-do-brasil), porém encontraram correlação entre o Se eritrocitário e a atividade da GPx apenas para o grupo Pro/Pro, em ambas as fases. O mesmo resultado foi observado no estudo de Cardoso *et al.* (2012), que também observaram correlação entre o Se eritrocitário e a atividade da GPx apenas para o grupo Pro/Pro, tanto nos indivíduos com Alzheimer quanto no grupo controle. A mesma correlação foi descrita por Jablonska *et al.* (2009), Hu e Diamond (2003) e Karunashinge *et al.* (2011). Estes dados são úteis para entender os mecanismos e a manutenção da variabilidade genética na população, bem como para a identificação de genes associados com doenças complexas (HIRAGI *et al.* 2011). Todos esses resultados mostram que o efeito do polimorfismo Pro198/Leu deve continuar sendo investigado em diferentes populações.

Tabela 11. Concentrações de Se plasmático, eritrocitário, atividade da enzima GPx, MDA e ORAC, de acordo com o genótipo para o polimorfismo Pro198Leu (rs1050450) no gene que codifica para GPx 1 das participantes.

Variáveis	Pro/Pro MD (DP) (n= 107)	Pro/Leu MD (DP) (n = 70)	Leu/Leu MD (DP) (n = 13)	p ^a
Se no Plasma (µg/L)	53,66 (52,25)	54,17 (39,93)	55,77 (18,66)	0,99
Se no Eritrócito (µg/L)	78,04 (38,83)	77,69 (36,18)	79,35 (29,44)	0,99
GPx Eritrocitária (U/g Hb)	47,51 (22,77)	44,26 (26,04)	42,61 (13,74)	0,58
MDA (µM)	0,97 (1,11)	0,84 (0,22)	0,85 (0,23)	0,60
ORAC (mmoleq. trolox/g de amostra)	1,63 (1,51)	1,59 (1,30)	1,28 (0,76)	0,71

^a Valor de p calculado pela ANOVA; MD - Média; DP - Desvio Padrão.

5.9 POLIMORFISMO GSTM1

A GST faz parte de uma família de enzimas intracelulares que modulam a ação de toxinas endógenas e exógenas sobre as células, evitando danos ao DNA (MANNERVICK, 1985). Esta família de enzimas está envolvida no metabolismo de muitos carcinógenos, poluentes ambientais e drogas anticancerígenas, por isso a inexistência de isoenzimas específicas pode gerar efeito significativo na tolerância do organismo ao estresse oxidativo (ZHENG *et al.*, 2002; MORAIS *et al.*, 2008). O gene da classe *mu* (GSTM1), abordado nesta pesquisa, é polimórfico em humanos e estão ausentes ou deletados de forma homozigótica em 40 a 50% em diferentes populações étnicas (NELSON *et al.* 1995; HATAGIMA *et al.*, 2000; GISNBERG *et al.*, 2009).

A Tabela 12 apresenta a distribuição das participantes de acordo com o genótipo do polimorfismo GSTM1. O genótipo nulo ou deletado (-/-) indica que o gene inteiro apresenta deleção e, portanto, o indivíduo não expressa a proteína GST. O genótipo presente (+/+) é a forma selvagem, ou seja, não apresenta deleção do gene e o indivíduo expressa a GST.

Tabela 12. Distribuição do polimorfismo GSTM1 no gene da GST das participantes (n = 180).

GSTM1	n	%
Presente (+/+)	104	57,80
Nulo ou Deletado (-/-)	76	42,20

Não foram observadas diferenças entre as concentrações de Hg na população avaliada de acordo com os genótipos do polimorfismo GSTM1, bem como os parâmetros relativos ao estresse oxidativo (Tabela 13).

Tabela 13. Concentrações de Hg, de MDA e valores de ORAC de acordo com o genótipo para o polimorfismo GSTM1 no gene da GST das participantes.

Variáveis	Presente (+/+)	Nulo (-/-)	p ^a
	MD (DP) (n= 104)	MD (DP) (n = 76)	
Hg (ng g ⁻¹)	563,65 (694,75)	708,63 (752,95)	0,184
MDA (μM)	0,95 (1,13)	0,87 (0,27)	0,570
ORAC (mmol eq. trolox/g de amostra)	1,65 (1,59)	1,58 (1,17)	0,730

^a Valor de p calculado pelo teste T-Student.

Klatau-Gimarães *et al.* (2005) verificaram que em algumas tribos indígenas da Amazônia os indivíduos que carregavam o genótipo nulo, ou seja, deleção do gene inteiro, tinham maiores concentrações de Hg nos cabelos. Tais pesquisadores concluíram que os fatores genéticos podem influenciar o acúmulo de Hg no organismo e os indivíduos com genótipo nulo não estão aptos a detoxificar o metal, pois essa função é atribuída à GST.

Entretanto, outros estudos não encontraram correlação entre as concentrações do metal com os genótipos do GSTM1. Gundacker *et al.* (2007), em seu estudo com 222 estudantes da Universidade de Viena, relacionaram as concentrações de Hg no sangue e na urina com os genótipos presente ou nulo do polimorfismo. Os autores não encontraram associação entre esses dois parâmetros, mas foi observado que as pessoas com genótipo nulo apresentavam valores mais elevados do metal. Os autores verificaram que 56% dos indivíduos carregavam o genótipo nulo tinham concentrações mais baixas de Hg no sangue coincidindo com concentrações típicas de populações não expostas à toxicidade. Os resultados levaram à hipótese de que os indivíduos com a deleção para GST apresentam atividade catalítica prejudicada e são menos capazes de aumentar a sua capacidade de excreção do Hg, levando a uma maior acumulação do metal no organismo.

Estudos sobre a relação entre o polimorfismo da GST e as concentrações de Hg em humanos são escassos. Custodio *et al.* (2004 e 2005) verificaram que o polimorfismo GSTM1 não teve efeito sobre as concentrações de Hg no sangue total, plasma e urina. Entretanto, concluíram que indivíduos carregadores do genótipo deletado apresentam atividade da enzima reduzida e, dessa forma, maiores concentrações e retenção de Hg.

Lee *et al.* (2009) analisaram o polimorfismo GSTM1 associado à exposição intra-uterina de Hg e o peso ao nascer de crianças de etnia coreana. Dentre as 417 gestantes avaliadas, 59,5% carregavam genótipo nulo sem diferença significativa nas concentrações de Hg no sangue e no cordão umbilical em relação às aquelas com genótipo selvagem. Apesar disso, os autores observaram que as crianças cujas mães carregavam o genótipo nulo apresentaram relação inversa do peso ao nascer com as concentrações de Hg no cordão umbilical. Entretanto, esta relação não foi observada nas crianças filhas de mães com genótipo selvagem. Os pesquisadores afirmaram que este fato pode ser explicado em razão do Hg ser transferido para o feto através da placenta. Dessa forma, foi demonstrado que o polimorfismo GSTM1 pode desempenhar papel importante na relação entre a concentração de Hg e o peso ao nascer.

Na população brasileira, a frequência desse polimorfismo também é elevada. Hatagima *et al.* (2000) avaliaram 658 indivíduos do Rio de Janeiro e 179 de Brasília e a frequência do genótipo nulo foi semelhante nas duas populações, 46% na população carioca e 49% na brasiliense. Gattás *et al.* (2004) analisaram a frequência em 594 indivíduos selecionados na cidade de São Paulo e 137 homens da área rural da Bahia. A distribuição do genótipo nulo avaliado foi mais frequente nos indivíduos brancos (55,4%) que nos pardos (41,4%) e negros (32,8%) em São Paulo. Na Bahia, essa frequência foi de 35,7%.

Hiragi *et al.* (2011) determinaram a frequência do polimorfismo em 304 indivíduos pertencentes a três grupos étnicos diferentes. No grupo constituído por 60 adultos indígenas, 55% apresentaram genótipo nulo e no grupo composto por 72 indivíduos afrodescendentes, 53%. No terceiro grupo, que foi formado por 172 indivíduos que residiam no Distrito Federal, 63% apresentaram genótipo deletado.

Em um estudo com 120 pacientes com diagnóstico de diabetes tipo 2 de Goiânia (GO), Pinheiro *et al.* (2013) observaram uma frequência do genótipo nulo de 41% no grupo caso, enquanto no grupo controle foi de 12,2%. Não foi observada qualquer associação da deleção com a suscetibilidade à doença na população estudada, apesar de ter sido observada uma associação com aumento significativo da glicemia de jejum, hemoglobina glicada e pressão arterial.

Anton *et al.* (2010) verificaram a influência do polimorfismo GSTM1 na suscetibilidade ao câncer de mama em 15 mulheres com diagnóstico da doença e em 30 mulheres saudáveis atendidas em um hospital do sul do Brasil. Foi observado que 46,7% das mulheres carregavam o genótipo nulo e 43,3% das mulheres do grupo controle também apresentaram a deleção do genótipo. Os pesquisadores sugeriram que a deleção homozigótica

do gene pode estar associada com maior susceptibilidade ao câncer de mama na população estudada, entretanto, mais estudos são necessários.

Possuelo *et al.* (2013) também avaliaram a frequência do polimorfismo GSTM1 em 49 pacientes diagnosticadas com câncer de mama e 49 mulheres saudáveis. A frequência de alelos nulos foi significativamente maior no grupo caso (58,8%) em comparação ao grupo controle (41,2%), sugerindo uma possível influência deste genótipo na susceptibilidade à doença.

Em trabalhos internacionais verificam-se porcentagens semelhantes aos resultados apresentados. Conforme Ginsberg *et al.* (2009), a porcentagem de indivíduos com genótipo nulo em afro-americanos é de 21%, em chineses de 58%, em japoneses 45%, em mexicanos 41% e em caucasianos 53%. Segundo Hatagima *et al.* (2000) a porcentagem em ingleses é de 54,5% e em franceses 42,9%.

6. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que as mulheres rondonienses residentes em área urbana considerada de risco de contaminação por Hg apresentaram status de Se inferior ao recomendado e independente do genótipo em relação ao SNP Pro198Leu no gene da GPx. A concentração de Hg nos cabelos estava dentro dos limites seguros e não houve relação com o polimorfismo de deleção no gene GSTM1. Os referidos polimorfismos também não afetaram os biomarcadores de estresse oxidativo avaliados.

7. CRONOGRAMA

Atividades Desenvolvidas	(2010 – 2015)	
	2010 - 2011	2012 - 2015
Revisão da Literatura	X	
Submissão do projeto ao Comitê de Ética (CEP)	X	
Disciplinas (20 Créditos)	X	X
Preparo dos Materiais para Coleta	X	
Coleta de Dados	X	
Análise do Consumo Alimentar e Antropometria	X	X
Análises da enzima GPx	X	
Análise de Hemoglobina	X	
Análise Determinação do Hg nos cabelos	X	
Análise de Se (Plasma e Eritrócito)	X	
Qualificação da Tese		X
Análise Estresse Oxidativo (MDA)		X
Análise Estresse Oxidativo (ORAC)		X
Determinações dos Polimorfismos Pro198Leu e GSTM1		X
Tabulação de Dados		X
Análise Estatística		X
Tese do Doutorado		X
Artigo Científico		X

REFERÊNCIAS

- ADAME, E.M.; FLOREA, D.; PÉREZ, L.S.; LÓPEZ, J.M.; LÓPEZ-GONZÁLEZ, B.; CRUZ, A.P. Deficient selenium status of a healthy adult spanish population. **Nutricion Hospitalaria**, v.27, n.2, p.524-528, 2012.
- AMORIM, M.I.; MERGLER, D.; BAHIA, M.O.; DUBEAU, H.; MIRANDA, D.; LEBEL, J.; BURBANO, R.R.; LUCOTTE, M. Cytogenetic damage related to low levels of methylmercury contamination in the Brazilian Amazon. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.72, n.4, p.497-507, 2000.
- AMOUREUX, D.A.; LISS, P.S.B.; TESSIER, E.A.; HAMREN-LARSSON, M.B.; DONARD, O.F.X. Role of oceans as biogenic sources of selenium. **Earth and Planetary Science Letters**, v.189, n.3/4, p.277-283, 2001.
- ARSOVA-SARAFINOVSKA, Z.; MZTEVSKA, N.; EKEN, A.; PETROVSKI, D.; BANEV, S.; DZIKOVA, S.; GEORGIEV, V.; SIKOLE, A.; ERDEM, O.; SAYAL, A.; AYDIN, A.; DIMOVSKI, A.J. GPx1 genetic polymorfism erythrocyte GPx activity and prostate câncer risk. **International Urology and Nephrology**, v.41, n.1, p.63-70, 2009.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA. **Diretrizes brasileiras de obesidade: 2009/2010**. 3.ed. Itapevi: AC Farmacêutica, 2009. 83p.
- AZEVEDO, F.A. **Toxicologia do mercúrio**. São Carlos: Rima, 2003. 292p.
- BAEYENS, W.R.G.; EBIGHAUS, R.; VASILIEV, O.F., eds. **Global and regional mercury cycles: sources, fluxes and mass balances**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1996. 563p. (NATO ASI series. Partnership sub-series 2: environment, v.21) [Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop on Regional and Global Mercury Cycles: sources, fluxes and mass balances, Novosibirsk, Russia, July 10-14, 1995].
- BÁRÁNY, E.; BERGDAHL, I.A.; BRATTEBY, L.E.; LUNDH, T.; SAMUELSON, G.; SCHUTZ, A.; SKERFVING, S.; OSKARSSON, A. Relationship between trace element concentrations in human blood and serum. **Toxicology Letters**, v.134, n.1/3, p.177-184, 2002.
- BASTOS, W.R.; GOMES, J.P.O.; OLIVEIRA, R.C.; ALMEIDA, R.; NASCIMENTO, E.L.; BERNARDI, J.V.E.; LACERDA, L.D.; SILVEIRA, E.G.; PFEIFFER, W.C. Mercury in the environment and riverside population in the Madeira River Basin, Amazon, Brazil. **Science of the Total Environment**, v.368, n.1, p.344-351, 2006. [Selected papers from the 7th International Conference on Mercury as a Global Pollutant, Ljubljana, Slovenia June 27 - July 2, 2004].
- BEATON, G.H. 1994. Criteria of an adequate diet. In: Shils RE, Olson JA, Shike M, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*, 8th edition. Philadelphia: Lea & Febiger. Pp. 1491-1505.
- BISINOTI, M.C. **Biogeoquímica aquática do mercúrio orgânico na bacia do Rio Negro, Amazônia**. Campinas, 2005. 169p. Tese de Doutorado – Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas.

BISINOTI, M.C.; JARDIM, W.F. O comportamento do metilmercúrio (meHg) no ambiente. **Química Nova**, v.27, n.4, p.593-600, 2004.

BOENING, D.W. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. **Chemosphere**, v.40, n.12, p.1335-1351, 2000.

BOISCHIO, A.A.; HENSHEL, D.S. Linear regression models of methyl mercury exposure during prenatal and early postnatal life among riverside people along the upper Madeira river, Amazon. **Environmental Research**, v.83, n.2, p.150-161, 2000.

BORTOLI, M.C. **Avaliação dos níveis sanguíneos do hormônio tireiodiano ativo (T3) e do estado nutricional relativo ao selênio de mulheres residentes em áreas de exposição ao mercúrio**. São Paulo, 2010. 130p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

BRABO, E.S.; SANTOS, E.O.; JESUS, I.M.; MASCARENHAS, A.F.; FAIAL, K.F. Níveis de mercúrio em peixes consumidos pela comunidade indígena de Sai Cinza na Reserva Munduruku, Município de Jacareacanga, Estado do **Pará, Brasil**. **Cadernos de Saúde Pública**, v.15, n.2, p.325-332, 1999.

BRASIL. Resolução CONAMA n.5, de 5 de agosto de 1993. Dispõe sobre o gerenciamento de resíduos sólidos gerados nos portos, aeroportos, terminais ferroviários e rodoviários. (Revogadas as disposições que tratam de resíduos sólidos oriundos de serviços de saúde pela Resolução n.358/05). **Diário Oficial da União**, Brasília, n.166, 31 de agosto de 1993. Seção 1, p.12996-12998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Coordenação geral da Política de Alimentação e Nutrição. **Sisvan: antropometria: como pesar e medir**. Brasília: Ministério da Saúde, 2004.

BRENNEISEN, P.; STEINBRENNER, H.; SIES, H. Selenium, oxidative stress, and health aspects. **Molecular Aspects of Medicine**, v.26, n.4/5, p.256-267, 2005.

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

BROWN, K.M.; ARTHUR, J.R. Selenium selenoproteins and human health: a review. **Public Health Nutrition**, v.4, n.2b, p.593-599, 2001.

BURK, R.F. Recent developments in trace element metabolism and function: newer roles of selenium in nutrition. **Journal of Nutrition**, v.119, n.7, p.1051-1054, 1998.

BURIM, R.V.; CANALLE, R.; MARTINELLI, A.L.C.; TAKAHASHI, C.S. Polymorphisms in glutathione S-transferases GSTM1, GSTT1 and GSTP1 and cytochromes P450 CYP2E1 and CYP1A1 and susceptibility to cirrhosis or pancreatitis in alcoholics. **Mutagenesis**, v.19, n.4, p.291-298, 2004.

CAMPOS, M.S.; SARKIS, J.E.S.; MULLER, R.C.S.; BRABO, E.S.; SANTOS, E.O. Correlation between mercury and selenium concentrations in Indian hair from Rondônia State, Amazon region, Brazil. **Science of the Total Environment**, v.287, n.1/2, p.155-161, 2002.

CANELA, M.C. **Determinação de mercúrio a nível de traço: aplicação em amostras de interesse ambiental.** Campinas, 1995. 79p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas.

CARDOSO, B.R.; ONG, T.P.; JACOB-FILHO, W.; JALUUL, O.; FREITAS, M.I.; COZZOLINO, S.M. Nutritional status of selenium in Alzheimer's disease patients. **British Journal of Nutrition**, v.103, n.6, p.803-806, 2010.

CARDOSO, B.R.; ONG, T.P.; JACOB-FILHO, W.; JALUUL, O.; FREITAS, M.I.; COMINETTI, C.; COZZOLINO, S.M. Glutathione peroxidase 1 polymorphism in Brazilian Alzheimers disease patients: relations to the enzyme activity and to selenium status. **Journal of Nutrigenetic and Nutrigenomics**, v.5, n.2, p.72-80, 2012.

CASTRO, L; FREEMAN, B.A. Reactive oxygen species in human health and disease. **Nutrition**, v.17, n.2, p.161-165, 2001.

CASTRO, N.S.S.; LIMA, M.O. Biomarkers of mercury exposure in the Amazon. **BioMed Research International**, v.2014, art.867069, p.1-10, 2014. [Review].

CEZAR, M.R.S. **Avaliação da exposição ao mercúrio e seus compostos em mães e seus recém-nascidos em Porto Velho – RO.** Belém, 2002. 69p. Dissertação de Mestrado - Núcleo de Medicina Tropical - Universidade Federal do Pará.

CINTRA, R.M.G.C. **Biodisponibilidade de selênio em dieta regional de São Paulo.** São Paulo, 1990. 74p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

CHANG, J.C.; GUTENMANN, W.H.; REID, C.M.; LISK, D.J. Selenium content of Brazil nuts from two geographic locations in Brazil. **Chemosphere**, v.30, n.4, p.801-802, 1995.

CHARRIER, J.; MAUGARD, C.M.; LE MEVEL, B.; BIGNON, Y.J. Allelotype influence at glutathione S-transferase M1 locus in breast cancer susceptibility. **British Journal of Cancer**, v.79, n.2, p.346-53, 1999.

CHAUHAN, A.; CHAUHAN, V. Oxidative stress in autism. **Pathophysiology**, v.13, n.13, p.171-181, 2006.

CHEN, C.L.; LIU, Q.; RELLING, M.V. Simultaneous characterization of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms by polymerase-chain reaction in American whites and blacks. **Pharmacogenetics**, v.6, n.2, p.187-191, 1996.

CHEN, C.; OU, L.; LI, B.; XING, L.; GUANG, J.; TIACHENG, W.; YUXI, G.; PEIQUN, Z.; MEI, L.; WEI, C.; ZHIFANG, C. Increased Oxidative DNA Damage, as assessed by urinary 8-hidroxy-2 deoxyguanosine concentrations, and serum redox status in persons exposed to mercury. **Clinical Chemistry**, v.51, n.4, p.759-767, 2005.

CHEN, H.; YU, M.; LI, M.; ZHAO, R.; ZHU, Q.; ZHOU, W.; LU, M.; LU, Y.; ZHENG, T.; JIANQ, J.; ZHAO, W.; XIANG, K.; JIA, W.; LIU, L. Polymorphic variations in manganese superoxide dismutase (MnSOD), glutathione peroxidase – 1 (GPx 1), and catalase (CAT) contribute to elevated plasma triglyceride levels in Chinese patients with type 2 diabetes or diabetic cardiovascular disease. **Molecular Cell Biochemistry**, v.363, p.85–91, 2012.

CHEN, Y.; KAPETANOVIC, I.; CROWELL, J.; IP, C.; MORRISSEY, R.; LYUBIMOV, A. Thirteen week oral (Gavage) toxicity study of L-Se-Methylselenocysteine (SeMC) in rats. **Toxicological Science**, v.90, n.1-S, p.343, 2006.

COLOMBO, J.; ROSSIT, A.R.B.; CAETANO, A.; BORIM, A.A.; WORNATH, D.; SILVA, A.E. GSTT1, GSTM1 and CYP2E1 genetic polymorphisms in gastric cancer and chronic gastritis in a Brazilian population. **World Journal of Gastroenterology**, v.10, n.9, p.1240–1245, 2004.

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. **Nutrition Journal**, v.10, p.75, 2011.

COMINETTI, C. **Efeito da suplementação com castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) sobre o estresse oxidativo em mulheres obesas e sua relação com o polimorfismo Pro198Leu no gene da glutathione peroxidase 1**. São Paulo, 2010. 115p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

COMINETTI, C.; BORTOLI, M.C.; ABDALLA, D.S.P.; COZZOLINO, S.M.F. Considerations about oxidative stress, selenium and nutrigenetics. **Nutrire**, v.36, n.3, p.131-153, 2011. [Review].

COMINETTI, C.; BORTOLI, M.C.; PURGATTO, E.; ONG, T.P.; MORENO, F.S.; GARRIDO Jr., B.G.; COZZOLINO, S.M.F. Associations between glutathione peroxidase-1 Pro198Leu polymorphism, selenium status, and DNA damage levels in obese women after consumption of Brazil nuts. **Nutrition**, v.27, n.9, p.891-896, 2011.

COUTINHO, V.E. **Efeito da suplementação de selênio por meio da ingestão de castanhas-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), no estado nutricional relativo ao selênio de praticantes de atividade física (capoeira)**. São Paulo, 2001. 150p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

COVAULT, J.; ABREU, C.; KRANZLER, H.; ONCKEN, C. Quantitative real-time PCR for gene dosage determinations in microdeletion genotypes. **BioTechniques**, v.35, n.3, p.594-598, 2003.

COZZOLINO, S.M.F. Deficiências de minerais. **Estudos Avançados**, v.21, n.60, p.119-126, 2007.

CRESPO-LOPEZ, M.E.; SA, A.L.; HERCULANO, A.M.; BURBANO, R.R.; NASCIMENTO, J.L.M. Methylmercury genotoxicity: a novel effect in human cell lines of the central nervous system. **Environment International**, v.33, n.2, p.141–146, 2007.

CUSTODIO, H.M.; BROBERG, K.; WENNBERG, M.; JANSSON, J.H.; VESSBY, B.; HALLMANS, G.; STEGMAYR, B.; SKERFVING, S. Polymorphisms in glutathione-related genes affect methylmercury retention. **Archives of Environmental Health**, v.59, n.11, p.588–595, 2004.

CRESPO-LÓPEZ, M.E.; SANTOS, E.C.O.; BRABO, E.S.; RODRIGUES, A.R.; CÔRTEZ, M.I.T.; SILVEIRA L.C.L. Comparative study of human exposure to mercury in riverside

communities of Amazon. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.39, n.3, p.411-414, 2006.

CUSTODIO, H.M.; HARARI, R.; GERHARDSSON, L.; SKERFVING, S.; BROBERG, K. Genetic influences on the retention of inorganic mercury. **Archives of Environmental & Occupational Health**, v.60, n.1, p.17-23, 2005.

DAVIS, C.D.; UTHUS, E.O. Dietary selenite and azadeoxycytidine treatments affect dimethylhydrazine-induced aberrant crypt formation in rat colon and DNA methylation in HT – 29 cells. **Journal of Nutrition**, v.132, n.2, p.292-297, 2002.

DEJONG, J.L.; CHANG, C.M.; WHANG-PERNG, J.; KNUTSEN, T.; TU, C.P.D. The human liver glutathione S-transferase gene superfamily: expression and chromosome mapping of Hb subunit cDNA. **Nucleic Acids Research**, v.16, n.17, p.8541-8554, 1988.

DI PIETRO, A.; VISALLI, G.; LA MAESTRA, S.; MICALE, R.; BALUCE, B.; MATARESE, G.; CINGANO, L.; SCOGGIO, M.E. Biomonitoring of DNA damage in peripheral blood lymphocytes of subjects with dental restorative fillings. **Mutation Research**, v.650, n.2, p.115-122, 2008.

DOMINGUES, J. **Determinação de mercúrio total em amostras de cabelo e sua relação com o desenvolvimento psicomotor de crianças na comunidade de Barreiras, Pará.** Belém, 2000. 91p. Dissertação de Mestrado - Núcleo de Medicina Tropical - Universidade Federal do Pará.

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

DRASCH, G.; MAILÄNDER, S.; SCHLOSSER, C.; ROIDER, G. Content of non-mercury-associated selenium in human tissues. **Biological Trace Element Research**, v.77, n.3, p.219-230, 2000.

DUMONT, E.; VANHAECKE, F.; CORNELIS, R. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.385, n.7, p.1304-1323, 2006.

DUSINSKÁ, M.; VALLOVÁ, B.; URSÍNYOVÁ, M.; HLADÍKOVÁ, V.; SMOLKOVÁ, B.; WSÓLOVÁ, L.; RASLOVÁ, K.; COLLINS, A.R. DNA damage and antioxidants; fluctuations through the year in a central European population group. **Food and Chemical Toxicology**, v.40, n.8, p.1119-1123, 2002.

EGASHIRA, E.M.; MIZIARA, A.P.B.; LEONI, L.A.B. Grupo do arroz, pão, massa, batata e mandioca. PHILIPPI, S.T., org. **Pirâmide dos alimentos: fundamentos básicos da nutrição.** 2.ed. Barueri: Manole, 2014. (Guias de Nutrição e Alimentação).

EPA (US. Environmental Protection Agency). Mercury in Medical Facilities. Revised August 2003; Updated 2005

ERCAL, N.; GURER-ORHAN, H.; AYKIN-BURNS, N. Toxic metals and oxidative stress. Part I. Mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.1, n.6, p.529-539, 2001.

FABIAN, E.; POLOSKEY, P.; KÓSA, L.; ELMADFA, I.; RÉTHY, L.A. Nutritional supplements and plasma antioxidants in childhood asthma. **Wiener Klinische Wochenschrift**, v.125, n.11/12, p.309–315, 2013.

FADINI, P.S.; JARDIM, W.F. Is the Negro River Basin (Amazon) impacted by naturally occurring mercury? **Science of the Total Environment**, v.275, n.1/3, p.71-82, 2001.

FAIRWEATHER-TAIT, S.J.; BAO, Y.; BROADLEY, M.R.; COLLINGS, R.; FORD, D.; HESKETH, J.E.; HURST, R. Selenium in human health and disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.14, n.7, p.1337-1383, 2011.

FARELLA, N. **Les fermes familiales de la région frontière du Tapajós en Amazonie brésilienne**: relations entre les origines, les pratiques agricoles, les impacts sur les sols et le déboisement. Montréal, 2005. 209p. Tese de Doutorado – Université Du Québec à Montréal.

FARIAS, L.A, FAVARO, D.I.T., VASCONCELLOS, M.B.A. Determinação de mercúrio e metilmercúrio em amostras de cabelo e peixes. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.68, n.3, p.451-460, 2009.

FARIAS, L.A, SANTOS, N.R., FAVARO, D.I.T., BRAGA, E.S. Mercúrio total em cabelo de crianças de uma população costeira, Cananéia, São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.24, n.10, p.2249-2256, 2008.

FARIAS, L.A. **Avaliação do conteúdo de mercúrio, metilmercúrio e outros elementos de interesse em peixes e em amostras de cabelos e dietas de pré-escolares da Região Amazônica**. São Paulo, 2006. 233p. Tese de Doutorado – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo.

FARIAS, L.A.; FÁVARO, D.I.T.; MAIHARA, V.A.; VASCONCELOS, M.B.A.; YUYAMA, L.K.; AGUIAR, J.P.L.; ALENCAR, F.H. Assessment of daily dietary intake of Hg and some essential elements in diets of children from the Amazon region. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v.270, n.1, p.217-223, 2006.

FOLVEN, K.I.; GLOVER, C.N.; MALDE, M.K.; LINDEBEYE, A.K. Does selenium modify neurobehavioral impacts of developmental methylmercury exposure in mice? **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.28, n.1, p.111-119, 2009.

FORD, M.; DELANEY, K.A.; LING, L.; ERICKSON, T. **Clinical toxicology**. Philadelphia: W. B. Saunders, 2001. p.737–742.

FORSBERG, L.; DE FAIRE, U.; MARKLUND, S.L.; ANDERSSON, P.M.; 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.

FOSBERG, L.; DE FAIRE, U.; MORGENSTERN, R. Low yield of polymorphisms from EST blast searching: analysis of genes related to oxidative stress and verification of the P197L polymorphism in GPX1. **Human Mutation**, v.13, n.4, p.294-300, 1999.

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

FRISANCHO, A.R. **Anthropometric standards for the assessment of growth and nutritional status**. Ann Arbor: University of Michigan Press, 1990. 189p.

GÁC, P.; PAWLAS, N.; POREBA, R.; POREBA, M.; MARKIEWICZ-GÓRKA, I.; JANUSZEWSKA, L.; OLSZOWY, Z.; PAWLAS, K. Interaction between blood selenium concentration and a levels of oxidative stress and antioxidative capacity in healthy children. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.39, n.1, p.137-144, 2014.

GAILER, J.; GRAHAM, N.G.; PICKERING, I.J.; MADDEN, S.; PRINCE, R.C.; YU, E.Y.; DENTON, M.B.; YOUNIS, H.S.; APOSHIAN, H.V. Structural Basis of the Antagonism between Inorganic Mercury and Selenium in mammals. **Chem.Res.Toxicol.** 2000, 13-1135-1142.

GALAN-CHILET, I.; TELLEZ-PLAZA, M.; GUALLAR, E.; MARCO, G.; LOPEZ-IZQUIERDO, R.; GONZALEZ-MANZANO, I.; TORMOS, M.C.; MARTIN-NUÑEZ, G.M.; ROJO-MARTINEZ, G.; SAEZ, G.T.; MARTÍN-ESCUADERO, J.C.; REDON, J.; JAVIER-CHAVES, F. Plasma selenium and oxidative stress biomarkers: a gene-environment interaction population based study. **Free Radical Biology and Medicine**, v.74, p.229-236, 2014.

GALVÃO, R.C.F.; BERNARDI, J.V.E.; ALMEIDA, R.; BASTOS, W.R.; GOMES, J.P.O. Relação espacial do mercúrio e elementos traços em sedimento de fundo no Alto Rio Madeira. In: SEMINÁRIO DE RECURSOS HÍDRICOS DA BACIA HIDROGRÁFICA DO PARAÍBA DO SUL: O EUCALÍPTO E O CICLO HIDROLÓGICO, 1, Taubaté, 2007. **Anais**. Taubaté: IPABHi, 2007. p.51-57.

GANTHER, H.E.; SUNDE, M.L. Factors in fish modifying methylmercury toxicity and metabolism. **Biological Trace Element Research**, v.119, n.3, p.221-233, 2007.

GATTÁS, G.H.F.; KATO, M.; SOARES-VIEIRA, J.A.; SIRAQUE, M.S.; KOHLER, P.; GOMES, L.; REGO, M.A.V.; BYDŁOWSKI, S.P. Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/ GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, n.4, p.451-458, 2004.

GINSBERG, G.; SMOLENSKI, S.; HATTIS, D.; GUYTON, K.Z.; JOHNS, D.O.; SONAWANE, B. Genetic polymorphism in glutathione transferases (GST): population distribution of GSTM1, T1 and P1 conjugating activity. **Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews**, v.12, n.5/6, p.389-439, 2009.

GONZAGA, I.B.; MARTENS, A.; COZZOLINO, S.M.F. Selênio. In: COZZOLINO, S.M.F., org. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 2.ed. Barueri: Manole, 2007. Cap.28, p.575-613.

GONZAGA, I.B. **Avaliação nutricional relativa ao selênio em crianças com dieta enriquecida de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*, L.)**. São Paulo, 2002. 157p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

GONZAGA, I.B.; MARTENS, A.; COZZOLINO, S.M.F. Selênio. In: COZZOLINO, S.M.F., org. **Biodisponibilidade de nutrientes**. Barueri: Manole, 2005. cap.26, p.539-577.

GREGUS, Z.; GYURASICS, A.I.; CSANAKY, I.; PINTER, Z. Effects of methylmercury and organic acid on the disposition of exogenous selenium in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.174, n.2, p.177–187, 2001.

GRYGIEL-GÓRNIAK, B.; MARCINKOWSKA, J.; SZCZEPANIK, A.; PRZYSLAWSKI, J. Nutritional habits and oxidative stress in postmenopausal age. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej**, v.124, n.6, p.298–305, 2014.

GUNDACKER, C.; KOMARNICKI, G.; ZÖDL, B.; FORSTER, C.; SHUSTER, E.; WITTMANN, K. Whole blood mercury and selenium concentrations in a selected Austrian population: Does gender matter? **Science of the Total Environment**, v.372, n.1, p.76-86, 2006.

GUNDACKER, C.; KOMARNICKI, G.; JAGIELLO, P.; GENCIKOVA, A.; DAHMEN, N.; WITTMANN, K.J.; GENCIK, M. Glutathione-S-transferase polymorphism, metallothionein expression, and mercury levels among students in Austria. **Science of the Total Environment**, v.385, n.1/3, p.37-47, 2007.

HACON, S.S.; DÓREA, J.G.; FONSECA, M.F.; OLIVEIRA, B.A.; MOURÃO, D.S.; RUIZ, C.M.V.; GONÇALVES, R.A.; MARIANI, C.F.; BASTOS, W.R. The influence of changes in lifestyle and mercury exposure in riverine populations of the Madeira River (Amazon Basin) near a hydroelectric project. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.11, n.3, p.2437-2455, 2014.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanisms, measurement, and significance. **American Journal and Clinical Nutrition**, v.57, n.5, suppl., p.715S-725S, 1993.

HAMANASHI, 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 intima-media thickness of carotid arteries and risk of macrovascular disease in Japanese type 2 diabetic patients. **Diabetes**, v.53, n.9, p.2455-2460, 2004.

HARADA, M.; NAKANISHI, J.; YASODA, E.; PINHEIRO, M.C.N.; OIKAWA, T.A.G.; GUIMARÃES, G.A.; CARDOSO, B.S.; KIZAKI, T.; OHNO, H. Mercury pollution in the Tapajós River basin, Amazon: mercury level of head hair and health effects. **Environment International**, v.27, n.4, p.285–290, 2001.

HATAGIMA, A.; KLATAU-GUIMARÃES, M.Z.; SILVA, F.P.; CABELLO, P.H. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) polymorphism in two Brazilian populations. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, n.4, p.709-713, 2000.

HERBETTE, S.; ROECKEL-DREVET, P.; DREVET, J.R. Seleno-independent glutathione peroxidases: more than simple antioxidant scavengers. **FEBS Journal**, v.274, n.9, p.2163-2180, 2007.

HERCULANO, A.M.; CRESPO-LÓPEZ, M.E.; LIMA, S.M.A.; PINCANÇO DINIZ, D.L.W.; NASCIMENTO, J.L.M. Methylmercury intoxication activates nitric oxide synthase in chick retinal cell culture. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.39, n.3, p.415–418, 2006.

HOLBEN, D.H.; SMITH, A.M. The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. **Journal of the American Dietetic Association**, v.99, n.7, p.836-843, 1999.

HORVAT, M. BAEYENS, W.; EBINGHAUS, R.; VASILIEV, O. Mercury analysis and speciation in environmental samples. In: NATO ASI SERIES 2 ENVIRONMENT: global and regional mercury cycles: sources, fluxes and mass balances, Novosibirsk, 1996. Kluwer, 1996. p.1-31.

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, n.12, p.3347-3351, 2003.

HSIEH, Y.Y.; SHEN, W.S.; LEE, L.Y.; WU, T.L.; NING, H.C.; SUN, C.F. Long-term changes in trace elements in patients undergoing chronic hemodialysis. **Biological Trace Element Research**, v.109, n.2, p.115-121, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Atlas do Censo demográfico 2010**. Rio de Janeiro: IBGE, 2013. Disponível em: http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv64529_capa_sum.pdf. Acesso em: 02 Jan. 2015

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo demográfico 2010: características da população e dos domicílios: resultados do universo**. Rio de Janeiro: IBGE, 2011. 270p. Disponível em: http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/93/cd_2010_caracteristicas_populacao_domicilios.pdf. Acesso em: 02 Jan. 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estimativas da população residente no Brasil e unidades da Federação com data de referência em 1º de julho de 2014**. 2014. 8p. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Estimativas_de_Populacao/Estimativas_2014/nota_metodologica_2014.pdf. Acesso em: 02 Jan. 2015.

INSTITUTE OF MEDICINE (United States). **Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoides**. Washington: National Academy Press, 2000. 529p.

INTERNATIONAL PROGRAM ON CHEMICAL SAFETY; UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Methylmercury**. Geneva: World Health Organization, 1990. v.118, 144p. (Methylmercury in environmental health criteria, 101).

INSTITUTE OF MEDICINE (United States). Introduction to dietary reference intakes. In: _____. **Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoides**. Washington: National Academy Press, 2000. cap.1, p.21-34.

INTERNATIONAL PROGRAM ON CHEMICAL SAFETY; UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Methylmercury**. Geneva: World Health Organization, 1990. v.118, 144p. (Methylmercury in environmental health criteria, 101).

INSTITUTE OF MEDICINE (United States). Nutrient assessment of individuals statistical foundations. In: _____. **Dietary reference intakes: applications in dietary assessment**. Washington: National Academy, 2000. append B, p.185-210.

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.48, n.6, p.383–386, 2009.

JAFFÉ, W.G.; RUPHAEL, M.D.; MONDRAGON, M.C.; CUEVAS, M.A. Estudio clínico e bioquímicos em niños escolares de uma zona selenífera. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.22, n.4, p.595-611, 1972.

JAIN, M.; KUMAR, S.; RASTOGI, N., LAL, P.; GHOSHAL, U.C.; TIWARI, A.; PANT, M.C.; BAIQ, M.Q.; MITTAL, B. GSTT1, GSTM1 and GSTP1 genetic polymorphisms and interaction with tobacco, alcohol and occupational exposure in esophageal cancer patients from North India. **Cancer Letters**, v.242, n.1, p.60–67, 2006.

JONES, D.P. Redefining oxidative stress: forum review. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.8, n.9/10, p.1865-1879, 2006.

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

KARUNASINGLE, N.; HAN, D.Y.; ZHU, S.; YU, J.; LANGE, K.; DUAN, H.; MEDHORA, R.; SINGH, N.; KAN, J.; ALZAHER, W.; CHEN, B.; KO, S.; TRIGGS, C.M.; FERGUSON, L.R. 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, n.2, p.179-190, 2012.

KLAUTAU-GUIMARÃES, M.N.; D'ASCENÇÃO, R.; CALDART, F.A.; GRISOLIA, C.K.; SOUZA, J.R.; BARBOSA, A.C.; CORDEIRO, C.M.T.; FERRARI, I. Analysis of genetic susceptibility to mercury contamination evaluated through molecular biomarkers in at-risk Amazon Amerindian populations. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n.4, p.827-832, 2005.

KO, W.S.; GUO, C.H.; YEAH, 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.

KÖHRLE, J.; FLOHÉ, B.R.; BOCK, A.; GARTNER, R.; MEYER, O.; FLOHÉ, L. Selenium in biology: facts and medical perspectives. **Biological Chemistry**, v.381, n.9/10, p.849-864, 2000.

KRISHNAN, S.; RANI, P. Evaluation of selenium, redox status and their association with plasma amyloid/tau in Alzheimer's disease. **Biological Trace Element Research**, v.158, n.2, p.158–165, 2014.

KUZUYA, M.; ANDO, F.; IGUCHI, A.; SHIMOKATA, H. Glutathione peroxidase 1 Pro198Leu variant contributes to the metabolic syndrome in men in a large Japanese cohort. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.87, n.6, p.1939–1944, 2008.

LACERDA, L.D. Distribuição e comportamento do mercúrio no ambiente Amazônico. In: HACON, S.; LACERDA, L.D.; PFEIFFER, W.C.; CARVALHO, D.; orgs. **Riscos e consequências do uso do mercúrio**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde: FINEP: IBAMA: CNPQ, 1990. p.80-90. [Seminário Nacional “Riscos e Consequências do Uso do Mercúrio” de 12 a 15 de setembro de 1989, Brasília - DF].

LÄRSTAD, M.; LJUNGKVIST, G.; OLIN, A.C.; TORÉN, K. Determination of malondialdehyde in breath condensate by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.766, n.1, p.107-114, 2002.

LEE, B.E.; HONG, Y.C.; PARK, H.; HA, M.; KOO, B.S.; CHANG, N.; ROH, Y.M.; KIM, B.N.; KIM, Y.J.; KIM, B.M.; JO, S.J. HA, E.H. Interaction between GSTM1/GSTT1 polymorphism and blood mercury on birth weight. **Environmental Health Perspectives**, v.118, n.3, p.437-443, 2010.

LEI, X.G.; CHENG, W.; McCLUNG, J.P. Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. **Annual Review of Nutrition**, v.27, p.41-61, 2007.

LEMIRE, M.; FILLION, M.; FRENETTE, B.T.; PASSOS, C.J.S.; GUIMARÃES, J.R.D.; BARBOSA Jr., F.; MERGLER, D. Selenium from dietary sources and motor functions in the Brazilian Amazon. **Neurotoxicology**, v.32, n.6, p.944-953, 2011.

LEMIRE, M.; FILLION, M.; FRENETTE, B.T.; MAYER, A.; PHILIBERT, A.; PASSOS, C.J.S. GUIMARÃES, J.R.; BARBOSA, F.J.; MERGLER, D. Selenium and mercury in the Brazilian Amazon: opposing influences on age-related cataracts. **Environmental Health Perspectives**, v.118, n.11, p.1584-1589, 2010.

LEMIRE, M.; MERGLER, D.; FILLION, M.; PASSOS, C.J.S.; GUIMARÃES, J.R.D.; DAVIDSON, R.; LUCOTTE, M. Elevated blood selenium levels in the Brazilian Amazon. **Science of the Total Environment**, v.366, n.1, p.101-111, 2006.

LEMIRE, M.; MERGLER, D.; HUEL, G.; PASSOS, C.J.S.; FILLION, M.; PHILIBERT, A.; GUIMARÃES, J.R.; RHEAULT, I.; BORDUAS, J.; NORMAND, G. Biomarkers of selenium status in the Amazonian context: blood, urine and sequential hair segments. **Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology**, v.19, n.2, p.213-222, 2009.

LETAVAYOVÁ, L.; VLCKOVÁ, V.; BROZMANOVÁ, J. Selenium: from cancer prevention to DNA damage. **Toxicology**, v.227, n.1/2, p.1-14, 2006.

LINDBERG, A.; BJORNBERG, K.A.; VAHTER, M.; BERGLUNG, M. Exposure to methylmercury in non-fish eating people in Sweden. **Environmental Research**, v.96, n.1, p.28-33, 2004.

LIVAK, K.J.; FLOOD, S.J.A.; MARMARO, J.; GIUSTI, W.; DEETZ, K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. **PCR Methods and Applications**, v.4, n.6, p.357-362, 1995.

MAIA, C.S.C. **O selênio e a glândula tireóide**: um estudo em pacientes portadores de disfunções tireoidianas nos estados do Ceará e São Paulo. São Paulo, 2008. 117p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

MANNERVICK, B. The isoenzymes of glutathione transferase. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v.57, p.357-417, 1985.

MARQUES, R.C. **Avaliação da exposição ao mercúrio e seus compostos sobre o desenvolvimento neuropsicomotor em crianças de Porto Velho-RO**. Belém, 2002. 102p. Dissertação de Mestrado - Núcleo de Medicina Tropical - Universidade Federal do Pará.

MARQUES, R.C.; DÓREA, J.G.; BASTOS, W.R.; REBELO, M.F.; FONSECA, M.F.; MALM, O. Maternal mercury exposure and neuro-motor development in breastfed infants from Porto Velho (Amazon), Brazil. **Int. J. Hyg. Environ. Health**, v.210, p.51-60, 2007. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, 2013.

MARQUES, R.C.; BERNARDI, J.V.E.; DOREA, J.G.; BRANDÃO, K.G.; BUENO, L.; LEÃO, R.S.; MALM, O. Fish consumption during pregnancy, mercury transfer, and birth weight along Madeira River basin in Amazonia. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.10, n.6, p.2150-2163, 2013.

MARTENS, A.V.S.; COZZOLINO, S.M.F. Mapeamento da distribuição de selênio em território brasileiro por meio da análise de alimentos nativos: feijão (*fascolos vulgaris L.*) e carne bovina para o consumo humano e águas e solo oriundos. São Paulo: FAPESP, 2002. Processo n.00/11578-3. [Relatório Científico].

MARTENS, I.B.G.; MARTENS, A.; COZZOLINO, S.M.F. Selênio. In: COZZOLINO, S.M.F., org. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 4.ed. Barueri: Manole, 2012. p.721-765.

MEECH, J.A.; VEIGA, M.M.; THOMASNS, D. Emissions and stability of mercury in the Amazon. **Canadian Metallurgical Quarterly**, v.36, n.4, p.231-239, 1997.

MIRETZKY, P.; BISINOTI, M.C.; JARDIM, W.F. Sorption of mercury (II) in Amazon soils from column studies. **Chemosphere**, v.60, n.11, p.1583-1589, 2005.

MORADI, M.; EFYEKHARI, M.H.; TALEI, A.; FARD, A.R.A. Comparative study of selenium concentration and glutathione peroxidase activity in normal and breast cancer. **Public Health Nutrition**, v.12, n.1, p.59-63, 2009.

MORAIS, L.M.T.S.; CARDOSO FILHO, C.; LOURENÇO, G.J.; SHINZATO, J.Y.; ZEFERINO, L.C.; LIMA, C.S.P.; GURGEL, M.S.C. Características mamográficas do câncer de mama associadas aos polimorfismos GSTM1 e GSTT1. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.54, n.1, p.61-66, 2008.

MUCCI, A.; MONTGOMERY, S.; LUCOTTE, M.; PLOURDE, Y.; PICHET, P.; VANTRA, H. Mercury remobilization from flooded soils in a hydroelectric reservoir of Northern Quebec, La Grande-2: results of a soil resuspension experiment. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.52, n.11, p.2507-2517, 1995.

NAGANUMA, A.; ANDERSON, M.E.; MEISTER, A. Cellular glutathione as a determinant sensitivity to mercury chloride: prevention of toxicity by giving glutathione monoester. **Biochemical Pharmacology** v.40, n.4, p.693-697, 1990.

NAVARRO-ALARCON, M.; CABRERA-VIQUE, C. Selenium in food and the human body: a review. **Science of the Total Environment**, v.400, n.1/3, p.115-141, 2008.

NAVARRO-ALARCON, M.; LÓPEZ-MARTINEZ, M.C. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. **Science of the Total Environment**, v.249, n.1/3, p.347-371, 2000.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requeriments of dairy cattle**. 7.ed. Washington: National Academy Press, 2001.381p.

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

OLUSI, S.O. Obesity is independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v.26, n.9, p.1159–1164, 2002.

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

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

PAGLIA, D.E.; VALENTINE, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **Journal of laboratory and clinical medicine**, v.70, n.1, p.158-169, 1967.

PAPP, L.V.; LU, J.; HOLMGREN, A.; KHANNA, K.K. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity and their role in human health. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.9, n.7, p.776-796, 2007.

PARADIS, S.; WHEATLEY, B.; BOSWELL-PURDY, J.; BÉLISLE, D.; COLE, M.; LICKERS, H.; HAYTON, A.; DAVIES, K. Mercury contamination through fish consumption: a model for predicting and preventing hazardous behavior on a community level. **Mercury as a Global Pollutant: Human Health Issues**, v.97, p.147-158, 1997.

PARK, S.K.; KANG, D.; NOH, D.Y.; LEE, K.M.; KIM, S.U.; CHOI, J.Y.; CHOI, I.M.; AHN, S.H.; CHOE, K.J.; HIRVONEN, A.; STRICKLAND, P.T.; YOO, K.Y. Reproductive factors, glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphism and breast cancer risk. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.78, n.1, p.89-96, 2003.

PASSOS, C.J.; MERGLER, D.; GASPAR, E.; MORAIS, S.; LUCOTT, M.; LARRIBE, F.; DAVIDSON, R.; GROSOBOIS, S. Eating tropical fruit reduces mercury exposure from fish consumption in the Brazilian Amazon. **Environmental Research**, v.93, n.2, p.123-130, 2003.

PASSOS, C.J.; MERGLER, D.; LEMIRE, M.; FILLION, M.; GUIMARÃES, J.R. Fish consumption and bioindicators of inorganic mercury exposure. **Science of the Total Environment**, v.373, n.1, p.68–76, 2007.

PASCALICCHIO, A.A.E. **Contaminação por metais pesados: saúde pública e medicina ortomolecular**. São Paulo. Annablume, 2002. 132p.

PEROTTONI, J.; LOBATO, L.P.; SILVEIRA, A.; ROCHA, J.B.T.; EMANUELLI, T. Effects of mercury and selenite on D-aminolevulinate dehydratase activity and on selected oxidative stress parameters in rats. **Environmental Research**, v.95, n.2, p.166-173, 2004.

PINHEIRO, M.C.N.; GUIMARÃES, G.A.; NAKANISHI, J.; OIKAWA, T.; VIEIRA, J.L.; QUARESMA, M.; CARDOSO, B.; AMORAS, W. Avaliação da contaminação mercurial mediante análise do teor de Hg total em amostras de cabelo em comunidades ribeirinhas do Tapajós, Pará, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, n.2, p.181-194, 2000.

PINHEIRO, M.C.N.; MACCHI, B.M.; VIEIRA, J.L.F.; OIKAWA, T.; AMORAS, W.W.; GUIMARÃES, G.A.; COSTA, C.A.; CRESPO-LÓPEZ, M.E.; HERCULANO, A.M.; SILVEIRA, L.C.; NASCIMENTO, J.L. Mercury exposure and antioxidant defenses in women: a comparative study in the Amazon. **Environmental Research**, v.107, n.1, p.53–59, 2008.

PINHEIRO, M.C.N.; MULLER, R.C.S.; SARKIS, J.E.; VIEIRA, J.L.F.; OIKAWA, T.; GOMES, M.S.V.; GUIMARÃES, G.A.; NASCIMENTO, J.L.M.; SILVEIRA, L.C.L. Mercury and selenium concentrations in hair samples of women in fertile age from Amazon riverside communities. **Science of the Total Environment**, v.349, n.1/3, p.284-288, 2005.

PINHEIRO, D.S.; ROCHA FILHO, C.R.; MUNDIM, C.A.; MARCO Jr., P.; ULHOA, C.J.; REIS, A.A.S.; GHEDINI, P.C. Evaluation of glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 deletion polymorphisms on type-2 diabetes mellitus risk. **PLoS One**, v.8, n.10, art.e76262, p.1-5, 2013.

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 e pacientes com diabetes mellitus tipo 1**. São Paulo, 2012. 130p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

POSSUELO, L.G.; PERAÇA, C.F.; EISENHARDT, M.F.; DOLTO, M.L.; CAPPELLETTI, L.; FOLETTO, E.; VALIM, A.R.M. Polymorphisms of GSTM1 and GSTT1 genes in breast cancer susceptibility: a case-control study. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.35, n.12, p.569-574, 2013.

PRIOR, R.L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIACA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, B. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.11, p.3273-3279, 2003.

RAVN-HAREN, G.; OLSEN, A.; TJONNELAND, A.; DRAGSTED, L.O.; NEXO, B.A.; WALLIN, H.; OVERVAD, K.; RASCHOU-NIELSEN, O.; VOGEL, U. Associations between GPx 1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPx activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study. **Carcinogenesis**, v.27, n.4, p.820-825, 2006.

RAYMAN, M.P. The importance of selenium to human health. **Lancet**, v.356, n.9225, p.233-241, 2000.

RAYMOND, L.J.; RALSTON, N.V.C. Mercury: selenium interactions and health implications. **Seychelles Medical and Dental Journal**, v.7, n.1, sp.iss., p.72-77, 2004.

REILLY, C. **Selenium in food and health**. London: Blackie Academic and Professional, 1996. 338p.

REZAEI, Z.; JAMSHIDZADEH, A.; SANATI, E. A rapid and sensitive method for the determination of malondialdehyde as its hydralazine derivative in human plasma using high performance liquid chromatography. **Analytical Methods**, v.5, n.12, p.2995-2999, 2013.

RICHIE, Jr., J.P.; MUSCAT, J.E.; ELLISION, I.; CALCAGNOTTO, A.; KLEINMAN, W.; EL-BAYOUMY, K. Association of selenium status and blood glutathione concentrations in blacks and whites. **Nutrition and Cancer**, v.63, n.3, p.367–375, 2011.

RIDNOUR, L.A.; ISENBERG, J.S.; ESPEY, M.G.; THOMAS, D.D.; ROBERTS, D.D. Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102, n.37, p.13147-13152, 2005.

ROCHA, A.V. **Estado nutricional relativo ao selênio de crianças residentes em duas localidades de Rondônia, Amazônia Ocidental**. São Paulo, 2009. 109p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

ROCHA, A.V.; CARDOSO, B.R.; COMINETTI, C.; BUENO, R.B.; BORTOLI, M.C.; FARIAS, L.A.; FAVARO, D.I.T.; CAMARGO, L.M.A.; COZZOLINO, S.M.F. Selenium status and hair mercury levels in riverine children from Rondônia, Amazonia. **Nutrition**, v.30, n.11-12, p.1318-1323, 2014.

SÁ, A.L.; HERCULANO, A.M.; PINHEIRO, M.C.; SILVEIRAS, L.C.L.; NASCIMENTO, J.L.M.; CRESPO-LÓPEZ, M.E. Exposição humana ao mercúrio na região oeste do Estado do Pará. **Revista Paraense de Medicina**, v.20, n.1, p.19-25, 2006.

SAMPAIO, D.S.; LUCOTTE, M.; ROULET, H.P.; MERGLER, D.; CROSSA, M. Mercúrio nos peixes do Rio Tapajós, Amazônia brasileira. **InterfacEHS**, v.1, n.1, art 6, p.1-31, 2006. Disponível em: http://www.unites.uqam.ca/gmf/caruso/doc/caruso/sampaio/sampaio_et_al_2006.pdf. Acesso em: 24 Dez. 2014

SANTOS, K.M.O.; AQUINO, R.C. Grupo dos óleos e gorduras. In: PHILIPPI, S.T. **Pirâmide dos alimentos: fundamentos básicos da nutrição**. 2.ed. Barueri: Manole, 2014. p.251-303.

SANTOS, L.B. **Polimorfismo Pro198Leu no gene que codifica para glutathione peroxidase 1 e sua relação com o estado nutricional relativo ao selênio de uma população adulta residente no município de Fortaleza, Ceará**. 2013.93f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

SAVASKAN, N.E.; UFER, C.; KUHN, H.; BORCHERT, A. Molecular biology of glutathione peroxidase 4: from genomic structure to developmental expression and neural function. **Biological Chemistry**, v.388, n.10, p.1007–1017, 2007.

SCHMIDT, M.I.; DUNCAN, B.B.; SILVA, G.A.; MENEZES, A.M.; MONTEIRO, C.A.; BARRETO, S.M.; CHOR, D.; MENEZES, P.R. Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: carga e desafios atuais. 2011 (Saúde no Brasil, 4). Disponível em: <http://download.thelancet.com/flatcontentassets/pdfs/brazil/brazilpor4.pdf>. Acesso em: 10 Jan. 2015.

SCHORK, N.J.; FALLIN, D.; LANCHBURY, J. Single Nucleotide Polymorphisms and the future of genetic epidemiology. **Clinical Genetics**, v.58, n.4, p.250-264, 2000.

SILVA, J.J.R.F.; WILLIAMS, R.J.P. **The biological chemistry of the elements: the inorganic chemistry of life**. Oxford: Oxford University Press; New York: Clarendon Press, 1993. 561p.

SITTA, A.; VANZIN, C.S.; BIANCINI, G.B.; MANFREDINI, V.; OLIVEIRA, A.B.; WAYHS, C.A.; RIBAS, G.O.; GIUGLIANI, L.; SCHWARTZ, I.V.; BOHRER, D.; GARCIA, S.C.; WAJNER, M.; VARGAS, C.R. Evidence that L-carnitine and selenium supplementation reduces oxidative stress in phenylketonuric patients. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v.31, n.3, p.429–436, 2011.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5.ed. São Paulo, Bookman, 2002. 836p.

SMOLKOVÁ, B.; DUSINSKÁ, M.; RASLOVÁ, K.; BARANCOKOVÁ, M.; KAZIMÍROVÁ, A.; HORSKÁ, A.; SPUSTOVÁ, V.; COLLINS, A. Folate levels determine effect of antioxidant supplementation on micronuclei in subjects with cardiovascular risk. **Mutagenesis**, v.19, n.6, p.469–476, 2004.

SOUZA, J.R.; BARBOSA, A.C. Contaminação por Hg e o caso da Amazônia. **Química Nova na Escola**, n.12, p.23-25, 2000.

SOUZA, M.L; MENEZES, H.C. Processamentos de amêndoa e torta de castanha-do-Brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. **Ciência, Tecnologia e Alimentos**, v.24, n.1, p.120-128, 2004.

STEUERWALD, U.; WEIHE, P.; JORGENSEN, P.J.; BJERVE, K.; BROCK, J.; HEINZOW, B.; BUDTZ-JORGENSEN, E.; GRANDJEAN, P. Maternal seafood diet, methylmercury exposure, and neonatal neurologic function. **Journal of Pediatrics**, v.136, n.5, p.599-605, 2000.

STOCKLER-PINTO, M.B.; FARAGE, N.E.; BOAVENTURA, G.T.; COZZOLINO, S.M. Effect of Brazil nut supplementation on the blood levels of selenium and glutathione peroxidase in hemodialysis patients. **Nutrition**, v.26, n.11/12, p.1065–1069, 2010.

SLATER, B.; MARCHIONI, D.L.; FISBERG, R.M. Estimando a prevalência da ingestão inadequada de Nutrientes. **Rev Saúde Pública**, v.33, n.4, p.599-605, 2004.

SUZEN, H.S.; GUCYENER, E.; SAKALLI, O.; UCKUN, Z.; KOSE, G.; USTEL, D.; DUYDU, Y. CAT C-262T and GPx 1 Pro198Leu polymorphisms in a Turkish population. **Molecular Biology Reports**, v.37, n.1, p.87-92, 2010.

TAKEUCKI, T.; ETO, K. **The pathology of Minamata disease: a tragic story of water pollution**. Kyushu: Kyushu University Press, 1999. 310p.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D.M.; TEW, K.D. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.57, n.3/4, p.134–144, 2003.

TINKOV, A.A.; SKALNAYA, M.G.; DEMIDOV, V.A.; SEREBRYANSKY, E.P.; NIKONOROV, A.A.; SKALNY, A.V. Hair mercury association with selenium, serum lipid

spectrum, and gama-glutamyl transferase activity in adults. **Biological Trace Element Research**, v.161, n.3, p.255-262, 2014.

UNITED NATIONS. Enviroment Programme. Chemicals. Impacts of mercury on the environment. In: _____. **Global mercury assessment**. Geneva: UNEP, 2002. cap.5, p.73-86.

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Public Heath Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological Profile for Mercury**. Atlanta: ATSDR, 1999. 676p.

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

VIVANCO, R.H.C.; MENGE, F.G.W.; BARRIGA, P.A.C. Variaciones de la fragilidad osmótica eritrocitaria en bovinos a pastoreo sobre praderas con bajo contenido de selenio y suplementados o no con selênio. **Revista Científica**, v.XVI, n.3, p.227-231, 2006.

WIDERSTEN, M.; PEARSON, W.R.; ENGSTROEM, A.; MANNERVIK, B. Heterologous expression of the allelic variant μ -class glutathione transferases μ and ψ . **Biochemical Journal**, v.276, n.2, p.519-524.1991.

WILLETT, W.C. Inssues 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, 30).

WILLET, W.C.;HOWE, G.R.; KUSHI, L.H. Adjustment for total energy in epidemiologic studies. **Am J Clin Nutr**, v.65, p.1220-28, 1997.

WILLET, W.; STAMPFER, M. Implications of total energy intake for epidemiologic analyses. In Willet, W.C. **Nutrition epidemiology**, 2 ed, New York: Oxford University Press, p.514, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity**: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation on obesity. Geneva: World Health Organization, 2000. p.256. (WHO Obesity Technical Report Series, n.284).

XU, S.; WANG, Y.; ROE, B.; PEARSON, W.R. Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and GSTM1 deletion. **Journal of Biological Chemistry**, v.273, n.6, p.3517-3527, 1998.

YANG, G.Q.; WANG, S.Z.; ZHAU, R.H.; SUN, S.Z. Endemic selenium intoxication of humans in China. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.37, n.5, p.872-881, 1983.

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, n.3, p.415-420, 2001.

ZHANG, F.A.; YU, W.; HARGROVE, J.L.; GREENSPAN, P.A.; DEAN, R.G.; TAYLOR, E.W.; HARTLE, D.K. Inhibition of TNF- induced ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression by selenium. **Atherosclerosis**, v.161, n.2, p.381-386, 2002.

ZHANG, M.; MA, A.G.; ZHANG, X.Z.; GE, S.; SHI, X.X., Effect of multiple micronutrients supplementation on anti-oxidative activity and oxidized DNA damage of lymphocytes in children. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**, v.26, n.4, p.268–272, 2005.

ZHENG, W.; WEN, W.Q.; GUSTAFSON, D.R.; GROSS, M.; CERHAN, J.R.; FOLSOM, A.R. GSTM1 and GSTT1 polymorfism and postmenopausal breast cancer risk breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.74, n.1, p.9-16, 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE 1. Cartaz de divulgação da pesquisa.

APÊNDICE 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

APÊNDICE 3. Ficha de Identificação e Controle:

(Anamnese: peso, estatura, IMC, coleta de sangue e cabelos).

APÊNDICE 4. Caderno de Registro do Consumo Alimentar.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – FCF/USP

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

1. Informações do Sujeito da Pesquisa

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

2. Informações do Responsável Legal

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

Título do Projeto de Pesquisa: Estado nutricional relativo ao selênio, concentrações de mercúrio, estresse oxidativo e os polimorfismos Pro198Leu no gene da glutathione peroxidase 1 (GPx1) e GSTM1 no gene da glutathione S- transferase (GST) em mulheres residentes em área de risco de contaminação por mercúrio.

3. Duração da Pesquisa: 24 meses

4. Nome do pesquisador responsável: Silvia Maria Franciscato Cozzolino

Cargo/ Função: Professora Titular do Programa de pós-graduação em Ciência dos Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas FCF/USP.	Nº do Registro do Conselho Regional: CRN3/0621
Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, USP.	

Sra.voluntária, essa pesquisa tem como título: Estado nutricional relativo ao selênio e concentrações de mercúrio e a relação com estresse oxidativo e os polimorfismos Pro198Leu e GSTM1 em mulheres na idade fértil em área exposta à contaminação por mercúrio. A responsável por esse estudo é a professora titular Silvia Maria Franciscato Cozzolino e como

colaborada a estudante de doutorado Ariana Vieira Rocha. Ambas pertencem a Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade de São Paulo (USP).

De acordo com algumas pesquisas, as mulheres da Amazônia apresentam concentrações elevadas de mercúrio e essa contaminação pode comprometer a saúde não só delas como também das crianças, pois uma das formas do mercúrio atravessa facilmente a barreira placentária, e o mercúrio acaba se concentrando no cérebro das crianças. Isso pode inibir o desenvolvimento cerebral. Por isso, é preocupante a exposição das mulheres na idade fértil ao mercúrio. Acredita-se que o mineral selênio, possa ser um possível colaborador para a população não apresentar sinais clínicos evidentes da contaminação por mercúrio. Isso pode ser devido a algumas atribuições do selênio, pois este mineral tem como uma das suas ações atuar como antioxidante e isso pode neutralizar os danos causados pela contaminação do mercúrio.

Desta forma, estamos por meio desse documento lhe convidando a participar desse estudo que tem como objetivo principal, avaliar o estado nutricional relativo ao selênio, assim como, as concentrações de mercúrio e a relação desses com o estresse gerado nas células e também com algumas alterações genéticas em mulheres na idade fértil em área exposta ao mercúrio. Nesta pesquisa participará 200 mulheres voluntárias da cidade de Porto Velho, Rondônia.

Se você concordar em participar, passará pelos seguintes procedimentos: avaliação nutricional onde serão obtidos os dados de: peso, estatura e circunferência da cintura, e também serão anotados os seus dados sobre o consumo alimentar, ou seja, tudo o que foi consumido no período de 3 dias, sendo 2 dia da semana e 1 dia do fim de semana. Será realizada ainda uma coleta de sangue de (20mL) em jejum de 10 a 12 horas para a realização da determinação da concentração do mineral selênio e avaliar o estresse gerado nas células e, se há uma alteração genética que possa interferir na concentração de selênio ou mercúrio no organismo. Por fim, será coletado em torno de (1g) de cabelo na região detrás do pescoço para avaliar as concentrações de mercúrio. A pesquisa possui um risco mínimo em virtude da coleta de sangue que pode causar um desconforto, porém, este será coletado por um profissional de enfermagem capacitado. A obtenção desses dados será realizada no Laboratório Alphaclin, localizado na Avenida Calama, 2215. Bairro São João Bosco. Após essas coletas, será distribuído um kit lanche contendo: bolacha de água e sal ou biscoito integral, uma fruta, e um suco de fruta de caixinha de 200mL. O seu sangue será armazenado no laboratório de nutrição-minerais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP), sob a responsabilidade da professora titular Silvia Maria Franciscato Cozzolino para pesquisas futuras. Porém, se isso acontecer você será consultado a respeito, e um novo projeto será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa.

Você autoriza o armazenamento do seu sangue para pesquisas futuras?

()sim ()não.

Os resultados obtidos serão arquivados e mantidos em sigilo, conforme ética. É direito de cada participante obter os resultados das análises que serão feitas, bem como informações sobre o andamento da pesquisa, procedimentos utilizados, riscos e benefícios relacionados em qualquer fase do estudo, a fim de esclarecer eventuais dúvidas. Deve ser ressaltado que a participação na pesquisa poderá ser desfeita em qualquer momento que o Sra achar conveniente, sem sofrer nenhum tipo de constrangimento. Não haverá nenhuma despesa financeira para a não participação neste estudo, assim como, não haverá recompensa financeira relacionada à participação na pesquisa.

Esse estudo trará benefícios, pois existem evidências que o selênio pode exercer um efeito protetor no organismo contra os malefícios do mercúrio. Logo, os resultados contribuirão para uma melhor qualidade de vida através do conhecimento da avaliação do

estado nutricional. Além do que, será realizada uma avaliação nutricional completa por uma nutricionista e serão oferecidas orientações quanto à alimentação.

– INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Silvia Maria Franciscato Cozzolino – (Professora Titular do programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/FCF (USP). Telefone:(11)3091-3625. Endereço da Faculdade: Cidade Universitária, Av. Lineu Prestes, 580 – Bloco 14.

Telefone: (11) 3091 -3625 (Laboratório de Nutrição – Minerais).

Ariana Vieira Rocha - (Doutoranda do programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/FCF (USP). Endereço Residencial: Bairro: Liberdade, Rua da Glória - 654, Apto 84. CEP 01510-000 – São Paulo – SP. Telefone: (11) 98532-2125.

Endereço da Faculdade: Cidade Universitária, Av. Lineu Prestes, 580 – Bloco 14

Telefone: 3091 -3625 (Laboratório de Nutrição – Minerais).

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.

Porto Velho,.....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
Avaliação Nutricional
Antropometria

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

DADOS ANTROPOMÉTRICOS

Idade: anos

Circunferência da Cintura (CC): Classificação:

Peso: kg

Estatura: cm

IMC: Classificação:

Classificação do estado nutricional para adultos, segundo o Índice de Massa Corpórea (IMC).

Classificação	IMC (kg/m²)	Risco de Comorbidades
Baixo Peso	$\leq 18,5$	Baixo
Peso Normal ou Eutrofia	18,5 - 24,9	Médio
Sobrepeso	$\geq 25 - 29,9$	Aumentado
Obesidade I	30,0 - 34,9	Moderado
Obesidade II	35,0 - 39,9	Grave
Obesidade III	≥ 40	Muito Grave

Fonte: WHO (2000).

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
 Pesquisador: **Ariana Vieira Rocha**
 Laboratório de Nutrição e Minerais: (11) 3091-3625

Formulário Mercúrio (Hg)

Identificação		Data:/...../.....
Nome:		
Idade:	Sexo:	Raça:
Endereço:		
Há quanto tempo reside em Porto Velho:		
Onde residia anteriormente:		
Ocupação principal:	Quanto tempo: h/dia	
Hábitos:		
Come peixe?:	☐ sim	☐ não
Procedência do peixe consumido, Nome do Rio:		
Espécie mais consumida:		
Frequência de consumo de peixe:	Quantidade:	
Frequência de consumo de frutos do mar:	Quantidade:	
Ficou doente nos últimos seis meses:	☐ sim ☐ não	
Tomou algum medicamento: ☐ sim ☐ não	Qual:	Frequência:
No tratamento do cabelo você usa:		
☐ só sabonete ☐ xampú ☐ condicionador ☐ tintura ☐ líquido para permanente/ alisamento ☐ outros. Quais?.....		
Qual a água que usa para tomar banho:		
☐ caerd ☐ poço ou mina ☐ outra procedência, qual?.....		
Qual a água que usa para beber:		
☐ caerd e filtrada ☐ não filtra ☐ de poço ou mina ☐ galão ☐ outra procedência, qual?.....		

ACOMPANHAMENTO NUTRICIONAL

Nome:

Responsável: Nutricionista Ariana Vieira Rocha
Universidade de São Paulo-USP.
Telefone: (69) 8118-4633 (11) 8532-2125

INFORMAÇÕES

Pesquisas tentam explicar a presença do Hg na região amazônica, pois os solos, ambientes aquáticos e consequentemente os peixes, apresentarem concentrações elevadas deste metal, assim como, alguns indivíduos que vivem nestas áreas, porém, estes não apresentam sintomas e sinais clínicos evidentes de contaminação. Supõe-se que o selênio, um mineral antioxidante presente naturalmente no solo da região, seja um protetor para a aparente tolerância destas populações à intoxicação crônica por Hg. Dentre outras funções e ações, o selênio atua no fortalecimento do sistema imunológico e também ajuda organismo a se proteger dos danos causados pelos metais tóxicos, como por exemplo, o Hg. Dessa forma, a ingestão adequada de selênio pode ter um efeito protetor contra a contaminação por Hg.

Este caderno tem como objetivo avaliar o estado nutricional relativo ao mineral selênio. Por isso é muito importante que todas as recomendações e orientações prestadas durante o acompanhamento nutricional sejam atendidas.

Ariana Vieira Rocha
Doutoranda em Ciência dos Alimentos-FCF/USP

Porto Velho, 2012.

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

1. Nome:

Documento de Identidade nº

Sexo: (X) Feminino

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

Naturalidade: Escolaridade:

Endereço: nº

Bairro:

Cidade:

Cep: Telefone: Celular:

Renda Familiar: () 1 S.M. () 2 a 3 S.M. () Acima de 4 S.M.

2. História Clínica

Faz uso de anticoncepcional ? () não () sim

Se sim, qual? Quanto tempo?

Antecedentes familiares: () Dislipidemias () Diabetes mellitus

() Hipertensão arterial () Obesidade

Outras, qual?

Faz atividade Física? () não () sim , qual?

Quantas vezes por semana ?

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 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 (fotos ilustrativas nas próximas páginas); Exemplo:

⇒ 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 ou 200 mL;

⇒ xícara de chá ou café;

⇒ prato de mesa, prato de sopa, prato de sobremesa ou pires.

5. Descrever com maior detalhe os tipos de alimentos ou marcas, como por exemplo:

⇒ leite desnatado, integral, tipo C, em pó;

⇒ pão francês, integral, de forma, de leite, de batata, de mel, doce ou caseiro;

⇒ bolachas recheadas, água e sal, chocolate sem recheio, **SEMPRE** colocar o sabor e a marca;

⇒ frutas (anotar tipo e tamanho), por exemplo: laranja lima média; mamão papaya (meia unidade);

⇒ vegetais folhosos (anotar tipo e preparação), por exemplo: acelga refogada ou crua;

⇒ manteiga ou margarina (o tipo, a marca, a quantidade consumida anotada em ponta de faca ou em colheres de chá, café, sobremesa ou sopa);

⇒ salada de frutas (colocar 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 escrever 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; peixe (pedaço pequeno, médio ou grande);
8. Anotar as 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).

MEDIDAS CASEIRAS

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

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

Margarina ou Manteiga

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

REGISTRO DE ALIMENTOS

Dia 1

Data:/...../..... Dia da semana:

Horário e Local	Alimentos ou Preparações	Quantidade (medida caseira)	Marca Comercial

REGISTRO DE ALIMENTOS

Dia 2

Data:/...../..... Dia da semana:

Horário e Local	Alimentos ou Preparações	Quantidade (medida caseira)	Marca Comercial

REGISTRO DE ALIMENTOS

Dia 3

Data:/...../..... Dia da semana:

Horário e Local	Alimentos ou Preparações	Quantidade (medida caseira)	Marca Comercial

AGRADECEMOS A SUA COLABORAÇÃO!!

Mestre Ariana Vieira Rocha

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

Doutora Silvia Maria F. Cozzolino

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

ANEXOS

ANEXO 1. Informações para os membros de bancas julgadoras.

ANEXO 2. Parecer do Comitê de Ética (CEP)

ANEXO 3. Ficha de Aluno

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**FAÇULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**
Comitê de Ética em Pesquisa - CEPOfício CEP/FCF/55/12

São Paulo, 01 de agosto de 2012.

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Sílvia Maria Franciscato Cozzolino
FBA

Prezado(a) Senhor(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 31 de julho de 2012, **aprovou** as alterações do projeto "Estado nutricional relativo ao selênio, concentrações de mercúrio, estresse oxidativo e os polimorfismos Pro198leu e GSTM1 em mulheres residentes em área de risco de contaminação por mercúrio" (Protocolo CEP nº 574), que consiste na substituição do local da coleta do material biológico que será realizada no Laboratório Alphaclin, situado em Porto Velho – RO.

O CEP/FCF solicita, apenas, que a referida alteração seja corrigida no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Atenciosamente,

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

30/01/2015

Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

9132 - 5764926/3 - Ariana Vieira Rocha

Email: avr@usp.br
Data de Nascimento: 23/06/1984
Cédula de Identidade: RG - 000582453 - RO
Local de Nascimento: Estado de Rondônia
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em Nutrição - Faculdade São Lucas - Centro de Ensino São Lucas Ltda - Brasil - 2005
Mestrado: Mestre em Ciência dos Alimentos - Área: Nutrição Experimental - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2009

Curso: Doutorado
Programa: Ciência dos Alimentos
Área: Nutrição Experimental
Data de Matrícula: 03/11/2010
Início da Contagem de Prazo: 03/11/2010
Data Limite para o Depósito: 03/03/2015
Orientador: Prof(a). Dr(a). Silvia Maria Franciscato Cozzolino - 03/11/2010 até o presente.
E.Mail: smfcozzo@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 03/11/2010
Prorrogação: 120 dias
Período de 03/11/2014 a 03/03/2015
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 28/01/2013
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Ingressou no Doutorado em 03/11/2010
Prorrogação em 29/08/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013)

Última ocorrência: Prorrogação em 29/08/2014

30/01/2015

Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

9132 - 5764926/3 - Ariana Vieira Rocha

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
EDM5791-5/6	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	16/03/2011	30/06/2011	120	8	100	A	N	Concluída
HNT5757-3/3	Educação em Nutrição (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	12/04/2011	21/06/2011	60	4	100	A	N	Concluída
ICB5711-2/1	Redação de Trabalhos Científicos (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	31/10/2011	08/12/2011	45	3	100	A	N	Concluída
FBC5883-5/1	Avaliação da Toxicidade de Contaminantes em Amostras Ambientais	09/08/2012	19/09/2012	60	4	87,5	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Publicação do capítulo "Cromo", no livro "Bases bioquímicas e fisiológicas da nutrição: nas diferentes fases da vida, na saúde e na doença", p. 341-353, Brasil, 2013	01/01/2013	01/01/2013	-	1	0	-	-	-
Atividade do Programa	Publicação do capítulo "Vitamina E", no livro "Bases bioquímicas e fisiológicas da nutrição: nas diferentes fases da vida, na saúde e na doença", p. 440-448, Brasil, 2013	01/01/2013	01/01/2013	-	1	0	-	-	-
Atividade do Programa	Publicação do capítulo "Vitamina C", no livro "Bases bioquímicas e fisiológicas da nutrição: nas diferentes fases da vida, na saúde e na doença", p. 449-468, Brasil, 2013	01/01/2013	01/01/2013	-	1	0	-	-	-

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	22
Estágios:			
Total:	0	20	22

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

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

Última ocorrência: Prorrogação em 29/08/2014

Impresso em: 30/01/15 11:52:51