

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

**Efeitos da suplementação com castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*  
*H.B.K.*) sobre o estresse oxidativo em mulheres obesas e sua relação com o  
polimorfismo Pro198Leu no gene da glutathione peroxidase 1**

Cristiane Cominetti

Tese para obtenção do grau de  
DOUTOR

Orientador:  
Prof<sup>a</sup>. Tit. Silvia Maria Franciscato Cozzolino

São Paulo  
2010

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

**Efeitos da suplementação com castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*  
*H.B.K.*) sobre o estresse oxidativo em mulheres obesas e sua relação com o  
polimorfismo Pro198Leu no gene da glutathione peroxidase 1**

Cristiane Cominetti

Tese para obtenção do grau de  
DOUTOR

Orientador:  
Prof<sup>a</sup>. Tit. Silvia Maria Franciscato Cozzolino

São Paulo  
2010

Cristiane Cominetti

**Efeitos da suplementação com castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*  
*H.B.K.*) sobre o estresse oxidativo em mulheres obesas e sua relação com o  
polimorfismo Pro198Leu no gene da glutathiona peroxidase 1**

Comissão Julgadora  
da  
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof<sup>a</sup>. Dra. Silvia Maria Franciscato Cozzolino  
orientador/presidente

---

1<sup>o</sup>. examinador

---

2<sup>o</sup>. examinador

---

3<sup>o</sup>. examinador

---

4<sup>o</sup>. examinador

São Paulo, fevereiro de 2010.

## DEDICATÓRIA

*Ao pequeno João, luz e alegria de nossas vidas!*

## AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento inicial, desprovido de qualquer dúvida, é para minha orientadora, professora Silvia Cozzolino, que durante todos esses anos significou muito mais que apenas aquela pessoa que me orientou. Agradeço, em primeiro lugar, por ter acreditado e confiado em meus objetivos, o que para mim sempre significou muito. É também inevitável deixar aqui registrado que sou imensamente grata por todos os conselhos, apoio incondicional, preocupação e certamente pela oportunidade única de crescimento profissional. Nunca esquecerei o dia em que uma colega me disse: “*o sonho de todo aluno é ter um orientador que olhe para você com o brilho nos olhos que ela estava no final de sua apresentação*”. Este comentário, simples e sincero, demonstra a imensidão da minha gratidão, a qual é extremamente difícil de ser colocada em palavras. Acredito que dizer apenas “Muito Obrigada!” é pouco, porém é verdadeiro e de coração. Repito aqui o mesmo que escrevi na minha dissertação de Mestrado: *Silvia, minha eterna gratidão e admiração!*

Aos meus pais Pedro e Maria Ivone, exemplos de vida para mim. Obrigada por sempre me incentivarem, por toda a ajuda neste longo trajeto e pelo orgulho que sempre demonstraram.

À minha irmã Márcia, em quem sempre me espelhei; exemplo de pesquisadora e de mãe. Mesmo à distância foi uma das pessoas que mais me ajudou no desenvolvimento da metodologia deste trabalho. A frase que citei na lombada desta tese certamente se aplica a minha irmã. É preciso ter muita competência, teórica e prática, para fazer o que fez pelo meu trabalho. O que a seus olhos foi simples, para mim foi essencial. Muito obrigada por ser minha irmã e por me apoiar.

Ao meu querido Luciano Ogiboski, por ter estado todos esses anos ao meu lado, por seu orgulho e por todo o apoio.

Ao Nestor, o gato persa mais lindo deste mundo, que me devolveu a alegria num momento extremamente delicado e que tem sido minha razão de sorrir.

À minha querida amiga e colega Maritsa Carla de Bortoli, pela participação essencial neste trabalho, paciência, conselhos e ombro amigo ao longo de todos esses anos.

À minha amiga de longa data Maria Aderuza Horst, por existir e me aguentar. O mundo seria muito mais bonito se existissem mais pessoas como você!

A todas as participantes deste estudo, que muitas vezes não mediram esforços para oferecer sua ajuda. Cada uma delas tem um lugar em meu coração, pois souberam entender as dificuldades de se realizar uma pesquisa científica e mesmo assim, muitas vezes me agradeceram apenas pelo fato de ter com quem conversar. Afirmei e reafirmo que elas foram um dos grandes motivos para que eu não desistisse quando as maiores dificuldades surgiram.

Ao meu querido professor e amigo Eduardo Purgatto. Acredito que o sonho de todo aluno é encontrar um professor para ter como exemplo. Mesmo o conhecendo há algum tempo, quase ao fim de meu trabalho, pude constatar que este sonho pode ser atingido. Serei repetitiva, mas tenho certeza que também terei o aval de muitas outras pessoas. Como já disse a ele algumas vezes, no dia em que meus alunos sentirem um terço da admiração que tenho por ele, meus objetivos como pesquisadora e professora terão sido alcançados. Já o agradei tantas vezes pessoalmente que até perdi a conta, mas nunca cansarei de dizer: Muito Obrigada! Muito obrigada por ter me socorrido, literalmente. Quando já havia perdido as esperanças de que o trabalho pudesse dar certo, encontrei esse professor-anjo que não mediu esforços para me ajudar e, além disso, teve a delicadeza de me aconselhar, me ouvir, me dar estímulo para continuar e de entender minhas lágrimas. Muito obrigada pela oportunidade de ter trabalhado com você, de poder compartilhar este espírito de “ser professor”, tão raro e tão digno. Muito obrigada por sempre me fazer voltar a acreditar nos meus objetivos. Muito, muito obrigada!

Ao Dr. Arthur Garrido Jr., por mais uma vez ter confiado em nossos objetivos e nos apoiado.

Ao prof. Dr. Thomas Prates Ong, meu agradecimento sincero pela ideia inicial deste trabalho, por seu empenho no desenvolvimento do projeto, por seu entusiasmo e pela paciência infinita.

Ao prof. Tit. Fernando Salvador Moreno, pela colaboração neste trabalho e pela oportunidade de ter trabalhado em seu laboratório ao lado de tantas pessoas maravilhosas.

Aos colegas do laboratório de Dieta, Nutrição e Câncer: Alessandra Vieira, Bruna Kempfer Bassoli, Fábila Andrade, Juliana Ortega, Letícia Okamoto, Rodrigo Pierri, e *em especial* a Aline de Conti, Carlos Eduardo A. Chagas, Clarissa Scolastici, Mônica T. Cardozo e Renato Heidor, pela paciência infinita e boa vontade em me auxiliar com as metodologias do trabalho. A todos vocês, queridos colegas e amigos, que me “adotaram” em seu laboratório, meu mais sincero agradecimento e minha admiração.

Aos colegas do laboratório de Nutrição-Minerais: Ariana V. Rocha, Bárbara Cardoso, Carla Soraya C. Maia, Fernanda C. C. Guilherme, Graziela B. Silva, Janaína L. Donadio, Kaluce G. Almondes, Kátia Callou, Liliane V. Pires, Luciana Nishimura, Milena B. S. Pinto, Rafael B. Bueno e Suzana Bressan, por todos esses anos de convivência, pela troca de experiências e pela amizade. Em especial ao técnico e colega José Alexandre Pimentel, por toda sua dedicação e anseio em aprender e ser útil aos demais.

A Ana Mara Oliveira, pelo auxílio na metodologia para determinação de TBARS.

Ao professor Dr. Marcelo M. Rogero, pela participação na banca de qualificação e por sua contribuição indispensável para o enriquecimento deste trabalho.

Ao professor Assoc. Julio Orlando Tirapegui, por seus conselhos e cuidados durante o congresso no Chile.

A Isabel C. Bossi e ao Francisco C. Pereira do setor de finanças da FCF/USP, pela ajuda inestimável nas prestações de contas do auxílio FAPESP.

A Renata C. Albuquerque e a Maurício dos Santos do Departamento de Análises Clínicas da FCF/USP, pelas determinações do perfil lipídico das participantes do estudo.

A Agropecuária Aruanã, pela doação das castanhas-do-brasil utilizadas na pesquisa.

A todas as funcionárias da Clínica de Obesidade, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, por todo o suporte durante a coleta de dados, em especial a enfermeira Célia e a técnica de enfermagem Cláudia.

Aos secretários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental Mônica Dealis Perussi, Cleonice E. C. Gonçalves e Edilson Feitosa dos Santos, por todo o apoio durante este período.

As funcionárias Maria de Lourdes Pedroza e Joana de Almeida Santos, pela convivência e conversas de todos os dias.

A Capes, pela concessão de bolsa de estudos.

A FAPESP, pela concessão de auxílio pesquisa.

*“A teoria sempre acaba, mais cedo ou mais tarde, assassinada pela experiência”.*

*Albert Einstein (1879 – 1955)*



## RESUMO

COMINETTI, C. **Efeitos da suplementação com castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) sobre o estresse oxidativo em mulheres obesas e sua relação com o polimorfismo Pro198Leu no gene da glutathiona peroxidase 1.** 2010. 100f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Indivíduos obesos apresentam níveis elevados de estresse oxidativo quando comparados com controles de peso eutrófico. Isto pode ser atribuído a uma série de fatores, com destaque para a ingestão reduzida de substâncias antioxidantes. Outro aspecto a ser considerado é a presença de polimorfismos em genes que codificam para enzimas antioxidantes, como é o caso do Pro198Leu no gene da enzima glutathiona peroxidase 1 (GPx 1). Portanto, este trabalho teve como objetivos estudar as relações entre obesidade, marcadores de estresse oxidativo e o polimorfismo Pro198Leu no gene da GPx1, além de verificar as respostas destes parâmetros à ingestão de castanhas-do-brasil como fonte de selênio (Se). Participaram do estudo 37 mulheres em idade reprodutiva, que não apresentavam diabetes *mellitus*, doenças da tireóide; não ingeriam suplementos de minerais e vitaminas, medicamentos para redução de peso ou hipolipemiantes, e não eram tabagistas. Foram utilizados os seguintes marcadores bioquímicos: concentrações de Se plasmático, eritrocitário e nas unhas; atividade eritrocitária total da GPx; concentrações urinárias de 8-isoprostanos; concentrações plasmática de TBARS; avaliação de danos em DNA; perfil lipídico sérico; além da determinação dos genótipos relativos àquele polimorfismo. Cada unidade de castanha forneceu, em média, 290 µg do mineral. Na fase pré-suplementação, 100% das pacientes estavam deficientes em Se. As concentrações eritrocitárias ( $60,5 \pm 22,6$  x  $205,9 \pm 42,0$  µg/L;  $p=0.000$ ) e plasmáticas ( $55,7 \pm 13,3$  x  $132,5 \pm 34,9$  µg/L;  $p=0.000$ ) deste mineral aumentaram significativamente na fase pós-suplementação. O mesmo perfil foi observado para a atividade eritrocitária total de GPx ( $36,6 \pm 17,1$  x  $53,6 \pm 20,4$  U/gHb;  $p=0.000$ ) e para as concentrações plasmáticas de TBARS ( $5,0 \pm 3,7$  x  $7,6 \pm 3,3$  µmol/L;  $p=0.000$ ). As concentrações urinárias de 8-isoprostanos não apresentaram alterações significativas após a ingestão das castanhas ( $25,1 \pm 14,2$  x  $21,8 \pm 15,6$  ng/mmol creat.). E o mesmo ocorreu com os níveis de danos em DNA ( $77,3 \pm 21,6$  x  $72,2 \pm 28,1$  µm). Com relação

ao perfil lipídico sérico, não foram observadas mudanças significativas nas concentrações de colesterol total ( $171,0 \pm 28,8$  x  $175,5 \pm 26,6$  mg/dL), LDL-c ( $114,0 \pm 29,6$  x  $109,3 \pm 22,8$  mg/dL), VLDL-c ( $19,6 \pm 9,4$  x  $21,7 \pm 8,3$  mg/dL) e triacilgliceróis ( $110,3 \pm 87,9$  x  $108,6 \pm 41,5$  mg/dL). Entretanto, as concentrações de HDL-c apresentaram elevação significativa após o consumo das castanhas ( $37,6 \pm 13,6$  x  $44,5 \pm 13,4$  mg/dL;  $p < 0.00001$ ). Este aumento também promoveu uma redução significativa nos valores dos índices de Castelli I ( $5,0 \pm 1,8$  x  $4,2 \pm 1,1$ ;  $p < 0.0002$ ) e II ( $3,4 \pm 1,7$  x  $2,7 \pm 1,0$ ;  $p < 0.0004$ ), preditores do risco cardiovascular. A frequência dos genótipos foi de 48,7% para Pro/Pro, 37,8% para Pro/Leu e 13,5% para Leu/Leu. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de Se e na atividade da GPx entre os genótipos, nas duas fases. Entretanto, houve correlação positiva entre as concentrações eritrocitárias de Se e a atividade da GPx em ambas as fases apenas para o grupo Pro/Pro. Os resultados obtidos no ensaio do cometa foram significativamente diferentes entre os genótipos e revelaram que participantes Pro/Pro apresentaram redução na quantidade de danos em DNA após a ingestão das castanhas, o que não ocorreu naquelas Pro/Leu e Leu/Leu agrupadas. Além disso, aquelas Leu/Leu apresentaram valores de danos significativamente maiores em relação às Pro/Pro. As alterações observadas nos níveis de TBARS e lipídeos séricos não foram relacionadas aos genótipos. Também não foram verificadas alterações nas concentrações urinárias de 8-isoprostanos entre os diferentes genótipos. Estes dados sugerem um efeito benéfico do consumo de castanha-do-brasil como fonte de Se e também de ácidos graxos mono e poliinsaturados. Demonstrou-se também a influência do polimorfismo Pro198Leu no gene que codifica para a GPx1 sobre as concentrações sanguíneas de Se e a atividade eritrocitária total da GPx. Pode-se concluir que há uma interação entre este polimorfismo e o *status* de Se, bem como dos níveis antioxidantes.

**Palavras chave:** antioxidantes, castanha-do-brasil, estresse oxidativo, glutathiona peroxidase, nutrigenética, obesidade, polimorfismo, selênio.

## ABSTRACT

COMINETTI, C. **Effects of the supplementation with Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) on the oxidative stress in obese women and its relation with the Pro198Leu polymorphism in the glutathione peroxidase 1 gene.** 2010. 100p. Thesis (PhD) – Faculty of Pharmaceutical Science, University of São Paulo, São Paulo, 2010.

Obese subjects present high oxidative stress levels when compared to those with normal weight. This characteristic can be attributed to several factors, mainly the low intake of antioxidant compounds. Another aspect to be taken into account is the presence of polymorphisms in genes of antioxidant enzymes, such as the Pro198Leu in the glutathione peroxidase 1 (GPx1) gene. The objectives of this work were to study the relations among obesity, oxidative stress markers, and the GPx1 Pro198Leu polymorphism, and to verify the responses of these parameters to the intake of Brazil nuts as a selenium (Se) source. Thirty seven women in reproductive age have participated in the study. They did not present diabetes *mellitus*, thyroid diseases, intake of vitamins and minerals supplements, medicines for weight loss or for cholesterol levels management, and smoking habit. The following biochemical markers were determined: plasma, erythrocyte and nails Se concentrations; total erythrocyte GPx activity, urine 8-isoprostanes concentration; plasma TBARS concentration; DNA damage; serum lipid profile; and genotyping of the polymorphism. Each unit of Brazil nut was estimated to provide  $\approx 290$   $\mu\text{g}$  of Se. In the pre-supplementation phase, 100% of the subjects presented Se deficiency. The erythrocyte ( $60.5 \pm 22.6 \times 205.9 \pm 42.0$   $\mu\text{g/L}$ ;  $p=0.000$ ) and plasma ( $55.7 \pm 13.3 \times 132.5 \pm 34.9$   $\mu\text{g/L}$ ;  $p=0.000$ ) concentrations of this mineral had presented a significant raise in the post-supplementation phase. The same profile was observed for the GPx activity ( $36.6 \pm 17.1 \times 53.6 \pm 20.4$  U/gHb;  $p=0.000$ ) and for the plasma TBARS ( $5.0 \pm 3.7 \times 7.6 \pm 3.3$   $\mu\text{mol/L}$ ;  $p=0.000$ ) concentrations. There were no significant changes in the urinary 8-isoprostanes ( $25.1 \pm 14.2 \times 21.8 \pm 15.6$  ng/mmol creat.) concentration. The same pattern was observed in relation to the DNA damage levels ( $77.3 \pm 21.6 \times 72.2 \pm 28.1$   $\mu\text{m}$ ). Regarding the

serum lipid profile, it was not found significant changes in the total cholesterol ( $171.0 \pm 28.8 \times 175.5 \pm 26.6$  mg/dL) concentrations, LDL-c ( $114.0 \pm 29.6 \times 109.3 \pm 22.8$  mg/dL), VLDL-c ( $19.6 \pm 9.4 \times 21.7 \pm 8.3$  mg/dL) and triglycerides ( $110.3 \pm 87.9 \times 108.6 \pm 41.5$  mg/dL). However, there was a significant increase in the HDL-c ( $37.6 \pm 13.6 \times 44.5 \pm 13.4$  mg/dL;  $p < 0.00001$ ) concentrations after the Brazil nuts intake. This increase also had promoted a significant reduction in the Castelli I ( $5.0 \pm 1.8 \times 4.2 \pm 1.1$ ;  $p < 0.0002$ ) and II ( $3.4 \pm 1.7 \times 2.7 \pm 1.0$ ;  $p < 0.0004$ ) indexes, which are predictors of cardiovascular risk. The genotype frequency was 48.7% for Pro/Pro, 37.8% for Pro/Leu, and 13.5% for Leu/Leu. Se levels and GPx activity were not significantly different between the genotypes, in both pre and post-supplementation phases. However, there was a positive correlation between Se erythrocyte concentrations and GPx activity in both phases only in the Pro/Pro group. The results from the comet assay were significantly different between the genotypes and showed that subjects who were Pro/Pro presented a reduction in the levels of DNA damage after the Brazil nuts intake, which did not happen in those Pro/Leu and Leu/Leu grouped. Moreover, the Leu/Leu group showed higher damage levels when compared to that Pro/Pro. The changes in the plasma TBARS levels and in the serum lipid profile were unrelated to the genotypes. The urinary 8-isoprostanes concentrations also did not present any change regarding the genotypes. The data suggest a beneficial effect of the Brazil nut intake as a source of Se and possibly of mono and polyunsaturated fatty acid. The influence of the GPx1 Pro198Leu polymorphism on the blood Se concentration and GPx activity could be demonstrated. It could be concluded that there is an interaction between that polymorphism and the Se status, as well as the antioxidant levels.

**Keywords:** antioxidants, Brazil nut, glutathione peroxidase, nutrigenetic, obesity, oxidative stress, polymorphism, selenium.

## SUMÁRIO

<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>17</b>
1.1. OBESIDADE E ESTRESSE OXIDATIVO	17
1.2. ESTRESSE OXIDATIVO	20
1.3. GLUTATIONA PEROXIDASE 1	22
1.4. POLIMORFISMO NO GENE QUE CODIFICA PARA A GPX1 (PRO198LEU)	24
1.5. INTERVENÇÃO ALIMENTAR COM CASTANHA-DO-BRASIL	26
<b>2. HIPÓTESES EXPERIMENTAIS</b>	<b>28</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
<b>4. CASUÍSTICA</b>	<b>29</b>
4.1. AMOSTRAGEM E SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES	29
4.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	30
4.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	32
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
5.1. ANÁLISE CENTESIMAL E DE SELÊNIO NAS CASTANHAS-DO-BRASIL	33
5.2. AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA	34
5.3. AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR	34
5.4. COLETA DE MATERIAIS BIOLÓGICOS	35
5.4.1. SANGUE	35
5.4.2. URINA E UNHAS	36
5.4.3. CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO	37
5.4.4. REAGENTES E CONTROLE DA METODOLOGIA DE ANÁLISE DE SELÊNIO E DA GENOTIPAGEM	37
5.5. ANÁLISES BIOQUÍMICAS	38
5.5.1. DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO NO PLASMA, NOS ERITRÓCITOS E NAS UNHAS	38
5.5.2. ANÁLISE DA ATIVIDADE ERITROCITÁRIA TOTAL DA ENZIMA GLUTATIONA PEROXIDASE	38
5.5.3. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE TBARS (SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO)	39
5.5.4. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES URINÁRIAS DE ISOPROSTANOS ( <i>8-ISO PGF2A</i> )	39
5.5.5. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE LIPÍDEOS SÉRICOS	40
5.5.6. ENSAIO DO COMETA ALCALINO (ELETROFORESE COM GEL/MICROGEL DE CÉLULA ÚNICA)	40
5.5.7. DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA	41
5.5.8. DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO PRO198LEU NO GENE DA ENZIMA GPX 1	42
5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	45
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>47</b>
6.1. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DO ESTUDO	47
6.1.1. ESTÁGIO DE VIDA E ÍNDICE DE MASSA CORPÓREA	47
6.2. ANÁLISE CENTESIMAL E DE SELÊNIO NAS CASTANHAS-DO-BRASIL	48
6.3. AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR	48
6.3.1. VALOR ENERGÉTICO TOTAL (VET)	52

6.3.2. CONTRIBUIÇÃO DE CARBOIDRATOS, PROTEÍNAS E LIPÍDEOS EM RELAÇÃO AO VET E INGESTÃO DE ÁCIDOS GRAXOS MONOSATURADOS, POLIINSATURADOS E SATURADOS	53
6.3.3. INGESTÃO DE SELÊNIO, VITAMINAS C e E, ZINCO, COBRE e MANGANÊS	54
<b>6.4. DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO Pro198Leu NO GENE DA GPx1</b>	<b>56</b>
<b>6.5. INDICADORES BIOQUÍMICOS</b>	<b>57</b>
6.5.1. CONCENTRAÇÕES DE SELÊNIO NO PLASMA	61
6.5.2. CONCENTRAÇÕES DE SELÊNIO NOS ERITRÓCITOS	62
6.5.3. ATIVIDADE ERITROCITÁRIA TOTAL DA GPX	63
6.5.4. CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE TBARS	64
6.5.5. CONCENTRAÇÕES URINÁRIAS DE 8-ISOPROSTANOS	65
6.5.6. TAMANHOS DOS COMETAS/AVALIAÇÃO DE DANOS EM DNA	66
6.5.7. GLICEMIA	67
6.5.8. CONCENTRAÇÕES DE LIPÍDEOS SÉRICOS	67
6.5.9. DETERMINAÇÃO DOS ÍNDICES DE CASTELLI I E II	70
<b>7. DISCUSSÃO</b>	<b>72</b>
<b>8. CONCLUSÕES</b>	<b>90</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>91</b>
<b>10. ANEXOS OBRIGATÓRIOS</b>	<b>100</b>

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Características das participantes nas fases pré e pós – suplementação com castanha-do-brasil \_\_\_\_\_ 47
- Tabela 2** – Composição centesimal e concentração de selênio determinadas nas castanhas-do-brasil utilizadas na intervenção \_\_\_\_\_ 48
- Tabela 3** – Distribuição de energia, macronutrientes, ácidos graxos monosaturados, poliinsaturados e saturados, calculada através dos registros alimentares preenchidos nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil \_\_\_\_\_ 49
- Tabela 4** – Valores de ingestão de selênio, vitamina C e E, zinco, cobre e manganês, calculados através dos registros alimentares preenchidos nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil \_\_\_\_\_ 50
- Tabela 5** – Valores de ingestão de carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos graxos monosaturados, poliinsaturados e saturados, separados de acordo com os genótipos e calculados através dos registros alimentares preenchidos nas fases pré e pós-suplementação. \_\_\_\_\_ 51
- Tabela 6** – Valores de ingestão de selênio, vitaminas C e E, zinco, cobre e manganês, separados de acordo com o genótipo calculados através dos registros alimentares preenchidos nas fases pré e pós-suplementação \_\_\_\_\_ 51
- Tabela 7** – Distribuição do polimorfismo Pro198Leu no gene que codifica para a GPx1 entre mulheres obesas mórbidas submetidas a suplementação com castanha-do-brasil \_\_\_\_\_ 56
- Tabela 8** – Concentrações de selênio (Se) no plasma, eritrócitos e unhas; atividade eritrocitária total da GPx; concentrações de tbars no plasma; tamanho dos cometas e glicemia nas fases pré e pós-suplementação. \_\_\_\_\_ 58
- Tabela 9** – Concentrações séricas de colesterol total e frações nas fases pré e pós – suplementação\_ 59
- Tabela 10** – Valores médios ( $\pm$ DP) de selênio no plasma e eritrócitos, da atividade eritrocitária da GPx e de glicemia nas fases pré e pós-suplementação, separados por genótipos \_\_\_\_\_ 59
- Tabela 11** – Valores médios ( $\pm$ DP) de tbars plasmático e dos comprimentos dos cometas nas fases pré e pós-suplementação, separados por genótipos \_\_\_\_\_ 60
- Tabela 12** – Valores médios ( $\pm$ DP) de colesterol sérico total e frações nas fases pré e pós-suplementação, separados por genótipos \_\_\_\_\_ 60

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Fluxograma das Atividades Realizadas Durante a Pesquisa _____	31
<b>Figura 2</b> – Mensuração do comprimento total dos cometas em $\mu\text{m}$ (objetiva de 20X) _____	41
<b>Figura 3</b> – Amplificação de DNA genômico com primers flanquadores do polimorfismo Pro198Leu no gene que codifica para a enzima GPx1. Linha 1: Marcador de massa molecular (O'Gene Ruler – Fermentas <sup>®</sup> ), Linhas 2, 3 e 4: produtos amplificados _____	43
<b>Figura 4</b> – Quantificação dos produtos amplificados em gel de agarose 2%. Linha 1: Padrão de peso molecular (Low DNA Mass Ladder – Invitrogen <sup>®</sup> ), Linhas 2 – 8: Amostras de DNA genômico amplificadas e purificadas. As intensidades das bandas, quando comparadas com aquelas do padrão de peso molecular, indicam a concentração de DNA amplificado _____	43
<b>Figura 5</b> – Eletroferograma parcial representativo do alelo Pro/Pro _____	44
<b>Figura 6</b> – Eletroferograma parcial representativo do alelo Pro/Leu _____	44
<b>Figura 7</b> – Eletroferograma parcial representativo do alelo Leu/Leu _____	44
<b>Figura 8</b> – Valores médios de energia total obtidos dos registros alimentares e de EER calculados de acordo com o recomendado pelo IOM (2003), nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil. _____	53
<b>Figura 9</b> – Valores médios de consumo de carboidratos, proteínas e lipídeos (%) em relação ao VET obtidos dos registros alimentares nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil. _____	55
<b>Figura 10</b> – Valores médios de consumo de selênio ( $\mu\text{g}/\text{dia}$ ) obtidos dos registros alimentares nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil e ajustados em relação ao VET. _____	55
<b>Figura 11</b> – Concentrações de selênio no plasma nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil; dados gerais e separados por genótipo. _____	61
<b>Figura 12</b> – Concentrações de selênio nos eritrócitos nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil; dados gerais e separados por genótipo. _____	62
<b>Figura 13</b> – Atividade eritrocitária total da GPx nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil; dados gerais e separados por genótipo. _____	63
<b>Figura 14</b> – Concentrações plasmáticas de TBARS nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil; dados gerais e separados por genótipo. _____	64
<b>Figura 15</b> – Concentrações urinárias de 8-isoprostanos nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil; dados gerais e separados por genótipo. _____	65
<b>Figura 16</b> – Tamanho dos cometas ( $\mu\text{m}$ ) nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil; dados gerais e separados por genótipo. _____	67
<b>Figura 17</b> – Concentrações séricas de colesterol total nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil; dados gerais e separados por genótipo. _____	69
<b>Figura 18</b> – Concentrações séricas de HDL-c nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil, dados gerais e separados por genótipos. _____	69
<b>Figura 19</b> – Índice de Castelli I (razão colesterol total:HDL-c) nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil; dados gerais e separados por genótipos. _____	70
<b>Figura 20</b> – Índice de Castelli II (razão LDL-c:HDL-c) nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil; dados gerais e separados por genótipos. _____	71



## **1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1. Obesidade e estresse oxidativo**

A obesidade é uma doença crônica, de prevalência ascendente e que provoca diversos riscos à saúde. Verifica-se número elevado de casos da doença mundialmente, entretanto, a prevalência é maior em países ocidentais. No Brasil, de acordo com os últimos dados compilados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no período de 2002 – 2003, a população com 20 anos de idade ou mais, apresentava níveis de prevalência de excesso de peso de 41,1% e de obesidade, de 8,9% entre homens. Em mulheres, a proporção de excesso de peso foi de 40% e de obesidade, de 13,1%.

Níveis aumentados de estresse oxidativo são observados na obesidade. Os principais fatores contribuintes são a hiperglicemia, a atividade muscular aumentada, os níveis elevados de lipídeos teciduais, a inflamação crônica, as defesas antioxidantes inadequadas e a hiperleptinemia (VINCENT e TAYLOR, 2006).

A hiperglicemia estimula a produção de radicais livres por meio da oxidação da glicose, da glicosilação não enzimática de proteínas e da degeneração oxidativa. Produtos finais de glicosilação avançada (AGEs) são formados e se ligam a receptores específicos na superfície das células, culminando na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Estes mesmos AGEs também ativam fatores de transcrição intracelulares, como o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Este fator inicia uma via de sinalização intracelular que resulta na ativação de substâncias como a proteína quinase C e o sorbitol. Aumentos nos níveis intracelulares de glicose estimulam a via do poliol e há a conversão da glicose em sorbitol, que quando em excesso causa dano oxidativo e pode ativar genes relacionados ao estresse oxidativo. O NF- $\kappa$ B promove também a transcrição dos genes que codificam para a molécula de adesão de células vasculares 1 (VCAM-1) e para a molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1), o que

pode resultar na formação de ROS. O resultado final deste processo inclui dano oxidativo e direcionamento acelerado de monócitos para o endotélio. Outro mecanismo responsável por elevar o grau de estresse oxidativo é o aumento na atividade oxidase da enzima adenina nicotinamida dinucleotídeo fosfato (NADPH), a qual produz ânions superóxido, principalmente no endotélio. A auto oxidação da glicose também pode produzir substâncias que reagem de maneira semelhante aos radicais hidroxila e ao superóxido (MARITIM, SANDERS e WATKINS III, 2003; VINCENT e TAYLOR, 2006).

A atividade muscular aumentada se relaciona ao esforço realizado para sustentar o peso corporal elevado. A razão de consumo de oxigênio corporal pode aumentar de 10 a 15 vezes durante o esforço e o fluxo de oxigênio nos músculos ativos pode ser 100 vezes maior. Uma parte deste oxigênio pode ser convertida em vários intermediários, como o superóxido, o radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio (BANERJEE et al., 2003).

Indivíduos obesos normalmente apresentam concentrações intracelulares de triacilgliceróis elevadas, fator que pode aumentar a produção do ânion superóxido nas mitocôndrias. A concentração de gordura na região abdominal se relaciona com níveis elevados de ácidos graxos livres no plasma, os quais podem aumentar drasticamente a formação de ROS. Ainda, a hipercolesterolemia está relacionada com maior oxidação de partículas de LDL-c (*cholesterol low density lipoprotein*). O consumo de determinados tipos de gordura, como o ácido linolênico conjugado, também é capaz de modificar o grau de estresse oxidativo, aumentando a excreção de produtos finais do processo oxidativo (VINCENT e TAYLOR, 2006).

O tecido adiposo secreta fatores solúveis conhecidos como adipocitocinas, tais como a adiponectina, a leptina, a resistina e a visfatina, sendo as duas primeiras produzidas em maiores concentrações pelos adipócitos. As adipocitocinas funcionam como hormônios, influenciam a homeostase energética e regulam as funções neuroendócrinas. Estas

substâncias são relacionadas à resistência insulínica, a alterações imunológicas e ao estresse oxidativo. Enquanto a adiponectina apresenta efeitos antiinflamatórios, as outras adipocitocinas têm efeitos pró-inflamatórios. A obesidade é associada a um estado de inflamação crônica caracterizado pela produção elevada de citocinas como a interleucina 6 (IL6) e o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); de reagentes de fase aguda como a proteína C reativa (CRP); e pela ativação de vias sinalizadoras pró-inflamatórias. A concentração de CRP parece ser diretamente relacionada com a excreção de produtos finais de peroxidação lipídica em mulheres com obesidade andróide, igualmente ao observado no diabetes *mellitus* tipo II, em indivíduos tabagistas e naqueles hipercolesterolêmicos. A produção de adipocitocinas também parece ser alterada em indivíduos obesos, os quais normalmente apresentam concentrações reduzidas de adiponectina e elevadas de leptina, de resistina e de visfatina, características que favorecem um estado pró-oxidativo (DAVI et al., 2002; TILG e MOSCHEN, 2006).

A hiperleptinemia é envolvida em alguns mecanismos que aumentam o processo de estresse oxidativo em indivíduos obesos. Quando incubada com células endoteliais, a leptina estimula a produção de peróxido de hidrogênio e de radicais hidroxila. Além disto, esta adipocitocina estimula a síntese de citocinas promotoras de inflamação, como a IL-6 e o TNF- $\alpha$ , os quais, por sua vez, aumentam a produção da NADPH oxidase, que gera ânions superóxido (BOULOUMIÉ et al., 1999; TILG e MOSCHEN, 2006).

Indivíduos obesos também apresentam alterações no sistema de defesa antioxidante devido à ingestão reduzida de substâncias antioxidantes e de compostos bioativos. Além disso, as concentrações plasmáticas de vitaminas, minerais e a atividade de enzimas antioxidantes são menores na obesidade, proporcionalmente ao grau de sobrepeso. Estas características, aliadas a produção elevada de ROS, favorecem a oxidação de proteínas e de

lipídeos, contribuindo para um maior nível de estresse oxidativo (VINCENT e TAYLOR, 2006).

### **1.2. Estresse oxidativo**

O termo estresse oxidativo é geralmente definido como um desequilíbrio entre as concentrações de ROS e de espécies reativas de nitrogênio (RNS) e os mecanismos fisiológicos de defesa antioxidante. ROS são moléculas que contém oxigênio, que podem ter elétrons desapareados (elétrons que aparecem sozinhos nos orbitais) e são altamente reativas em tecidos. Um radical livre é qualquer espécie que possui um ou mais elétrons desapareados e os principais exemplos são o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ), o radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), o tiol ( $RS^{\bullet}$ ), o triclorometil ( $CCl_3^{\bullet}$ ) e o óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ). As moléculas biológicas, em sua maioria, não são radicais, mas podem ser convertidas a estas formas através de reações com um radical, o que caracteriza a reação em cadeia de formação de radicais livres. O radical hidroxila é muito reativo e propenso a atacar todas as moléculas biológicas. O ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) são menos reativos em relação ao radical hidroxila, mas quando produzidos em excesso também podem induzir danos celulares. O ânion superóxido também pode reagir com o óxido nítrico e formar peroxinitrito, o qual, por sua vez, pode oxidar grupos sulfidril ( $-SH$ ) e também pode se decompor e gerar radicais hidroxila (HALLIWELL e CHIRICO, 1993; VINCENT e TAYLOR, 2006).

Radicais livres, ROS e RNS em baixas concentrações são necessários para o estado celular redox, para a função e a sinalização celular normais, bem como para o funcionamento do sistema imune, e para a defesa contra microorganismos. Quando produzidos em excesso, ROS e radicais livres provocam danos ao DNA, a proteínas, a carboidratos e a lipídeos, comprometendo as funções celulares normais (YU, 1994; MATÉS, PÉREZ-GÓMEZ e DE CASTRO, 1999). Dentre os prejuízos ao metabolismo celular, pode ocorrer ruptura das fitas

do DNA, aumento nas concentrações de cálcio intracelular livre, danos em transportadores de íons ou em outras proteínas específicas e peroxidação de lipídeos. A intensidade destes danos dependerá da amplitude da geração de ROS, dos alvos celulares, da atividade dos sistemas de defesa antioxidante e da presença ou da ausência de metais de transição (HALLIWELL e CHIRICO, 1993).

A peroxidação lipídica é a principal forma de reação biológica em cadeia de formação de radicais livres. O mecanismo que inicia esta reação é o ataque de radicais altamente reativos (como a hidroxila) a moléculas biológicas, incluindo lipídeos (L). Ocorre a remoção de um átomo de hidrogênio da molécula, o que deixa um elétron despareado no átomo ao qual este hidrogênio estava ligado:  $L-H + OH^{\bullet} \rightarrow H_2O + L^{\bullet}$ . O radical lipídico ( $L^{\bullet}$ ) resultante pode ter vários destinos, entretanto, o mais provável é que ocorra um rearranjo molecular, com conseqüente reação com oxigênio, gerando um radical peroxil:  $L^{\bullet} + O_2 \rightarrow LOO^{\bullet}$ . Este último pode se combinar com outros radicais, atacar proteínas de membranas e também remover átomos de hidrogênio de cadeias laterais de ácidos graxos vizinhos, por conseqüência, propagando a reação em cadeia de peroxidação lipídica:  $LOO^{\bullet} + L-H \rightarrow LOOH + L^{\bullet}$  (HALLIWELL e CHIRICO, 1993).

A extensão da disseminação destas reações em cadeia é dependente de alguns fatores, dos quais a presença de antioxidantes capazes de bloquear a propagação da reação é de grande importância. Estes antioxidantes podem ser caracterizados como inibidores da peroxidação de lipídeos e também podem ser divididos em dois grupos: *antioxidantes de baixo peso molecular*, entre eles, substâncias lipossolúveis como o  $\alpha$ -tocoferol e o  $\beta$ -caroteno, e hidrossolúveis como o ácido ascórbico; e *enzimas*. Os primeiros são substâncias químicas que inibem a peroxidação lipídica provocada por várias espécies reativas. Num estado fisiológico tecidual normal, há um balanço entre a atividade destas espécies reativas e os

níveis intracelulares dos compostos antioxidantes, a fim de manter o equilíbrio oxidante-antioxidante e de prevenir danos teciduais (MATÉS, PÉREZ-GÓMEZ e DE CASTRO, 1999; DOTAN, LICHTENBERG e PINCHUK, 2004). As principais enzimas antioxidantes são a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutathiona peroxidase (GPx). A primeira converte radicais superóxido em peróxido de hidrogênio. A catalase e a GPx reduzem peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos. Alguns minerais também são considerados importantes antioxidantes, entre eles o zinco, o cobre, o manganês e o selênio (VINCENT e TAYLOR, 2006). A capacidade antioxidante do selênio se deve ao fato deste mineral compor o sítio catalítico da enzima GPx.

### **1.3. Glutathiona peroxidase 1**

As GPx são encontradas em todos os tecidos de mamíferos em que ocorrem processos oxidativos. Estas enzimas podem prevenir a produção de ROS, contribuindo para a proteção das macromoléculas e das biomembranas do organismo contra a oxidação. Atualmente, quatro membros da família das GPx são conhecidos: a GPx1 ou citosólica, a GPx2 ou gastrintestinal, a GPx3 ou extracelular e a GPx4 ou fosfolípido hidroperóxido (BROWN e ARTHUR, 2001, TAPIERO, TOWNSEND e TEW, 2003; GONZAGA, MARTENS e COZZOLINO, 2005). Recentemente a GPx6 foi caracterizada em epitélio olfatório e tecidos embrionários. Outras variantes da GPx onde o resíduo de selenocisteína é substituído por cisteína, incluem a GPx5 com expressão restrita no epidídimo e a GPx fosfolípido hidroperóxido sem a selenocisteína, nomeada de GPx7 (KRYUKOV et al., 2003; UTOMO et al., 2004; PAPP et al., 2007).

As GPx dependentes de selênio contém um resíduo simples de selenocisteína em cada uma de suas quatro subunidades, o que é essencial para a atividade enzimática. Todas as GPx reduzem peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos a partir da glutathiona (GSH), no

entanto, a especificidade para o substrato é bastante diferente para cada enzima. O metabolismo da GSH é um dos mecanismos de defesa antioxidante mais importante do sistema biológico e é representado pela seguinte reação:  $\text{ROOH} + 2\text{GSH} \xrightarrow{\text{GPX}} \text{ROH} + \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O}$ .

A síntese de selenoproteínas é totalmente dependente da disponibilidade de selênio. Quando há baixa ingestão, ocorre o direcionamento do mineral para síntese de determinadas selenoproteínas, enquanto outras recebem quantidades menores. Em razão disto, algumas enzimas perdem sua atividade mais rapidamente na deficiência de selênio. Outras podem não apresentar alterações em casos de deficiência moderada, perdendo atividade somente após deficiência grave e prolongada do mineral. A perda de atividade implica também na redução da estabilidade da enzima, o que, por sua vez, reduz os níveis dos respectivos RNAm. Esta característica é menos importante do que a perda de atividade da enzima, mas as diferenças na estabilidade dos RNAm específicos de cada selenoproteína influenciarão no direcionamento do selênio para cada uma delas. Em casos de repleção do mineral, selenoproteínas que apresentam maior estabilidade são sintetizadas mais rapidamente em relação aquelas menos estáveis, sendo que a GPx1 e a GPx3 são as que apresentam resposta mais rápida à depleção de selênio e após a repleção, demoram mais tempo para se tornar detectáveis e atingir novamente os níveis máximos de expressão (BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999).

A expressão das GPx ocorre em várias partes do organismo, mas o nível de cada isoforma varia dependendo do tipo de tecido. A GPx1, em casos de níveis adequados de selênio, apresenta expressão elevada em tecidos com altos índices de produção de peróxidos, predominantemente nos eritrócitos, nos rins, no fígado e nos pulmões. Esta enzima é capaz de metabolizar um grande número de hidroperóxidos livres, inclusive aqueles liberados a partir de ácidos graxos de cadeia longa, por ação de fosfolipases. Entretanto, não tem capacidade para metabolizar hidroperóxidos de ácidos graxos esterificados em fosfolipídeos,

como aqueles presentes em membranas celulares sob ataque oxidativo (REILLY, 1996; MATÉS, PÉREZ-GÓMEZ e DE CASTRO, 1999).

As GPx também são envolvidas na sinalização de citocinas. O peróxido de hidrogênio produzido nas mitocôndrias em resposta ao TNF- $\alpha$  pode promover a ativação do NF- $\kappa$ B. Os sítios  $\kappa$ B, onde o NF- $\kappa$ B se liga ao DNA são encontrados na região promotora de vários genes. Estes genes, geralmente codificam para citocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão celular, imunoreceptores e proteínas de fase aguda. Entretanto, a ativação do NF- $\kappa$ B pode ser inibida ou até mesmo anulada por alguns antioxidantes, entre os quais, as GPx. A GPx1 e a GPx4 são consideradas inibidoras da ativação do NF- $\kappa$ B principalmente por promoverem uma redução na expressão de ciclooxigenases e lipoxigenases, as quais dependem de uma quantidade mínima de peróxidos para serem cataliticamente ativas (FLOHÉ et al., 1997; BRIGELIUS-FLOHE, 1999; STRAIF et al., 2000).

#### **1.4. Polimorfismo no gene que codifica para a GPx1 (Pro198Leu)**

A partir do sequenciamento completo do genoma humano no ano de 2003 e do desenvolvimento de novas tecnologias relacionadas à biologia molecular, houve uma mudança profunda no entendimento das doenças genéticas, as quais anteriormente eram conhecidas por serem determinadas por mutações simples em genes ou por anormalidades cromossômicas. Atualmente já está bem estabelecido que genes e outras sequências de DNA interagem com diversos fatores ambientais, inclusive a alimentação, podendo influenciar os riscos e o desenvolvimento de doenças. Quando há uma alteração na sequência de nucleotídeos de um determinado gene é possível que haja também diferenças nos aminoácidos codificados e, por consequência, a estrutura e a função da proteína podem ser afetadas. As diferenças nas características físicas entre indivíduos de uma mesma espécie são determinadas por variações em genes conhecidas como alelos. Considera-se que um alelo variante ou não



normal seja comum quando ocorre em mais de 1% de uma população, sendo então denominado polimorfismo. Um polimorfismo de nucleotídeo simples ou único (**SNP**, do inglês: *single nucleotide polymorphism*) é caracterizado por uma alteração em um códon de DNA, onde uma base simples é substituída por outra. Devido a frequência relativamente alta (cerca de 1 a cada 1000 nucleotídeos), os polimorfismos são considerados as maiores variações genéticas entre indivíduos. Aqueles polimorfismos que ocorrem na região promotora dos genes ou em éxons possivelmente são mais associados com ambos o risco de desenvolvimento e a resistência a determinadas doenças crônicas não transmissíveis. A relação existente entre fatores genéticos e alimentação certamente depende da identificação de SNPs em genes de interesse (KAUWELL, 2005).

Vários estudos objetivam esclarecer uma possível ligação entre estresse oxidativo e doenças, e normalmente utilizam medidas de níveis sanguíneos de antioxidantes ou suplementações com essas substâncias. A interpretação desses estudos é bastante complexa, principalmente devido às grandes variações orgânicas interindividuais e na ingestão alimentar de antioxidantes.

Em 1999, foi detectado um polimorfismo no gene que codifica para a GPx1 em indivíduos suecos. Um ponto de mutação na posição 593 C/T que causa a substituição de uma prolina por uma leucina no códon 198 (Pro198Leu) foi identificado em 3 indivíduos, 2 deles homozigotos e 1 heterozigoto. Análises posteriores realizadas com 25 indivíduos suecos resultaram em 13 indivíduos homozigotos para prolina (52%), 3 indivíduos homozigotos para leucina (12%) e 9 indivíduos heterozigotos (36%) (FORSBERG, DE FAIRE e MORGENSTERN, 1999). Em 2000, Forsberg et al., determinaram a frequência de alelos e o fenótipo em relação ao polimorfismo Pro198Leu no gene da GPx1 em duas populações, uma delas composta por indivíduos suecos, sendo 101 infartados e 214 controles. Nesta população, a distribuição do genótipo entre os casos foi de 55% de homozigotos para

prolina, de 38% de heterozigotos e de 6,9% de homozigotos para leucina. Entre os controles, esta distribuição foi de 53%, 40% e 7,4%, respectivamente. O segundo grupo estudado foi composto por 66 indivíduos finlandeses. A distribuição do genótipo neste grupo foi de 35% de homozigotos para prolina, de 48% de heterozigotos e de 17% de homozigotos para leucina. Nestes indivíduos, foi determinada a atividade eritrocitária da GPx e não houve diferenças nos valores quando relacionados aos diferentes genótipos, sugerindo uma alta estabilidade da enzima variante. Entretanto, Ravn-Haren et al. (2006) analisaram a relação entre a presença deste polimorfismo e a atividade eritrocitária da GPx em maior número de mulheres dinamarquesas com e sem diagnóstico de câncer de mama e verificaram uma redução de 5% na atividade da enzima para cada cópia adicional do alelo variante. Para avaliar a eventual diferença de resposta à suplementação com selênio do alelo da GPx1 contendo prolina ou leucina na posição 198, foram construídos clones de células de câncer de mama que expressavam exclusivamente um ou outro alelo (HU e DIAMOND, 2003). Nesse caso, o alelo variante apresentou menor resposta em relação à estimulação da atividade de GPx1 observada durante a suplementação com selênio, em comparação ao alelo selvagem.

O polimorfismo parece variar em relação à etnia, uma vez que estudos com indivíduos japoneses encontraram prevalência significativamente menor do alelo variante, em comparação aos estudos citados anteriormente (HUZUYA et al. 2008; LEI et al. 2009).

### **1.5. Intervenção alimentar com castanha-do-brasil**

Algumas estratégias podem ser utilizadas com o intuito de reduzir o grau de estresse oxidativo em populações de indivíduos obesos. Medidas como intervenções farmacológicas e cirúrgicas e a prática de atividades físicas para redução de peso e consequente melhora do grau de estresse oxidativo podem ser consideradas. Outra opção que pode ser útil é a instituição de terapias antioxidantes, as quais devem ser bem planejadas para que possam ser

efetivas, considerando-se o tempo, o tipo e a dose dos antioxidantes a serem utilizados. Alguns estudos demonstram efeitos positivos na redução do estresse oxidativo em indivíduos diabéticos, obesos, e também em animais. As principais substâncias utilizadas são o  $\beta$ -caroteno, o ácido ascórbico e o  $\alpha$ -tocoferol. Não há relatos na literatura mostrando a utilização de suplementação com selênio em seres humanos para esta finalidade. A castanha-do-brasil é reconhecida pelo conteúdo e biodisponibilidade de selênio. Assim, esta oleaginosa, abundante no norte e nordeste brasileiros, é uma boa opção de oferta de selênio por meio da alimentação. A utilização da castanha-do-brasil já provou ser eficiente em melhorar o *status* de selênio em dois estudos nacionais e em um deles demonstrou-se também a eficácia da suplementação em elevar a atividade plasmática e eritrocitária da enzima GPx em esportistas (BEHR, 2004; COUTINHO, 2003). Dessa maneira, a suplementação com castanha-do-brasil pode também ser eficaz em reduzir o grau de estresse oxidativo em indivíduos obesos, podendo ser instituída como rotina no tratamento desta condição.

Entretanto, as diferenças nos perfis de genótipo para a enzima GPx1 com relação ao polimorfismo Pro198Leu podem ou não afetar a resposta a intervenções alimentares de forma ainda pouco explorada. A grande maioria dos estudos utiliza somente parâmetros relacionados às concentrações sanguíneas e urinárias de antioxidantes e à atividade de algumas enzimas. Isto causa uma dificuldade acentuada em interpretar os dados obtidos, devido às importantes variações intra e interindividuais relacionadas à capacidade antioxidante. Esta particularidade, vinculada aos avanços obtidos na área da nutrigenética, demonstra a importância da determinação dos perfis de genótipo desta enzima, com o intuito de interpretar os resultados obtidos com maior exatidão e a partir disso, direcionar diferentes tipos de intervenções. Além disto, estas análises podem fornecer um conhecimento mais aprofundado desta característica em uma subpopulação brasileira, diferentemente dos estudos já realizados em outros países.

## 2. HIPÓTESES EXPERIMENTAIS

Indivíduos obesos (grau III) apresentam níveis elevados de estresse oxidativo? O *status* de selênio é alterado em obesos grau III? A suplementação com castanha-do-brasil é capaz de reduzir o grau de estresse oxidativo melhorando o perfil antioxidante e o *status* de selênio? A atividade da enzima GPx varia em função do polimorfismo Pro198Leu no gene da GPx1 antes e após a intervenção? A resposta antioxidante à suplementação difere entre indivíduos com perfis de genótipo distintos para a GPx1, relacionados ao polimorfismo Pro198Leu?

## 3. OBJETIVOS

- Determinar o *status de* selênio e o nível de estresse oxidativo em indivíduos com obesidade grau III;
- Determinar o polimorfismo Pro198Leu no gene que codifica para a enzima GPx1;
- Verificar se este polimorfismo influencia o *status* de selênio e a atividade eritrocitária total da enzima GPx;
- Suplementar os voluntários com castanha-do-brasil e verificar o efeito desta suplementação sobre o *status* de selênio e o grau de estresse oxidativo;
- Comparar a resposta sobre o *status* de selênio, o grau de estresse oxidativo e a atividade total da enzima GPx à suplementação, considerando o polimorfismo Pro198Leu no gene que codifica para a GPx1.

## 4. CASUÍSTICA

### 4.1. Amostragem e Seleção dos Participantes

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, sob o protocolo número 409 em 26/03/2007 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, sob o protocolo número 0897/07, em 30/01/2008.

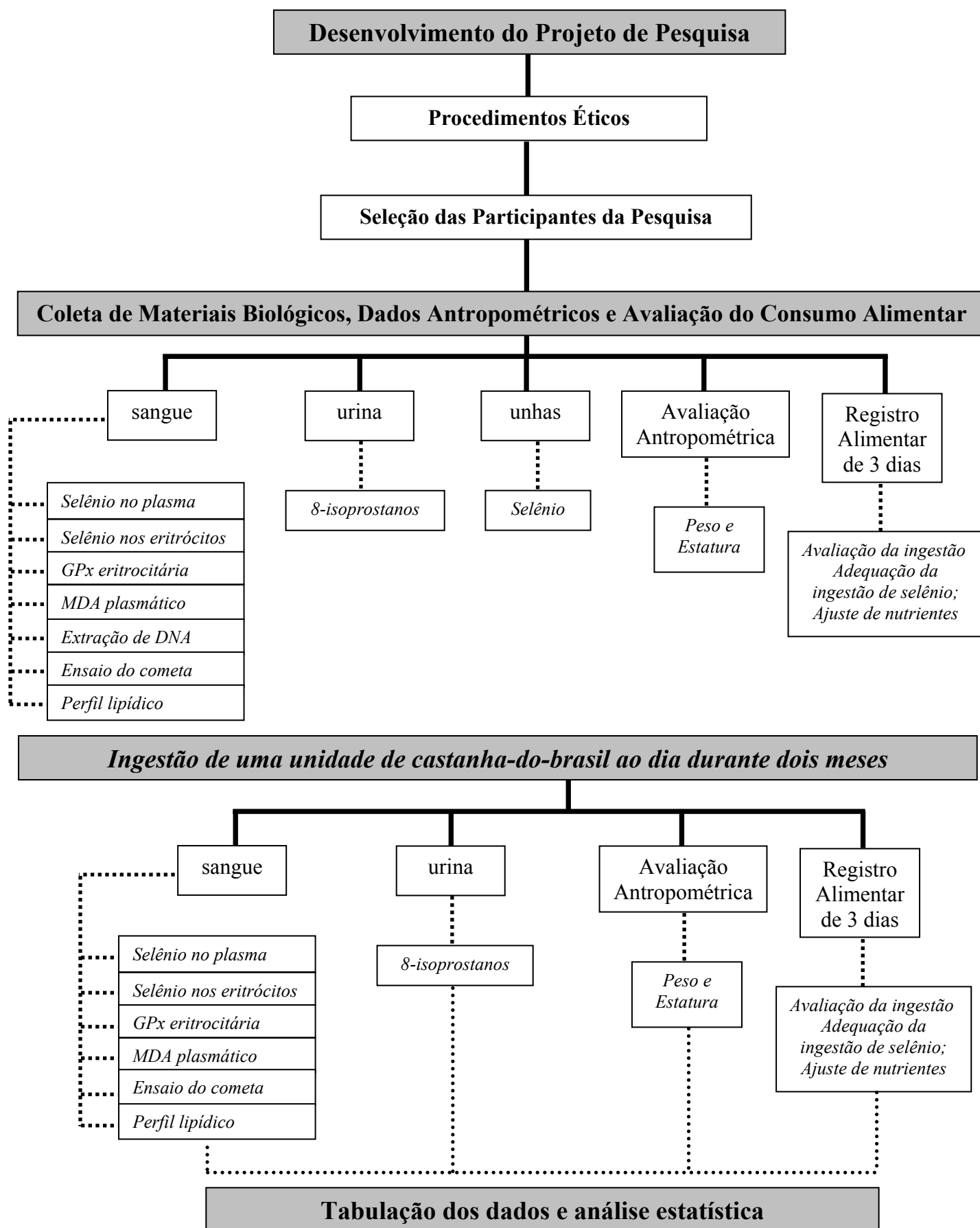
Foram selecionadas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, mulheres com obesidade grau III, na faixa etária entre 18 e 51 anos, ou que não estivessem no período da menopausa, respeitando os critérios de exclusão listados no item 4.3. Inicialmente foi recebida uma lista com os nomes de pacientes que aguardavam a realização da cirurgia para redução de peso. Após triagem inicial foram excluídos homens, mulheres com idade superior ao estabelecido e aquelas que apresentavam diabetes *mellitus*, doenças coronarianas, hipotireoidismo e índice de massa corporal (IMC) superior a 50, o qual caracteriza superobesidade. A próxima etapa foi realizar contato telefônico com as pacientes. Quando as voluntárias aceitavam participar da pesquisa, era agendado um dia para que estas comparecessem ao Ambulatório de Obesidade do Hospital das Clínicas para explicações referentes ao preenchimento do registro alimentar, ao desenvolvimento do estudo, além da assinatura dos Termos de Consentimento Livres e Esclarecidos e da entrega dos recipientes para coleta de urina. Ainda neste dia, era preenchida uma ficha de anamnese clínica para obter maiores informações sobre: estado de saúde, hábitos alimentares, prática de atividade física, consumo de medicamentos/suplementos, entre outros dados. Após os esclarecimentos e procedimentos acima, era marcado o dia para a coleta de sangue e dos dados antropométricos, e para recebimento das amostras de urina, entrega das castanhas e calendários de acompanhamento, bem como do recebimento e conferência dos

registros alimentares. Desde o início, 168 mulheres foram contatadas, porém apenas 37 concluíram a pesquisa. Dasquelas, 40 se enquadraram nos critérios de exclusão, 57 não puderam ser contatadas devido a erros nos telefones constantes na lista/ou não atenderam as chamadas diversas vezes/ou moravam em outras localidades, 10 se recusaram ou não puderam participar, 7 desistiram, 15 já haviam sido operadas, 1 havia falecido e 1 foi excluída na segunda fase do estudo por interromper o consumo das castanhas.

A coleta de dados ocorreu no período de setembro de 2007 a novembro de 2008.

#### **4.2. Protocolo Experimental**

No momento da coleta inicial de sangue, urina e dados antropométricos, as participantes recebiam uma embalagem com castanhas-do-brasil em quantidade suficiente para 60 dias, embaladas e protegidas da luz por papel alumínio, com as devidas instruções para o consumo e informações nutricionais. Cada participante recebeu um calendário para controle de consumo. Para que a suplementação fosse considerada efetiva, pelo menos 85% das castanhas deveriam ser consumidas. No decorrer do período da suplementação, em intervalos de quinze dias, as participantes eram contatadas por telefone para acompanhamento do consumo das castanhas, bem como de possíveis dúvidas ou problemas em relação ao protocolo. Quinze dias antes do término do período de suplementação as voluntárias eram informadas sobre o dia agendado para a coleta final de dados e também era solicitado que preenchessem um novo registro alimentar e que a coleta de urina fosse realizada na manhã do dia agendado para a coleta dos outros dados. No dia agendado, os registros alimentares eram conferidos em conjunto com as participantes e estas também entregavam o calendário de acompanhamento para verificação da aderência ao protocolo.



**Figura 1** – Fluxograma das Atividades Realizadas Durante a Pesquisa

### 4.3. Critérios de Inclusão

Foram incluídas na pesquisa mulheres com diagnóstico de obesidade grau III, com idades entre 18 e 51 anos, que não apresentassem qualquer tipo de doença, estado espoliativo (infecção, inflamação, febre, estresse metabólico, diarreia) ou enfermidades como câncer, artrite reumatóide, diabetes *mellitus*; hipertensão moderada/grave; que não utilizassem fármacos com potencial de interferir no perfil bioquímico de micronutrientes; que não apresentassem alergia alimentar a oleaginosas; não fossem tabagistas e não estivessem no período da menopausa; que não relatassem consumo regular de castanha-do-brasil e que não praticassem atividade física intensa.



## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Análise centesimal e de selênio nas castanhas-do-brasil

As castanhas utilizadas no protocolo de suplementação foram doadas pela empresa Agropecuária Aruanã S/A, localizada no município de Itacoatiara - AM. No dia 05/07/2007 foram recebidos 120 kg de castanhas, que foram selecionadas, pesadas e armazenadas em embalagens individuais já destinadas a cada participante do estudo. Foram embaladas a vácuo e envoltas por papel alumínio sendo posteriormente armazenadas em freezer -20°C. Retirou-se, dentre todas as castanhas, uma amostra aleatória para determinação da composição centesimal e da concentração de selênio. A composição centesimal foi determinada de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (umidade, lipídeos e cinzas) e da *Association of Official Analytical Chemists* – AOAC (proteínas). As castanhas, após serem trituradas, foram liofilizadas e, pela diferença de peso obtida antes e após a liofilização, determinou-se a umidade. Em seguida foram determinados os teores de lipídeos totais, proteínas, cinzas e carboidratos. A concentração de selênio foi determinada pelo método de espectrofotometria de absorção atômica por geração de hidretos acoplados a cela de quartzo (HGQTAAS) (GONZAGA, 2002). Amostras de castanha (cerca de 300 mg) foram transferidas para tubos de micro Kjeldhal com a posterior adição de 5 mL de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) 68% P.A. (Merck®) para se proceder a digestão. Os tubos foram colocados em bloco digestor com temperatura inicial de 50°C, a qual foi aumentada gradativamente até alcançar, no máximo, 150°C. Após a digestão completa do material orgânico, as soluções foram reduzidas de Se (VI) para Se (IV), com o acréscimo de 5 mL de HCl 1,2 N (Merck®) e aquecimento durante duas horas em até 100°C. Por fim, estas amostras foram diluídas para 100 mL de água desionizada e submetidas a leitura. Para preparação da curva de calibração foi utilizado Titrisol® - *selenium standard solution* 1000 mg/L – (Merck®), o qual foi diluído

em HNO<sub>3</sub> a 1%, nas concentrações de 0; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 30,0 µg/mL. Como padrão interno foi utilizado *Wheat Flour Standard Reference Material 1567a* (*National Institute of Standards & Technology – NIST*), o qual foi submetido aos mesmos procedimentos das amostras.

## **5.2. Avaliação Antropométrica**

Dados de peso e de estatura das voluntárias foram aferidos com o intuito de obter o IMC, que é calculado dividindo-se o peso em quilogramas pela estatura em metros elevada ao quadrado [IMC= peso (kg) / estatura (m)<sup>2</sup>]. Em ambas as fases da pesquisa esses dados foram obtidos no momento da coleta de sangue. O peso foi obtido em balança digital da marca Filizola<sup>®</sup> com capacidade para 300 kg e precisão de 100 gramas, com a paciente posicionada no centro da plataforma, sem calçados e trajando roupas leves. A estatura foi avaliada com estadiômetro fixado na parede, graduado em centímetros, com esquadro móvel para posicionamento sobre a cabeça da voluntária que nesse momento estava descalça, em posição ereta, com os pés unidos e olhando para frente.

## **5.3. Avaliação do Consumo Alimentar**

O consumo alimentar das participantes do estudo foi avaliado através do método de registro alimentar de três dias não consecutivos, incluindo um dia de final de semana. Para isto, todas receberam um caderno com instruções detalhadas sobre o preenchimento dos registros, além de orientações orais durante a entrevista, e o entregaram no momento da coleta de sangue. Todos os cadernos foram conferidos por nutricionista treinado no momento do recebimento. Estes registros foram avaliados com o auxílio do Software NutWin, da Escola

Paulista de Medicina/UNIFESP, que foi complementado com dados de selênio de alimentos nacionais (FERREIRA et al., 2002).

#### **5.4. Coleta de Materiais Biológicos**

##### **5.4.1. Sangue**

A coleta de sangue nas duas fases da pesquisa foi realizada por auxiliares de enfermagem do Ambulatório de Obesidade Mórbida do HCFMUSP. As voluntárias eram orientadas a comparecer ao local em jejum de 8-12 horas. Cerca de 15 mL de sangue eram coletados e transferidos para tubos apropriados contendo anticoagulante EDTA e 5 mL, para tubos sem anticoagulante, para obtenção do soro. O sangue era homogeneizado por inversão e os tubos eram acondicionados em isopor com gelo. Imediatamente após a coleta, duas alíquotas de 250 µL de sangue total eram armazenadas em tubos do tipo “eppendorf”, protegidos contra a luz, contendo uma solução mista de DMSO (Merck®) e meio de cultura RPMI (Sigma®) na proporção de 20:80 v/v, para realização posterior do ensaio do cometa alcalino. O restante do material biológico era transportado até as dependências do laboratório de Nutrição – Minerais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas para seu processamento e armazenamento adequados. Depois de realizados os procedimentos, cada participante recebeu um lanche.

O plasma foi separado do sangue total por centrifugação em 3000 x g durante 15 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C (SORVALL® RC5C), extraído com pipeta automática, acondicionado em tubos de polipropileno desmineralizados e etiquetados, sendo a seguir armazenados em ultrafreezer -80°C para análise posterior. O soro foi obtido após centrifugação dos tubos em temperatura ambiente a 3000 x g durante 15 minutos, extraído e armazenado de maneira idêntica às amostras de plasma. Para extração de DNA, alíquotas de

1 mL de sangue total foram acondicionadas em tubos autoclavados e armazenadas em ultrafreezer.

A separação dos eritrócitos seguiu o método padronizado por WHITEHOUSE et al. (1982): a massa eritrocitária obtida do sangue total foi lavada três vezes com 5 mL de solução fisiológica (NaCl 0,9%), homogeneizada lentamente por inversão e centrifugada em 10000 x g durante 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante desprezado. Após a última centrifugação, a solução fisiológica foi descartada e os eritrócitos cuidadosamente extraídos com pipeta automática. Após este procedimento, os eritrócitos foram acondicionados em tubos desmineralizados, etiquetados e mantidos em ultrafreezer a – 80°C até o momento das análises.

#### **5.4.2. Urina e Unhas**

Foram coletadas amostras aleatórias de urina em frascos sem contaminantes e livres de solventes orgânicos para análise dos níveis de excreção de 8-isoprostanos. Alíquotas foram transferidas para tubos de ensaio e centrifugadas a 4°C, em 4000 x g durante 5 minutos, para deposição de eventuais materiais precipitados. Alíquotas de 1,5 mL do sobrenadante foram acondicionadas em tubos de polipropileno contendo 15 µL de butilhidroxitolueno (BHT-Sigma<sup>®</sup>) 0,005% etanólico para que fosse evitada a oxidação das amostras. Amostras de unhas foram coletadas para determinação das concentrações de selênio. As unhas dos dedos das mãos e dos pés foram coletadas e armazenadas em frascos plásticos, separadamente das unhas dos hálux. Estas foram higienizadas com solução detergente neutra a 5% (Extran-Merck<sup>®</sup>), enxaguadas no mínimo 10 vezes com água destilada e secas em estufa.

### 5.4.3. Controle de Contaminação

Visando a redução da contaminação por minerais, toda vidraria, frascos e recipientes utilizados durante a análise de selênio foram desmineralizados em banho de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) a 20% por 12 horas e enxaguados dez vezes em água ultrapura, secos em estufa de aço inoxidável e, por último, foram armazenados adequadamente. Todos os materiais utilizados na extração do DNA, na realização do ensaio do cometa e na determinação do polimorfismo Pro198Leu foram esterilizados em autoclave, a 120°C durante 20 minutos. Imediatamente antes da preparação das reações de PCR todas as bancadas foram higienizadas com álcool 70%, solução específica para eliminação de DNAses e água ultrapura.

### 5.4.4. Reagentes e Controle da Metodologia de Análise de Selênio e da Genotipagem

Todos os reagentes utilizados nas análises apresentaram grau pureza analítica (P.A.) A água utilizada no preparo das soluções e diluições das amostras foi sempre ultrapura.

Para controle da metodologia de análise de selênio, utilizou-se o material de referência certificado *Seronorm Serum* para determinação plasmática e *Seronorm Whole Blood* para determinação eritrocitária (Sero AS<sup>®</sup>). Estes foram preparados por digestão ácida, via úmida em sistema aberto, diluídos em água ultrapura de maneira idêntica aquela adotada para as amostras biológicas. Estabeleceu-se que uma análise cujo material de referência apresentasse uma recuperação menor do que a indicada pelo fabricante seria desprezada e a análise repetida.

Na determinação do polimorfismo foram utilizados três tipos diferentes de controles negativos em cada reação de PCR: (1) todos os reagentes, exceto DNA; (2) todos os reagentes, exceto DNA e *primer reverse*; (3) todos os reagentes, exceto DNA e *primer forward*.

## **5.5. Análises Bioquímicas**

### **5.5.1. Determinação de Selênio no Plasma, nos Eritrócitos e nas Unhas**

Para a análise da concentração sanguínea de selênio, alíquotas de amostras de plasma e de eritrócitos (cerca de 300  $\mu$ L) foram transferidas para tubos de micro Kjeldhal com posterior adição de 5 mL de ácido nítrico 68% PA (Merck<sup>®</sup>). Os tubos foram colocados em blocos digestores com temperatura inicial de 50°C que foi aumentada gradativamente até alcançar 150°C. Após a digestão completa do material orgânico, cerca de 4-6 horas para o plasma e de 7-14 horas para os eritrócitos, as soluções foram reduzidas de Se VI para Se IV com o acréscimo de 5 mL de HCl 1,2 N (Merck<sup>®</sup>) e aquecimento durante duas horas em até 100°C. Por fim, estas amostras foram diluídas para 25 mL com água ultrapura e submetidas a leitura por espectrofotometria de absorção atômica por geração de hidretos acoplados a cela de quartzo (HGQTAAS) (GONZAGA, 2002). As amostras de unhas coletadas apenas na fase pré-suplementação (por ser considerado um marcador de longo prazo do estado nutricional relativo ao selênio) foram higienizadas com detergente neutro, secas em estufa e pesadas. O mesmo procedimento de digestão por via úmida ácida adotado para plasma e eritrócitos foi também utilizado para as unhas, durante cerca de 10-12 horas. As soluções também foram reduzidas de Se VI para Se IV com a adição de HCl 1,2 N e aquecimento. A mesma diluição e o mesmo método de análise citados anteriormente foram utilizados. As concentrações de selênio no sangue e nas unhas foram expressos em  $\mu$ g/L e  $\mu$ g/g, respectivamente.

### **5.5.2. Análise da atividade eritrocitária total da enzima glutathiona peroxidase**

A atividade total da GPx foi determinada nos eritrócitos que foram obtidos de acordo com o exposto no item 5.4.1. A hemoglobina foi dosada no mesmo hemolisado comum às dosagens da GPx (VAN ASSENDELFT, 1972). A análise da atividade da GPx nos eritrócitos

foi realizada com a utilização do kit Ransel (Randox<sup>®</sup>), em um analisador bioquímico Lyasis<sup>®</sup>, baseada no consumo de NADPH reduzida, numa reação contendo glutatona reduzida, glutatona redutase, lisado de células e peróxido de hidrogênio. A atividade da GPx foi expressa em U/gHb.

### **5.5.3. Determinação das concentrações plasmáticas de TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico)**

Para este ensaio, triplicatas de 500 µL de plasma foram distribuídas em tubos de ensaio. Em seguida, foram adicionados 200 µL de SDS 8,1% (GE Healthcare<sup>®</sup>), 1,5 mL de ácido acético 20% (pH 3,5) (Synth<sup>®</sup>), 1,5 mL de TBA (ácido tiobarbitúrico) (0,8% p/v em NaOH 0,05M) [Sigma<sup>®</sup>] e 600 µL de água ultrapura. As soluções foram agitadas e levadas ao banho-maria fervente por 60 minutos, seguida de resfriamento em banho de gelo. Foram acrescentados 3,0 mL da mistura de n-butanol e piridina (15:1 v/v) [Merck<sup>®</sup>] e 1 mL de água ultrapura, com posterior agitação. Após centrifugação a 4000 x g em temperatura ambiente, alíquotas da fase superior foram coletadas e analisadas espectrofotometricamente em um comprimento de onda de 532 nm. O tetrametoxipropano (TMP – Sigma<sup>®</sup>) foi utilizado como padrão externo e o nível de peróxidos lipídicos foi expresso como µmol/L (OKAWA, OHISI e YAGI, 1979; adaptado por ANDRADE WARTHA, 2007).

### **5.5.4. Determinação das concentrações urinárias de isoprostanos (8-iso PGF<sub>2</sub>α)**

Este marcador foi determinado por ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) com o kit 8-isoprostane EIA<sup>®</sup> (Cayman Chemical Co). Não houve necessidade de purificação das amostras de urina visto que diversos testes de diluição resultaram em valores semelhantes (diferença ≤ 20%). Foi seguido o protocolo de análise fornecido pelo fabricante do kit. A

leitura das placas foi feita em espectrofotômetro com comprimento de onda de 410 nm e os resultados calculados em ng/mmol de creatinina, também determinada nas mesmas amostras de urina com o kit de Creatinina Cinética da empresa CELM<sup>®</sup>. O fundamento do método é baseado na reação da creatinina com o picrato alcalino (reação de Jaffé), a qual produz um cromógeno vermelho que pode ser medido em espectrofotômetro com luz visível (500 nm).

#### **5.5.5. Determinação das concentrações de lipídeos séricos**

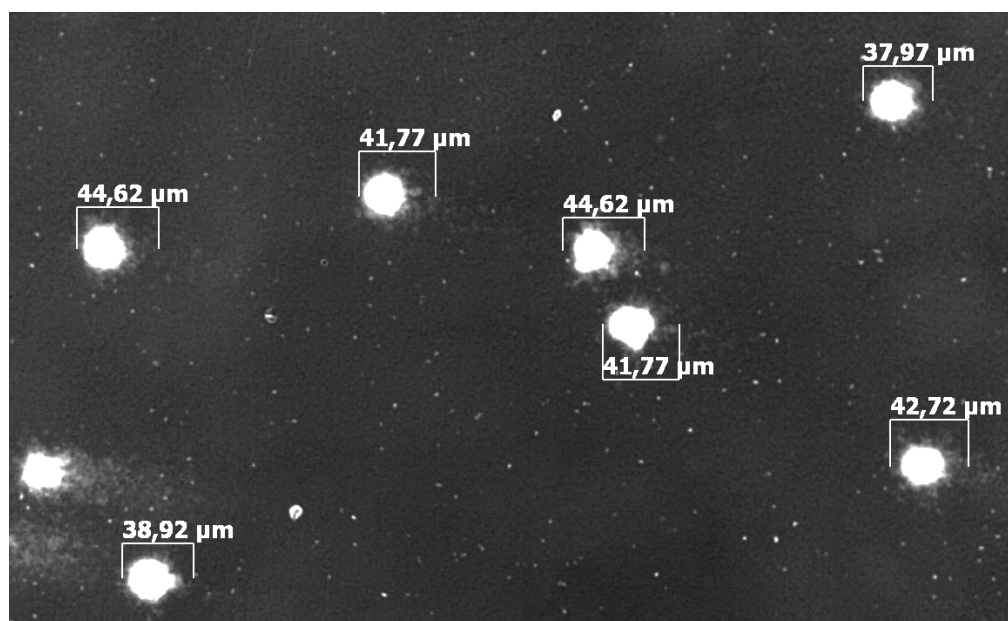
Estes parâmetros foram analisados por métodos enzimáticos colorimétricos pelo Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. O colesterol contido na HDL foi determinado após a precipitação das frações LDL e VLDL. As frações LDL e VLDL foram calculadas a partir da equação de Friedewald, Levy e Fredrickson (1972), onde:  $LDL-c = CT - (VLDL-c + HDL-c)$ ;  $VLDL-c = \text{triacilglicerol}/5$ .

#### **5.5.6. Ensaio do cometa alcalino (eletroforese com gel/microgel de célula única)**

Alíquotas de 10 $\mu$ L de sangue total foram misturadas a 100 $\mu$ L de agarose de baixo ponto de fusão (Sigma<sup>®</sup>) a 0,5% em tampão PBS, homogeneizadas e transferidas para uma lâmina de microscópio já tratada com uma camada de agarose a 1,5%. Em seguida, as lâminas foram transferidas para uma solução de lise (NaCl 2,5M, EDTA 100 mM, Base Trizma 10 mM, DMSO 10%, N-laurilsarcosina 1%, pH 10 e Triton X-100 1%). Após uma hora as lâminas foram lavadas três vezes com água ultrapura gelada durante 20 minutos e imersas durante 20 minutos a 5°C em uma cuba de eletroforese horizontal com tampão (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH>13). A eletroforese foi realizada durante 20 minutos em 0.9 V/cm a 5°C. Os cometas resultantes foram neutralizados com Tris 0,4 M três vezes durante 5 minutos, fixados com uma solução de ácido tricloroacético, sulfato de zinco e



glicerina, corados com solução contendo carbonato de sódio, nitrato de amônia, ácido silicotungstênico, nitrato de prata e formaldeído, e finalizados com ácido acético 1% (NADIN et al., 2001; HININGER et al., 2004; ESPÍNDOLA et al., 2005). O comprimento total dos cometas foi mensurado em microscópio com lentes objetivas de 20 X, acoplado a uma câmera de vídeo e conectado a um sistema de análise de imagens. Cem células foram avaliadas em cada lâmina (Figura 2).



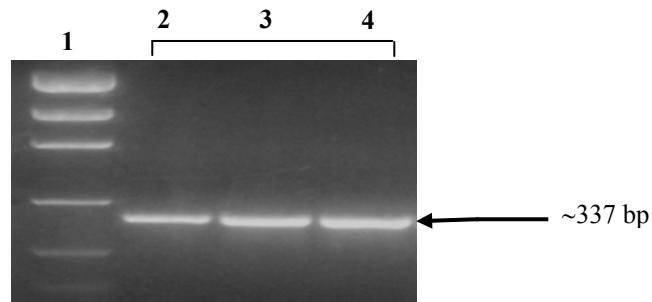
**Figura 2** – Mensuração do comprimento total dos cometas em  $\mu\text{m}$  (objetiva de 20X)

### 5.5.7. Determinação da glicemia

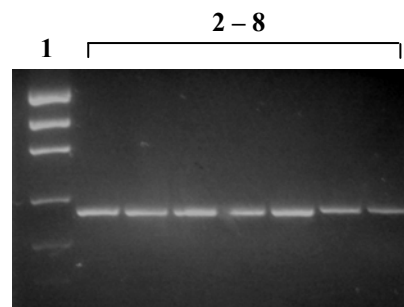
A glicemia de jejum das participantes foi avaliada com a utilização do kit ACCU-CHEK Advantage Pro (Roche<sup>®</sup>).

### 5.5.8. Determinação do polimorfismo Pro198Leu no gene da enzima GPx 1

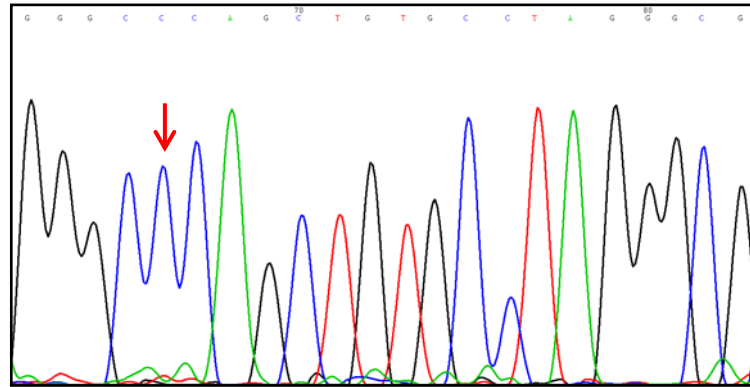
Isolaram-se amostras de DNA genômico a partir de sangue total, com a utilização do kit de extração *Illustra Blood genomicPrep Mini Spin* (GE Healthcare<sup>®</sup>) e as concentrações foram avaliadas em espectrofotômetro Nanodrop<sup>®</sup> ND1000. O DNA foi utilizado como molde para realização de amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizando-se os seguintes *primers* para produzir fragmentos de aproximadamente 337 pb: FORWARD = 5'-TGCCCCTACGCAGGTACA-3'; REVERSE: 5-TCCCAAATGACAATGACACAG-3', baseados na sequência do gene que codifica para a GPx1 humana (ISHIDA *et al.*, 1987) e flanqueando o polimorfismo Pro198Leu (HU, LI, DIAMOND, 2007). As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos; seguida de 30 ciclos a 95°C por 30 segundos, 58°C por 60 segundos e 72°C por 60 segundos; com extensão final a 72°C por 10 minutos. Cada amostra foi amplificada em triplicata de 25 µL cada. A mistura de PCR foi preparada com concentração final de cada primer de 0,4 µM (Invitrogen<sup>®</sup>), master mix 1X (Fermentas<sup>®</sup>), 13,5-45 ng de DNA genômico e água ultrapura para completar o volume. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com *GelRed* (Biotium<sup>®</sup>) e visualizados para confirmação da altura das bandas (Figura 3). Posteriormente, as amostras foram purificadas com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega<sup>®</sup>), quantificadas em gel de agarose a 2%, com a utilização do padrão *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen<sup>®</sup>) (Figura 4) e enviadas ao Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biologia da USP para sequenciamento. Estas reações foram realizadas de acordo com o protocolo do sistema de análise de *DNA MegaBACE 1000* (GE Healthcare<sup>®</sup>), utilizando o *DYEnamic ET Dye Terminator Kit* (com Thermo Sequenase<sup>™</sup> II DNA Polimerase) código US81090. As sequências foram analisadas pelo software *Sequence Analyser* utilizando o *Base Caller Cimarron 3.12* (Figuras 5, 6 e 7).



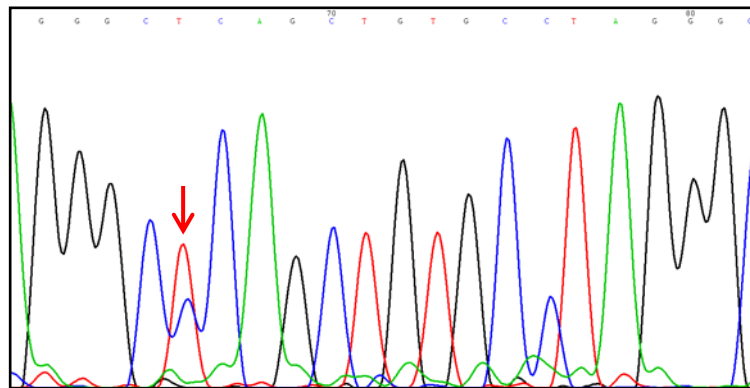
**Figura 3** – Amplificação de DNA genômico com *primers* flanquadores do polimorfismo Pro198Leu no gene que codifica para a enzima GPx1. Linha 1: Marcador de massa molecular (O'Gene Ruler – Fermentas<sup>®</sup>), Linhas 2, 3 e 4: produtos amplificados



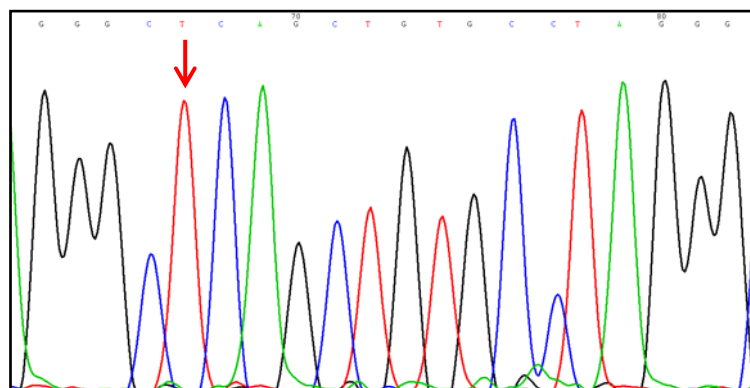
**Figura 4** – Quantificação dos produtos amplificados em gel de agarose 2%. Linha 1: Padrão de peso molecular (*Low DNA Mass Ladder* – Invitrogen<sup>®</sup>), Linhas 2 – 8: Amostras de DNA genômico amplificadas e purificadas. As intensidades das bandas, quando comparadas com aquelas do padrão de peso molecular, indicam a concentração de DNA amplificado



**Figura 5** – Eletroferograma parcial representativo do alelo Pro/Pro



**Figura 6** – Eletroferograma parcial representativo do alelo Pro/Leu



**Figura 7** – Eletroferograma parcial representativo do alelo Leu/Leu

### **5.6. Análise Estatística dos Dados**

A análise estatística foi realizada com o auxílio dos softwares Statistica versão 8.0 e SPSS versão 13.0. Inicialmente todos os dados foram classificados como variáveis dependentes considerando a população total do estudo em suas duas fases. Foram testadas a normalidade através do teste W de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade de variância, com o teste de Levene. Quando as variáveis apresentavam normalidade e homogeneidade utilizou-se o teste t de Student para amostras paramétricas e, em caso contrário, o teste não-paramétrico de Wilcoxon. Nesta etapa, foi verificado se havia diferenças significativas entre todas as variáveis nos períodos pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil. A seguir, os dados foram separados de acordo com os genótipos relativos ao polimorfismo Pro198Leu. Primeiramente indivíduos Pro/Leu e Leu/Leu foram agrupados devido ao número reduzido de homocigotos. A homogeneidade de variância foi testada por meio do teste de Brown-Forsythe. Nestes casos, as variáveis foram classificadas como independentes e ambos os testes t de Student e Mann-Whitney foram utilizados de acordo com a distribuição dos dados e a presença/ausência de homogeneidade de variâncias. Agrupados desta maneira, os dados foram testados na fase pré-suplementação, para verificar se havia diferenças entre os genótipos; e também a fase pós foi comparada à fase pré-suplementação entre os diferentes grupos de genótipos, para verificar os efeitos obtidos com a intervenção. Ainda, os dados também foram testados entre todos os genótipos, ou seja, Pro/Pro x Pro/Leu x Leu/Leu, com o teste de ANOVA ou Kruskal-Wallis em casos de variáveis paramétricas ou não-paramétricas, respectivamente. Correlações lineares de Pearson ou Spearman foram calculadas também de acordo com a presença/ausência de distribuição normal e homogeneidade de variância dos dados. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado por meio do teste Qui-Quadrado, com a utilização da calculadora para marcadores bialélicos (RODRIGUEZ, GAUNT, DAY, 2009).

O nível de significância de 5% foi adotado como padrão. Quando este nível apresentou-se entre 6-10%, os resultados foram considerados marginalmente significativos.

Com o objetivo de descrever a relação entre aspectos de consumo alimentar e características bioquímicas independente da ingestão de energia, os valores de ingestão de alguns nutrientes em ambas as fases foram ajustados ao valor energético. Este procedimento foi realizado de acordo com o método residual (JAIME et al., 2003). Para isto, os valores de ingestão destes nutrientes foram testados quanto a sua distribuição normal por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Foi determinada a correlação linear de Pearson para verificar se havia correlação estatisticamente significativa entre os valores de ingestão de cada nutriente e de energia. Em seguida realizaram-se testes de regressão linear simples, com a energia sendo considerada a variável independente e cada nutriente, as variáveis dependentes. Com os valores de  $\beta_0$  e  $\beta_1$  determinaram-se os valores dos nutrientes estimados, residuais, constantes e ajustados. Ao final, a média dos valores de ingestão destes nutrientes em suas formas ajustadas foi igual a média dos valores em suas formas brutas, e os desvios-padrão dos nutrientes ajustados foram reduzidos.

Os dados de ingestão de selênio referentes a fase pré-suplementação foram submetidos à adequação pelo método do ponto de corte da EAR (BEATON, 1994). Foi testada a distribuição normal dos dados com o teste de Kolmogorov-Smirnov. Quando as variáveis não apresentavam distribuição normal foram transformados em seus logaritmos naturais. A seguir, realizou-se o teste de One-Way ANOVA para determinar as variabilidades intra e interindividuais e a variância total da distribuição. Em seguida, realizou-se a remoção da variabilidade intraindividual e a distribuição do nutriente ajustado. Para determinar a prevalência de ingestões inadequadas comparou-se o valor obtido de “z” a uma tabela de distribuição normal padrão em que para cada valor de “z” há um valor de “P” correspondente, o qual determina a porcentagem de inadequação.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Caracterização da População do Estudo

#### 6.1.1. Estágio de vida e Índice de Massa Corpórea

O estudo foi finalizado com a participação de 37 voluntárias que apresentaram idade média ( $\pm$ DP) de  $34,5 \pm 6,8$  anos em ambas as fases pré e pós-suplementação. Os valores médios ( $\pm$ DP) de peso nas fases pré e pós-suplementação foram, respectivamente, de  $121,7 \pm 13,8$  kg e  $123,1 \pm 15,1$  kg. De acordo com o teste t de Student para amostras dependentes, houve diferença marginalmente significativa entre as duas fases ( $p < 0,08$ ). A média ( $\pm$ DP) de estatura foi  $1,60 \pm 0,1$  m em ambas as fases. A partir destes dados foram calculados os valores de IMC, os quais foram em média ( $\pm$ DP)  $45,2 \pm 4,2$  e  $45,7 \pm 4,3$  nas fases pré e pós-suplementação, respectivamente. A avaliação estatística deste parâmetro também revelou diferença marginalmente significativa entre as duas etapas ( $p < 0,09$ ). A tabela 1 mostra os valores de idade (anos), peso (kg), estatura (m) e IMC das voluntárias em ambas as fases.

**Tabela 1** – Características das participantes nas fases pré e pós – suplementação com castanha-do-brasil

Dados	Idade (anos)		Peso (kg)		Estatura (m)		IMC	
	Pré	Pós	Pré	Pós*	Pré	Pós	Pré	Pós**
<b>Média</b>	34,5	34,5	121,7	123,1	1,6	1,6	45,2	45,7
<b>Mediana</b>	35,5	35,0	120,3	121,1	1,7	1,7	44,7	46,3
<b>DP<sup>a</sup></b>	6,8	6,8	13,8	15,1	0,1	0,1	4,2	4,3
<b>CV<sup>b</sup></b>	19,6	19,6	11,4	12,3	4,3	4,3	9,2	9,5
<b>V mín<sup>c</sup></b>	20,0	20,0	98,6	100,0	1,5	1,5	36,4	37,5
<b>V máx<sup>d</sup></b>	46,0	46,0	146,7	151,8	1,8	1,8	52,0	53,5

\* diferença marginalmente significativa em relação a fase pré-suplementação, teste t de Student ( $p < 0,08$ )

\*\* diferença marginalmente significativa em relação a fase pré-suplementação, teste t de Student ( $p < 0,09$ )

1 – n = 37

a – DP: desvio padrão

b – CV: coeficiente de variação de Pearson

c – V mín: valor mínimo

d – V máx: valor máximo

### 6.2. Análise centesimal e de selênio nas castanhas-do-brasil

A composição centesimal e a concentração de selênio foram determinadas em uma amostra aleatória de castanhas-do-brasil antes do início do período de intervenção. A contribuição de cada macronutriente em relação ao valor calórico total das castanhas foi de 5,0%, 8,3% e 86,8% para carboidratos, proteínas e lipídeos, respectivamente. A concentração média ( $\pm$ DP) de selênio por grama de castanha foi de  $58,1 \pm 3,0 \mu\text{g}$ . Cada castanha de tamanho médio pesava cerca de 5 gramas, resultando em uma quantidade de aproximadamente 290,5  $\mu\text{g}$  de selênio em cada unidade (Tabela 2).

**Tabela 2** – Composição centesimal e concentração de selênio determinadas nas castanhas-do-brasil utilizadas na intervenção

Nutrientes	Média $\pm$ DP	Calorias – (%)	Calorias/unidade
<b>Carboidratos (g)</b>	9,15	36,6 (5,0)	1,8
<b>Proteínas (g)</b>	15,14 $\pm$ 1,16	60,6 (8,3)	3,0
<b>Lipídeos (g)</b>	70,71 $\pm$ 0,29	636,4 (86,8)	31,8
<b>Umidade (%)</b>	1,8 $\pm$ 0,19	-x-	-x-
<b>Cinzas (%)</b>	3,20 $\pm$ 0,05	-x-	-x-
<b>Selênio (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>	58,1 $\pm$ 3,0	-x-	-x-
<b>Selênio / 5 g (1 unidade) [<math>\mu\text{g}</math>]</b>	290,5		

### 6.3. Avaliação do Consumo Alimentar

Para avaliar a adequação na ingestão de macronutrientes, de selênio e de outros micronutrientes como vitaminas E e C, zinco, cobre, manganês, ácidos graxos monossaturados, poliinsaturados e saturados, as participantes do estudo preencheram registros alimentares de três dias, incluindo um dia de final de semana tanto na fase pré quanto na pós-suplementação.



A adesão das participantes ao preenchimento dos registros foi de 100% nas duas fases do estudo.

A tabela 3 mostra os resultados referentes à ingestão de macronutrientes, energia e ácidos graxos nas duas fases da pesquisa, calculados com o software NutWin. Os valores de ingestão de ácidos graxos monosaturados, poliinsaturados e saturados foram ajustados pelo valor de energia total, pois as variáveis apresentaram correlação significativa. Na tabela 4 estão descritos os valores de ingestão de selênio, vitamina C, vitamina E, zinco, cobre e manganês antes e após a suplementação. Os valores de ingestão de selênio, vitamina E, zinco e manganês também apresentaram correlação com a ingestão energética e, foram, portanto, ajustados em relação a este valor.

**Tabela 3** – Distribuição de energia, macronutrientes, ácidos graxos monosaturados, poliinsaturados e saturados, calculada através dos registros alimentares preenchidos nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil

Dados	Energia (kcal)		Carboidratos (%)		Proteínas (%)		Lipídeos (%)		AGM* (g/dia) (%) <sup>§</sup>		AGP* (g/dia) (%) <sup>§</sup>		AGS* (g/dia) (%) <sup>§</sup>	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós†	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
<b>Média</b>	2391,5	2287,5	52,7	51,0	15,7	18,0	31,6	31,0	27,9 (10,3)	28,3 (10,5)	15,6 (5,7)	14,2 (5,3)	26,1 (9,7)	26,9 (10,1)
<b>Mediana</b>	2443,2	2327,4	53,1	50,6	15,0	17,3	32,2	30,7	29,2	28,4	15,4	15,0	26,1	27,8
<b>DP<sup>a</sup></b>	727,3	957,7	6,8	7,3	3,5	4,1	6,4	6,5	7,4	7,2	5,3	4,7	7,2	7,1
<b>CV<sup>b</sup></b>	30,4	41,9	13,0	14,3	22,1	22,8	20,3	21,0	26,7	25,4	33,9	33,0	27,7	26,2
<b>V mín<sup>c</sup></b>	1326,1	930,2	34,9	38,3	8,7	12,4	19,2	20,0	6,6	13,2	5,5	1,5	5,6	13,3
<b>V máx<sup>d</sup></b>	4137,4	5411,6	64,0	66,5	25,4	28,1	44,2	45,3	43,5	49,2	32,7	23,4	40,1	39,9

AGM: ácidos graxos monosaturados; AGP: ácidos graxos poliinsaturados; AGS: ácidos graxos saturados.

\* valores ajustados pela energia

<sup>§</sup> Valores em relação a porcentagem total de lipídeos

† diferença estatisticamente significativa em relação a fase pré-suplementação, teste t de Student (p<0,01)

l – n = 37

a – DP: desvio padrão

b – CV: coeficiente de variação

c – V mín: valor mínimo

d – V máx: valor máximo

**Tabela 4** – Valores de ingestão de selênio, vitamina C e E, zinco, cobre e manganês, calculados através dos registros alimentares preenchidos nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil

Dados	Selênio*		Vit. C		Vit. E*		Zinco*		Cobre		Manganês*	
	(µg/dia)		(mg/dia)		(mg/dia)		(mg/dia)		(mg/dia)		(mg/dia)	
Fases <sup>1</sup>	Pré	Pós§	Pré	Pós	Pré	Pós†	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
<b>Média</b>	41,8	335,2	99,7	87,9	10,3	7,8	10,9	11,6	1,3	1,3	2,5	2,5
<b>Mediana</b>	38,5	336,0	74,4	59,7	9,8	7,2	10,5	11,6	1,1	1,2	2,5	2,6
<b>DP<sup>a</sup></b>	12,2	12,8	73,6	67,4	5,9	3,1	2,6	2,6	0,5	0,6	1,0	0,8
<b>CV<sup>b</sup></b>	29,1	3,8	73,9	76,7	57,2	39,5	24,1	22,3	39,8	48,0	39,0	33,8
<b>V mín<sup>c</sup></b>	23,7	312,6	19,2	8,0	0,1	2,2	6,2	6,0	0,5	0,5	1,0	0,5
<b>V máx<sup>d</sup></b>	81,9	365,7	318,9	275,3	31,6	17,6	17,1	16,5	3,2	3,3	5,1	4,3

\* valores ajustados pela energia

§ diferença estatisticamente significativa em relação a fase pré-suplementação, teste t de Student (p=0,00)

† diferença estatisticamente significativa em relação a fase pré-suplementação, teste t de Student (p<0,04)

1 – n = 37

a – DP: desvio padrão

b – CV: coeficiente de variação

c – V mín: valor mínimo

d – V máx: valor máximo

Nas tabelas 5 e 6 estão descritos os valores referentes a ingestão de carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos graxos monosaturados, poliinsaturados e saturados; selênio, vitaminas C e E, zinco, cobre e manganês, separados de acordo com cada grupo de genótipo.

**Tabela 5** – Valores de ingestão de carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos graxos monosaturados, poliinsaturados e saturados, separados de acordos com os genótipos e calculados através dos registros alimentares preenchidos nas fases pré e pós-suplementação.

Dados	Carboidratos		Proteínas		Lipídeos		AGM*		AGP*		AGS*	
	(%)		(%)		(%)		(g/dia)		(g/dia)		(g/dia)	
Genótipos/ Fases <sup>1</sup>	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
Pro/Pro	51,7 (7,9)	50,3 (6,8)	16,5 (4,1)	17,0 (3,6)	31,8 (6,7)	32,7 (6,2)	28,8 (7,8)	28,7 (8,0)	16,4 (6,2)	15,6 (4,4)	26,4 (5,7)	28,5 (7,1)
Pro/Leu	52,7 (5,9)	50,4 (8,7)	15,1 (2,4)	18,0 <sup>†</sup> (3,9)	32,2 (5,9)	31,6 (6,3)	26,5 (7,8)	27,9 (7,3)	13,9 (3,9)	12,1 (4,9)	26,3 (9,5)	25,3 (7,8)
Leu/Leu	56,0 (4,8)	54,8 (3,8)	14,7 (3,5)	21,8 <sup>§‡</sup> (5,1)	29,3 (7,8)	23,4 <sup>¶</sup> (2,4)	28,6 (5,4)	27,4 (3,8)	17,1 (4,9)	14,7 (3,7)	24,5 (5,6)	25,9 (3,8)

AGM: ácidos graxos monosaturados; AGP: ácidos graxos poliinsaturados; AGS: ácidos graxos saturados.

\* valores ajustados pela energia

<sup>†</sup> diferença estatisticamente significativa em relação a fase pré-suplementação, teste t de Student (p<0,01)

<sup>§</sup> diferença marginalmente significativa em relação a fase pré-suplementação, teste t de Student (p<0,08)

<sup>‡</sup> diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos Pro/Pro e Pro/Leu, ANOVA seguida de Duncan (p<0,02 e p<0,05, respectivamente)

<sup>¶</sup> diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos Pro/Pro e Pro/Leu, ANOVA seguida de Tukey (p<0,02 e p<0,04, respectivamente).

**Tabela 6** – Valores de ingestão de selênio, vitaminas C e E, zinco, cobre e manganês, separados de acordo com o genótipo calculados através dos registros alimentares preenchidos nas fases pré e pós-suplementação

Dados	Selênio*		Vit. C		Vit. E*		Zinco*		Cobre		Manganês*	
	(µg/dia)		(mg/dia)		(mg/dia)		(mg/dia)		(mg/dia)		(mg/dia)	
Genótipos/ Fases <sup>1</sup>	Pré	Pós <sup>§</sup>	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
Pro/Pro	44,4 (14,2)	332,8 (12,7)	98,5 (82,9)	92,3 (76,2)	10,5 (6,3)	7,7 (3,0)	11,0 (2,9)	10,5 (2,1)	1,1 (0,4)	1,3 (0,7)	2,5 (1,0)	2,3 (0,7)
Pro/Leu	38,0 (10,3)	338,8 (10,4)	86,7 (58,3)	73,5 (49,2)	9,3 (5,7)	8,2 (3,6)	11,0 (2,7)	12,4 (2,7)	1,4 (0,6)	1,5 (0,7)	2,7 (1,1)	2,5 (1,0)
Leu/Leu	43,1 (7,0)	333,8 (19,0)	140 (76,9)	112,6 (82,5)	12,8 (5,3)	6,9 <sup>**</sup> (1,7)	10,0 (1,2)	13,2 <sup>†‡</sup> (2,5)	1,3 (0,4)	1,0 (0,4)	2,3 (0,5)	3,2 <sup>¶</sup> (0,4)

\* valores ajustados pela energia

<sup>§</sup> diferença estatisticamente significativa em relação a fase pré-suplementação, teste t de Student (p=0,00)

<sup>\*\*</sup> diferença estatisticamente significativa em relação a fase pré-suplementação, teste t de Student (p<0,03)

<sup>†</sup> diferença estatisticamente significativa em relação a fase pré-suplementação, teste t de Student (p<0,04)

<sup>‡</sup> diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Pro/Pro, ANOVA seguida de Duncan (p<0,04)

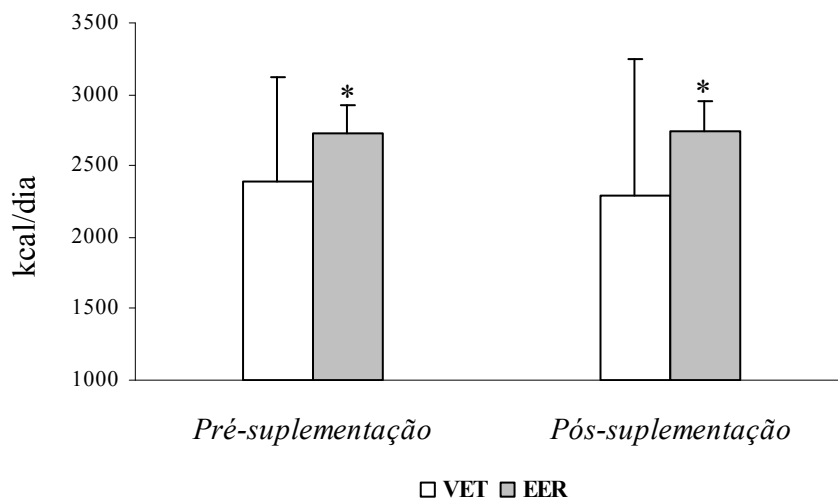
<sup>¶</sup> diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos Pro/Pro e Pro/Leu, ANOVA seguida de Duncan (p<0,02 e p<0,05, respectivamente).

### 6.3.1. Valor Energético Total (VET)

Os valores médios ( $\pm$ DP) de VET dos registros alimentares preenchidos antes e após a suplementação com castanhas-do-brasil foram, respectivamente,  $2.391,5 \pm 727,3$  e  $2.287,5 \pm 957,7$  kcal (Figura 8).

De acordo com o *Institute of Medicine*, a EER (*Necessidade Estimada de Energia*) pode ser determinada por meio da fórmula: **EER (kcal) = 354,1 – (6,91 x idade [a]) + coeficiente de atividade física x (9,36 x peso [kg] + 726 x estatura [m])**. Diferentes equações foram desenvolvidas para indivíduos com peso normal e para aqueles com sobrepeso, porém, devido ao fato destas serem relativamente semelhantes, recomenda-se que a equação para indivíduos de peso normal seja utilizada para todos os indivíduos (IOM, 2003).

Aplicando esta fórmula aos dados obtidos das participantes da pesquisa, obtiveram-se os valores de 2.725,9 kcal/dia na fase pré e de 2.740,5 kcal/dia na fase pós-suplementação. Para estes cálculos foi utilizado um coeficiente de atividade física de 1.12, considerado baixo. Comparando-se os valores obtidos através dos registros alimentares com os valores de EER, verificou-se diferença estatisticamente significativa entre as médias ( $p < 0,01$ ). Entretanto, não houve diferença significativa entre os valores médios de ingestão de energia entre ambas as fases do estudo (Figura 8).



**Figura 8** – Valores médios de energia total obtidos dos registros alimentares e de EER calculados de acordo com o recomendado pelo IOM (2003), nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil. (\*) significativamente diferente em relação ao VET.

### 6.3.2. Contribuição de carboidratos, proteínas e lipídeos em relação ao VET e ingestão de ácidos graxos monossaturados, poliinsaturados e saturados

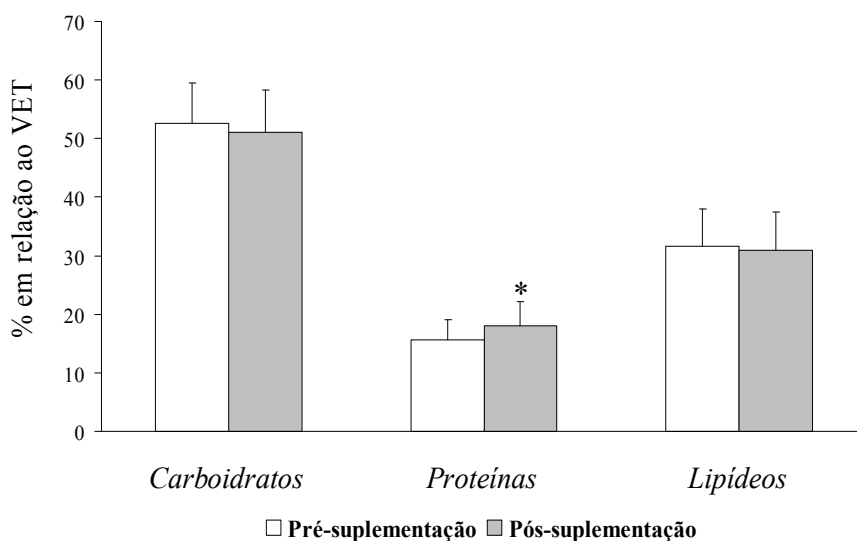
Os percentuais de consumo de carboidratos, proteínas e lipídeos em relação ao VET antes e após a suplementação com castanha-do-brasil foram de 52,7 e 51%; 15,7 e 18,0%; e 31,6 e 31,0%, respectivamente (Figura 9). Todos os valores estavam adequados às referências preconizadas pelo IOM, ou seja, 45 a 65% do VET para carboidratos, 10 a 35% para proteínas e, 20 a 35% para lipídeos. Houve diferença estatisticamente significativa entre as duas fases apenas para os valores médios de proteínas ( $p < 0,01$ ).

Ácidos graxos monossaturados responderam por  $10,3 \pm 2,9\%$  do percentual total de lipídeos na fase pré e por  $10,5 \pm 3,0\%$ , na fase pós-suplementação. Estes valores para os ácidos graxos poliinsaturados foram de  $5,7 \pm 2,0\%$  e de  $5,3 \pm 1,8\%$  antes e após a suplementação, respectivamente. Já o percentual médio de ingestão de ácidos graxos saturados em relação a quantidade de lipídeos totais foi de  $9,7 \pm 2,7\%$  e  $10,1 \pm 2,9\%$  nas fases

pré e pós-suplementação, respectivamente. Não houve diferenças significativas entre as duas fases. A Organização Mundial da Saúde (2003) recomenda que estes percentuais sejam menores do que 10% para ácidos graxos saturados, entre 6 e 10% para ácidos graxos poliinsaturados e, o restante, calculado por diferença, para ácidos graxos monosaturados.

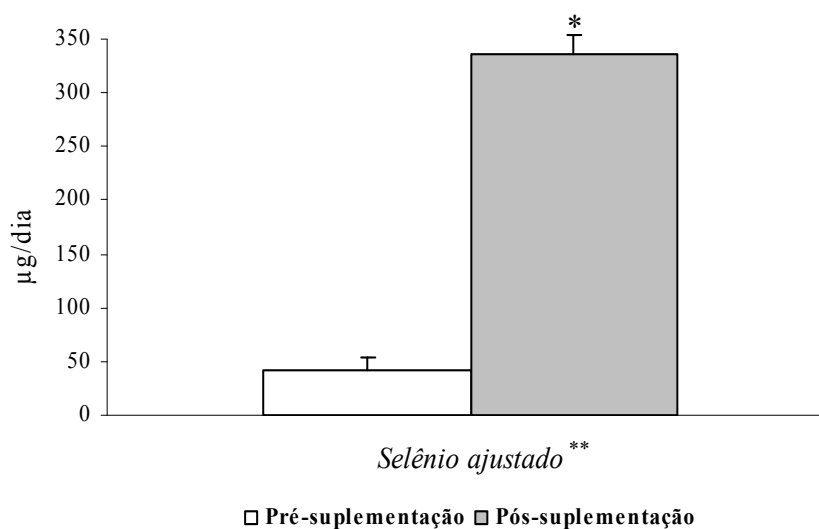
### 6.3.3. Ingestão de selênio, vitaminas C e E, zinco, cobre e manganês

Os valores médios ( $\pm$ DP) de ingestão de selênio ajustados para a energia foram de  $41,9 \pm 12,2$  e  $335,2 \pm 12,8$   $\mu\text{g}/\text{dia}$  ( $p=0,00$ ), nas fases pré e pós-suplementação, respectivamente (Figura 10). A partir dos valores ajustados pela energia foi calculada a prevalência de ingestões inadequadas na fase pré-suplementação, a qual foi de 60%. Caso as variações intraindividuais não fossem excluídas, esse valor seria de 56%. Não houve diferenças no consumo de vitamina C nas fases pré e pós-suplementação tanto na avaliação geral quanto quando os dados foram separados de acordo com os genótipos. Com relação à vitamina E, a ingestão na fase pós-suplementação foi significativamente menor em relação a fase pré-suplementação ( $p<0,04$ ). Quando a avaliação foi realizada de acordo com o genótipo, esta diferença ocorreu apenas no grupo Leu/Leu ( $p<0,03$ ). A avaliação da ingestão dos minerais zinco, cobre e manganês, quando realizada com todas as participantes agrupadas não revelou diferenças após o consumo das castanhas. No caso do zinco, houve um aumento na ingestão na fase pós-suplementação apenas no grupo Leu/Leu ( $p<0,04$ ). O consumo deste grupo foi também diferente daquele do grupo Pro/Pro após a ingestão da suplementação ( $p<0,04$ ). Já com relação a ingestão de manganês, houve diferenças apenas entre os grupos de genótipos, sendo que naquelas Leu/Leu a ingestão deste mineral foi superior em relação ao grupo Pro/Pro ( $p<0,02$ ) e ao grupo Pro/Leu ( $p<0,05$ ) na fase pós-suplementação.



**Figura 9** – Valores médios de consumo de carboidratos, proteínas e lipídeos (%) em relação ao VET obtidos dos registros alimentares nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil.

(\*) significativamente diferente em relação a fase pré-suplementação.



**Figura 10** – Valores médios de consumo de selênio (µg/dia) obtidos dos registros alimentares nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil e ajustados em relação ao VET.

(\*) significativamente diferente em relação a fase pré-suplementação.

(\*\*) os valores de ingestão de selênio foram ajustados aos de energia, uma vez que houve correlação positiva entre estas variáveis.

#### 6.4. Determinação do polimorfismo Pro198Leu no gene da GPx1

Dentre as 37 participantes do estudo, 18 apresentaram genótipo selvagem, ou seja, eram homozigotas para prolina; 14 apresentaram o genótipo heterozigoto prolina/leucina; e 5 eram carreadoras de dois alelos variantes, ou seja, eram homozigotas para leucina. Estes dados estão demonstrados na tabela 7. A prevalência dos genótipos nesta subpopulação estava de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, o qual se refere ao princípio do equilíbrio gênico, ou seja, se nenhum fator evolutivo ocorrer em uma população, as frequências alélicas permanecerão constantes ao passar das gerações. As frequências observadas foram aquelas citadas acima, e as esperadas foram 16,9; 16,2 e 3,9; com uma frequência de variação alélica de 0,32 ( $X^2=0,69$ ;  $p=0,4$ ).

**Tabela 7** – Distribuição do polimorfismo Pro198Leu no gene que codifica para a GPx1 entre mulheres obesas mórbidas submetidas a suplementação com castanha-do-brasil

Genótipos – códon 198 da GPx1	n (%)
Pro/Pro	18 (48,7%)
Pro/Leu	14 (37,8%)
Leu/Leu	5 (13,5%)

Inicialmente os dados bioquímicos foram avaliados apenas considerando as mudanças observadas na fase pós em relação a fase pré-suplementação. Posteriormente, os dados também foram analisados separadamente entre cada genótipo, para observar os efeitos da presença de um ou dois alelos variantes sobre as concentrações dos diversos parâmetros avaliados na fase pré-suplementação isoladamente, e também entre as duas fases. A seguir serão apresentados todos os resultados.



### **6.5. Indicadores Bioquímicos**

A tabela 8 resume os resultados referentes às concentrações de selênio no plasma, eritrócitos e unhas, da atividade eritrocitária total da GPx, das concentrações de TBARS no plasma e de 8-isoprostanos na urina, dos comprimentos dos cometas no sangue total e da glicemia, em ambas as fases da pesquisa. A tabela 9 refere-se às concentrações séricas de colesterol total e frações também nas duas etapas do estudo.

A tabela 10 demonstra as concentrações médias ( $\pm$ DP) de selênio no plasma e eritrócitos, atividade eritrocitária da GPx e de glicemia nas fases pré e pós-suplementação, separados por genótipos. A tabela 11 resume os valores médios ( $\pm$ DP) de TBARS plasmático e dos tamanhos dos cometas também em ambas as fases do estudo e separadas de acordo com os genótipos. Por fim, a tabela 12 mostra os valores médios ( $\pm$ DP) das concentrações séricas de colesterol total e frações nas fases pré e pós-suplementação, separados por genótipos.

**Tabela 8** – Concentrações de selênio (Se) no plasma, eritrócitos e unhas; atividade eritrocitária total da GPx; concentrações de TBARS no plasma; tamanho dos cometas e glicemia nas fases pré e pós-suplementação.

Dados	Se no plasma (µg/L)		Se nos eritrócitos (µg/L)		Se nas unhas (µg/g)		GPx eritrocitária (U/gHb)		TBARS no plasma (µmol/L)		8-isoprostanos (ng/mmol creat.)		Tamanho dos cometas (µm)		Glicemia (mg/dL)	
	Pré	Pós*	Pré	Pós*	Mãos/ Pés	Hálux	Pré	Pós†	Pré	Pós†	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
<b>Média</b>	55,7	132,5	60,5	205,9	0,3	0,4	36,6	53,6	5,0	7,6	25,1	21,8	77,3	72,2	110,4	108,2
<b>Mediana</b>	57,1	124,9	60,9	200,2	0,3	0,3	36,1	47,9	5,2	7,5	22,2	15,4	72,5	62,0	105,0	104,0
<b>DP<sup>a</sup></b>	13,3	34,9	22,6	42,0	0,1	0,2	17,1	20,4	3,7	3,3	14,2	15,6	21,6	28,1	18,8	20,9
<b>V mín<sup>b</sup></b>	27,2	60,6	23,6	134,4	0,2	0,1	7,7	24,6	1,3	3,2	2,6	5,1	42,1	44,9	87,0	78,0
<b>V máx<sup>c</sup></b>	77,5	234,9	150,6	347,5	0,5	0,9	95,6	127,4	22,1	13,3	74,1	75,0	137,9	159,6	168,0	191,0
<b>CV<sup>d</sup></b>	23,9	26,4	37,3	20,4	23,2	45,7	46,7	38,1	75,6	43,9	56,5	71,7	27,9	38,9	17,0	19,3

\* diferença estatisticamente significativa em relação a fase pré-suplementação. teste de Wilcoxon (p=0,00)

† diferença estatisticamente significativa em relação a fase pré-suplementação. teste t de Student (p=0,00)

1 – n = 37

2 – concentração de selênio: unhas das mãos/pés n = 36; hálux n = 34

a – DP: desvio padrão

b – CV: coeficiente de variação

c – V mín: valor mínimo

d – V máx: valor máximo

Valores de referência:

Selênio no plasma: 53 – 109 µg/L (Alegria et al., 1996); 70 µg/L (Nève, 1995); >84-100 µg/L (Thomson, 2004)

Selênio nos eritrócitos: 60 – 120 µg/L (Ortuño, 1997); 149 – 250 µg/L (Pleban et al., 1982)

Glutathione peroxidase eritrocitária: 27,5 – 73,6 U/gHb (indicado no kit de determinação)

8-isoprostanos: 10 – 50 ng/mmol de creatinina (indicado no kit de determinação)

Glicemia: níveis desejáveis = ≤ 100 mg/dL (Sociedade Brasileira de Cardiologia)

**Tabela 9** – Concentrações séricas de colesterol total e frações nas fases pré e pós – suplementação

Dados	COL Total (mg/dL)		HDL-c (mg/dL)		VLDL-c (mg/dL)		LDL-c (mg/dL)		TAG (mg/dL)	
	Pré	Pós	Pré	Pós*	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
<b>Fases<sup>1</sup></b>										
<b>Média</b>	171,0	175,5	37,6	44,5	19,6	21,7	114,0	109,3	110,3	108,6
<b>Mediana</b>	167,0	174,0	35,0	41,0	18,0	21,0	111,0	109,0	91,0	105,0
<b>DP<sup>a</sup></b>	27,8	26,6	13,6	13,4	9,4	8,3	29,6	22,8	87,9	41,5
<b>V mín<sup>b</sup></b>	123,0	122,0	15,0	27,0	4,0	8,0	52,0	57,0	21,0	41,0
<b>V máx<sup>c</sup></b>	223,0	231,0	75,0	78,0	40,0	45,0	168,0	154,0	553,0	223,0
<b>CV<sup>d</sup></b>	16,2	15,2	36,1	30,1	47,9	38,3	26,0	20,9	79,7	38,2

\* diferença estatisticamente significativa em relação a fase pré-suplementação. teste t de Student ( $p < 0,00001$ )

1 – n=37

a – DP: desvio padrão

b – V mín: valor mínimo

c – V máx: valor máximo

d – CV: coeficiente de variação

Valores desejáveis: Colesterol total (<190 mg/dL); HDL-c (>50 mg/dL); LDL-c (<160 mg/dL); Triacilgliceróis (TAG) (<150 mg/dL). Fonte: Sociedade Brasileira de Cardiologia.

**Tabela 10** – Valores médios ( $\pm$ DP) de selênio no plasma e eritrócitos, da atividade eritrocitária da GPx e de glicemia nas fases pré e pós-suplementação, separados por genótipos

Dados	Se no plasma ( $\mu$ g/L)		Se nos eritrócitos ( $\mu$ g/L)		GPx eritrocitária (U/gHb)		Glicemia (mg/dL)	
	Pré	Pós*	Pré	Pós*	Pré	Pós*	Pré	Pós
<b>Genótipos/ Fases<sup>1</sup></b>								
<b>Pro/Pro</b>	54,0 (12,1)	126,6 (21,3)	60,8 (18,5)	200,8 (33,1)	38,5 (18,0)	57,4 (21,5)	107,8 (15,5)	107,0 (14,2)
<b>Pro/Leu</b>	55,2 (14,0)	134,4 (40,4)	65,0 (37,6)	207,3 (39,5)	33,0 (12,4)	51,7 (19,7)	108,5 (19,1)	107,3 (27,6)
<b>Leu/Leu</b>	62,7 (16,0)	148,3 (45,0)	59,7 (23,1)	220,1 (76,0)	31,4 (19,6)	45,2 (19,1)	125,4 (25,6)	115,0 (22,7)

\* diferença estatisticamente significativa em relação a fase pré-suplementação:

Selênio no plasma: teste de Wilcoxon; Pro/Pro e Pro/Leu ( $p < 0,001$ ); Leu/Leu ( $p < 0,05$ )

Selênio nos eritrócitos: teste t de Student; Pro/Pro e Pro/Leu ( $p = 0,00$ ); Leu/Leu ( $p < 0,05$ )

GPx eritrocitária: teste t de Student; Pro/Pro ( $p = 0,00$ ); Pro/Leu ( $p < 0,00001$ ); Leu/Leu ( $p < 0,001$ )

1 – n = Pro/Pro (18); Pro/Leu (14); Leu/Leu (5)

**Tabela 11** – Valores médios ( $\pm$ DP) de TBARS plasmático e dos comprimentos dos cometas nas fases pré e pós-suplementação, separados por genótipos

Dados	TBARS no plasma ( $\mu\text{mol/L}$ )		8-isoprostanos (ng/mmol creatinina)		Tamanho dos cometas ( $\mu\text{m}$ )	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
<b>Pro/Pro</b>	5,1 $\pm$ 2,3	8,3 $\pm$ 3,0*	22,4 $\pm$ 10,6	22,3 $\pm$ 19,2	80,8 $\pm$ 18,5	64,2 $\pm$ 16,4*
<b>Pro/Leu</b>	5,4 $\pm$ 5,4	7,0 $\pm$ 3,6 <sup>‡</sup>	26,1 $\pm$ 14,0	22,9 $\pm$ 13,0	67,6 $\pm$ 24,3	68,5 $\pm$ 21,7
<b>Leu/Leu</b>	3,3 $\pm$ 2,3	7,4 $\pm$ 3,9 <sup>§</sup>	32,0 $\pm$ 24,5	16,8 $\pm$ 7,2	92,1 $\pm$ 12,8	111,4 $\pm$ 46,3 <sup>‡</sup>

\* diferença estatisticamente significativa em relação a fase pré-suplementação:

TBARS no plasma: teste t de Student ( $p < 0,00001$ )

Tamanho dos cometas ( $\mu\text{m}$ ): teste t de Student ( $p < 0,005$ )

<sup>‡</sup> diferença estatisticamente significativa em relação a fase pré-suplementação, teste de Wilcoxon ( $p < 0,02$ )

<sup>§</sup> diferença estatisticamente significativa em relação a fase pré-suplementação, teste de Wilcoxon ( $p < 0,05$ )

<sup>‡</sup> diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Pro/Pro, teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ )

1 – n = Pro/Pro (18); Pro/Leu (14); Leu/Leu (5)

**Tabela 12** – Valores médios ( $\pm$ DP) de colesterol sérico total e frações nas fases pré e pós-suplementação, separados por genótipos

Dados	COL Total (mg/dL)		HDL-c (mg/dL)		VLDL-c (mg/dL)		LDL-c (mg/dL)		TAG (mg/dL)	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
<b>Pro/Pro</b>	173,2 (23,8)	178,3 (24,9)	40,2 (16,0)	44,8* (15,6)	25,2 (23,0)	22,3 (7,8)	113,5 (29,4)	111,2 (20,1)	126,1 (114,6)	112,3 (39,0)
<b>Pro/Leu</b>	160,2 (28,7)	168,7 <sup>†</sup> (26,3)	34,1 (9,7)	43,6* (10,2)	17,4 (10,1)	20,1 (7,8)	108,7 (31,8)	105,0 (27,3)	86,6 (50,7)	100,3 (38,8)
<b>Leu/Leu</b>	193,0 (28,4)	184,2 (34,5)	38,4 (13,9)	45,8 <sup>§</sup> (15,1)	24,2 (9,4)	23,8 (12,3)	130,4 (22,6)	114,6 (20,6)	119,8 (46,5)	118,4 (61,2)

\* diferença estatisticamente significativa em relação a fase pré-suplementação, teste t de Student:

HDL-c: Pro/Pro ( $p < 0,04$ ); Pro/Leu ( $p < 0,0001$ )

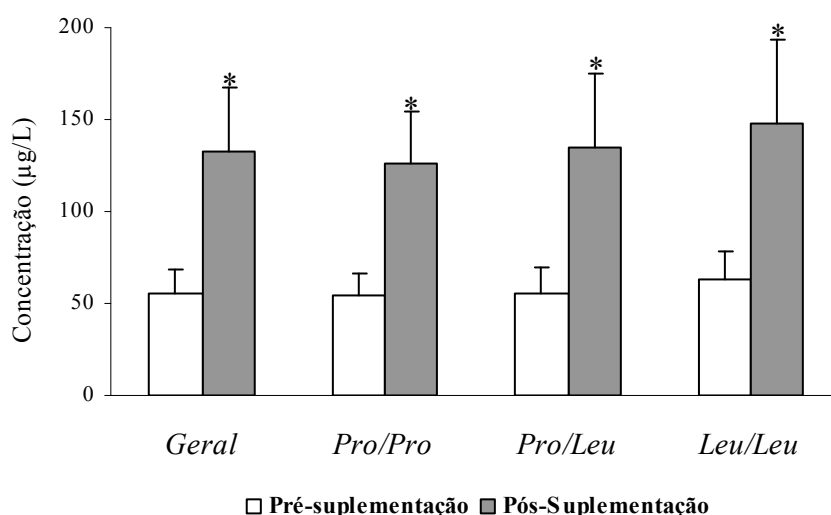
<sup>†</sup> diferença estatisticamente significativa em relação a fase pré-suplementação ( $p < 0,01$ )

<sup>§</sup> diferença marginalmente significativa em relação a fase pré-suplementação ( $p < 0,09$ )

1 – n = Pro/Pro (18); Pro/Leu (14); Leu/Leu (5)

### 6.5.1. Concentrações de selênio no plasma

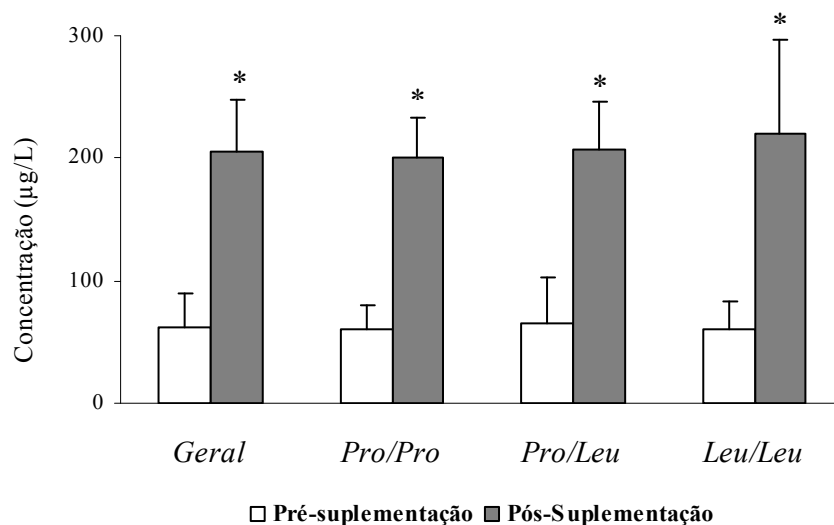
Na fase pré-suplementação, a concentração média ( $\pm$ DP) de selênio no plasma das participantes do estudo foi de  $55,7 \pm 13,3 \mu\text{g/L}$  e, após o consumo de uma unidade de castanha-do-brasil ao dia, este valor aumentou para  $132,5 \pm 34,9 \mu\text{g/L}$  ( $p=0,00$ ). Quando os valores foram separados de acordo com os genótipos, as concentrações médias ( $\pm$ DP) foram de  $54,0 \pm 12,1$  e  $126,6 \pm 21,3 \mu\text{g/L}$  ( $p<0,001$ ) para as voluntárias com genótipo Pro/Pro; de  $55,2 \pm 14,0$  e  $134,4 \pm 40,4 \mu\text{g/L}$  ( $p<0,001$ ) para aquelas Pro/Leu; e  $62,7 \pm 16,0$  e  $148,3 \pm 45,0 \mu\text{g/L}$  ( $p<0,05$ ) para as Leu/Leu. De acordo com os testes de diferenças de médias realizados, houve diferença estatisticamente significativa na fase pós em relação a fase pré-suplementação e quando as participantes foram separadas de acordo com os genótipos, esta diferença se manteve entre os grupos. Não houve diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de selênio no plasma entre os diferentes genótipos na fase pré-suplementação e também após a suplementação. A figura 11 ilustra graficamente estes dados.



**Figura 11** – Concentrações de selênio no plasma nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil; dados gerais e separados por genótipo.  
(\*) significativamente diferente em relação a fase pré-suplementação.

### 6.5.2. Concentrações de selênio nos eritrócitos

As concentrações médias ( $\pm$ DP) de selênio nos eritrócitos nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil foram, respectivamente, de  $60,5 \pm 22,6$  e  $205,9 \pm 42,0$   $\mu\text{g/L}$  ( $p=0,00$ ). Após a separação dos dados de acordo com os genótipos, estes valores foram de  $60,8 \pm 18,5$  e  $200,8 \pm 33,1$   $\mu\text{g/L}$  ( $p=0,00$ ) para o grupo Pro/Pro; de  $65,0 \pm 37,6$  e  $207,3 \pm 39,5$   $\mu\text{g/L}$  ( $p=0,00$ ) para o genótipo Pro/Leu; e de  $59,7 \pm 23,1$  e  $220,1 \pm 76,0$   $\mu\text{g/L}$  ( $p<0,05$ ) para o grupo Leu/Leu. Houve diferença estatisticamente significativa entre as fases pré e pós-suplementação e também quando os dados foram separados de acordo com os genótipos. Entretanto, não houve diferenças entre os genótipos. Estes dados estão demonstrados na figura 12.

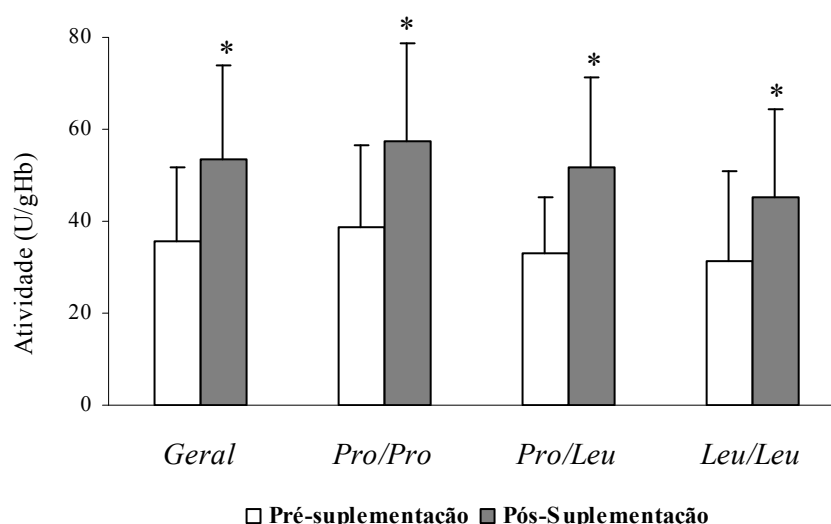


**Figura 12** – Concentrações de selênio nos eritrócitos nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil; dados gerais e separados por genótipo.

(\*) significativamente diferente em relação a fase pré-suplementação.

### 6.5.3. Atividade eritrocitária total da GPx

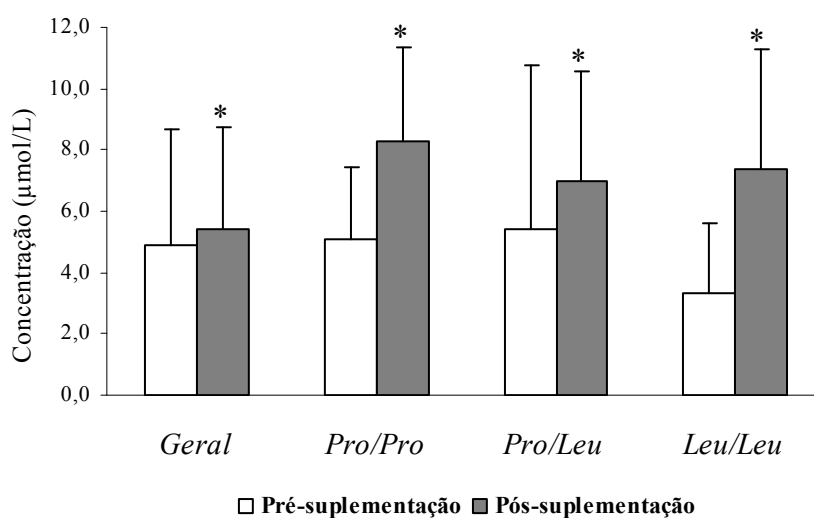
Os valores médios ( $\pm$ DP) de atividade total da GPx nos eritrócitos foram de  $36,6 \pm 17,1$  e  $53,6 \pm 20,4$  U/gHb ( $p=0,00$ ) nas fases pré e pós-suplementação, respectivamente. Quando separados de acordo com o perfil dos genótipos, os valores foram de  $38,5 \pm 18,0$  e  $57,4 \pm 21,5$  U/gHb ( $p=0,00$ ) para Pro/Pro; de  $33,0 \pm 12,4$  e  $51,7 \pm 19,7$  U/gHb ( $p<0,00001$ ) para Pro/Leu; e de  $31,4 \pm 19,6$  e  $45,2 \pm 19,1$  U/gHb ( $p<0,001$ ) para Leu/Leu. Diferenças estatisticamente significativas ocorreram entre as fases pré e pós-suplementação e também entre os dados separados de acordo com os genótipos. Quando os dados separados por genótipos foram testados em suas formas brutas, não houve diferenças entre os três grupos e também quando o grupo Leu/Leu foi agrupado ao grupo Pro/Leu. Estes dados estão demonstrados na figura 13. O mesmo aconteceu quando estes valores foram normalizados em relação a fase pré-suplementação, não ocorrendo diferença estatisticamente significativa na atividade eritrocitária da GPx entre os grupos Pro/Pro e Pro/Leu.



**Figura 13** – Atividade eritrocitária total da GPx nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil; dados gerais e separados por genótipo. (\*) significativamente diferente em relação a fase pré-suplementação.

#### 6.5.4. Concentrações plasmáticas de TBARS

As concentrações médias ( $\pm$ DP) de TBARS no plasma das participantes do estudo foram de  $5,0 \pm 3,7$  e  $7,6 \pm 3,3$   $\mu\text{mol/L}$  ( $p=0,00$ ) nas fases pré e pós-suplementação, respectivamente. Para os diferentes genótipos, estes valores foram de  $5,1 \pm 2,3$  e  $8,3 \pm 3,0$   $\mu\text{mol/L}$  ( $p<0,00001$ ) nas participantes Pro/Leu; de  $5,4 \pm 5,4$  e  $7,0 \pm 3,6$   $\mu\text{mol/L}$  ( $p<0,05$ ) naquelas Pro/Leu; e de  $3,3 \pm 2,3$  e  $7,4 \pm 3,9$   $\mu\text{mol/L}$  ( $p<0,05$ ) nas voluntárias Leu/Leu. Houve diferença estatisticamente significativa entre as fases pré e pós-suplementação e também quando os dados foram separados de acordo com os genótipos. Os dados estão demonstrados na figura 14.

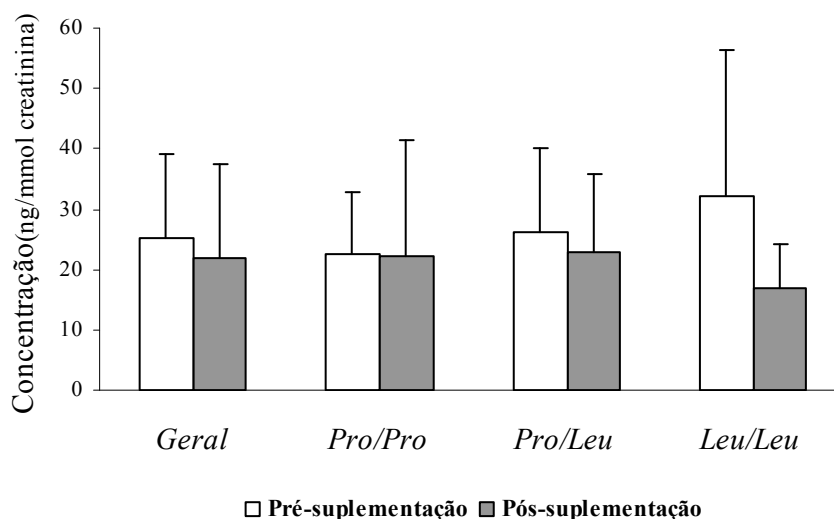


**Figura 14** – Concentrações plasmáticas de TBARS nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil; dados gerais e separados por genótipo. (\*) significativamente diferente em relação a fase pré-suplementação.



### 6.5.5. Concentrações urinárias de 8-isoprostanos

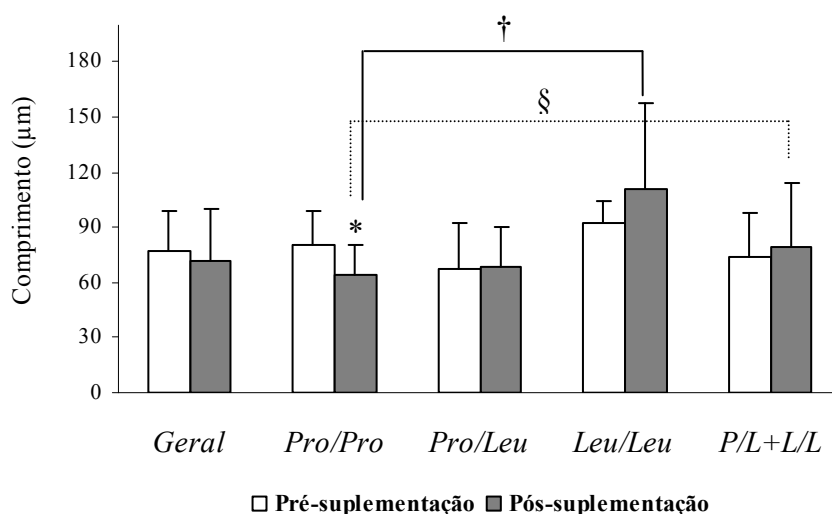
As concentrações médias ( $\pm$ DP) de 8-isoprostanos nas amostras de urina nas fases pré e pós-suplementação foram, respectivamente,  $25,1 \pm 14,2$  e  $21,8 \pm 15,6$  ng/mmol de creatinina. Entre os diferentes genótipos estes valores foram de  $22,4 \pm 10,6$  e  $22,3 \pm 19,2$  ng/mmol de creatinina para as participantes Pro/Pro; de  $26,1 \pm 14,0$  e  $22,9 \pm 13,0$  ng/mmol de creatinina para aquelas Pro/Leu; e de  $32,0 \pm 24,5$  e  $16,8 \pm 7,2$  ng/mmol de creatinina para as Leu/Leu. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas em nenhuma das avaliações. Os dados estão demonstrados na figura 15.



**Figura 15** – Concentrações urinárias de 8-isoprostanos nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil; dados gerais e separados por genótipo.

### 6.5.6. Tamanhos dos cometas/avaliação de danos em DNA

Os tamanhos médios ( $\pm$ DP) dos cometas nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil foram de  $77,3 \pm 21,6$  e  $72,2 \pm 28,1$   $\mu\text{m}$ , respectivamente. Quando os dados foram separados de acordo com os perfis de genótipo, esses valores foram de  $80,8 \pm 18,5$  e  $64,2 \pm 16,4$   $\mu\text{m}$  ( $p < 0,005$ ) para Pro/Pro; de  $67,6 \pm 24,3$  e  $68,5 \pm 21,7$   $\mu\text{m}$  para Pro/Leu; e de  $92,1 \pm 12,8$  e  $111,4 \pm 46,3$   $\mu\text{m}$  para Leu/Leu. Para os dados referentes ao efeito geral da suplementação, não houve diferenças estatisticamente significativas entre as duas fases da intervenção. Após a separação de acordo com o genótipo, não houve diferenças entre os genótipos quando os grupos foram avaliados na fase pré-suplementação isoladamente. Entretanto, houve redução significativa dos valores no grupo Pro/Pro, a qual não ocorreu nos outros dois grupos de genótipos. O grupo Leu/Leu apresentou, no período pós-suplementação, valores significativamente maiores em relação ao grupo Pro/Pro ( $p < 0,05$ ). Ainda, ao se agrupar os genótipos Pro/Leu e Leu/Leu, os valores médios ( $\pm$ DP) foram de  $74,0 \pm 24,2$  e  $79,9 \pm 39,6$   $\mu\text{m}$ , nas fases pré e pós-suplementação, respectivamente. Neste caso, os valores na fase pós-suplementação foram marginalmente maiores do que àqueles das participantes com genótipo Pro/Pro ( $p < 0,10$ ). Todos os dados estão demonstrados na figura 16.



**Figura 16** – Tamanho dos cometas ( $\mu\text{m}$ ) nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil; dados gerais e separados por genótipo. (\*) significativamente diferente em relação a fase pré-suplementação; (§ e †) significativamente diferentes em relação a Pro/Pro.

### 6.5.7. Glicemia

Os valores médios de glicemia obtidos nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil foram de, respectivamente,  $110,4 \pm 18,8$  e  $108,2 \pm 20,9$  mg/dL. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre ambas as fases, as quais também não ocorreram quando os dados foram separados de acordo com os diferentes perfis de genótipos.

### 6.5.8. Concentrações de lipídeos séricos

As concentrações médias ( $\pm\text{DP}$ ) de colesterol total no soro das participantes do estudo foram de  $171,0 \pm 28,8$  e  $175,5 \pm 26,6$  mg/dL nas fases pré e pós-suplementação, respectivamente. Considerando os diferentes genótipos, os mesmos valores foram de  $173,2 \pm 23,8$  e  $178,3 \pm 24,9$  mg/dL para Pro/Pro; de  $160,2 \pm 28,7$  e  $168,7 \pm 26,3$  mg/dL ( $p < 0,01$ ) para

Pro/Leu; e de  $193,0 \pm 28,4$  e  $184,2 \pm 34,5$  mg/dL para Leu/Leu. Houve diferença estatisticamente significativa apenas entre os valores obtidos na fase pós em relação a fase pré-suplementação nas participantes heterozigotas.

Com relação ao HDL-c, os valores médios ( $\pm$ DP) nas fases pré e pós-suplementação, respectivamente, foram de  $37,6 \pm 13,6$  e  $44,5 \pm 13,4$  mg/dL ( $p < 0,00001$ ). Quando separados de acordo com os genótipos, estes valores foram de  $40,2 \pm 16,0$  e  $44,8 \pm 15,6$  mg/dL para o genótipo homozigoto para prolina ( $p < 0,04$ ); de  $34,1 \pm 9,7$  e  $43,6 \pm 10,2$  mg/dL para o genótipo heterozigoto ( $p < 0,0001$ ); e de  $38,4 \pm 13,9$  e  $45,8 \pm 15,1$  mg/dL para o genótipo homozigoto para leucina ( $p < 0,09$ ).

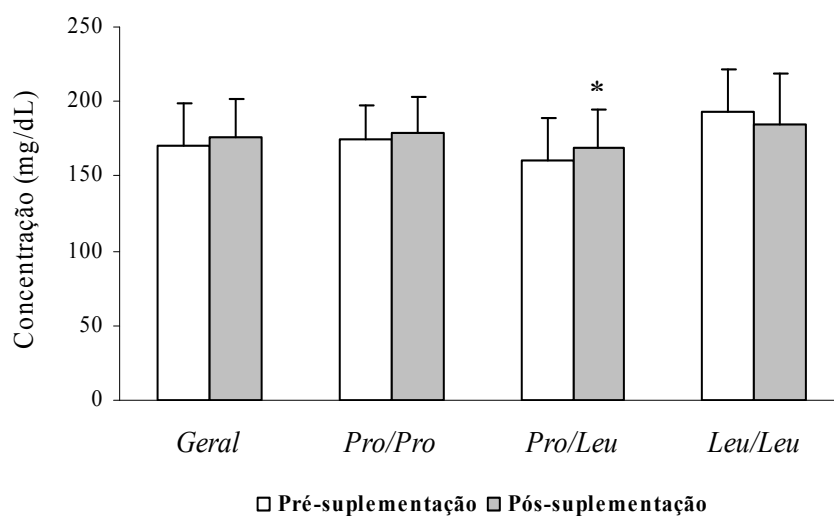
Os valores médios ( $\pm$ DP) de LDL-c foram de  $114,0 \pm 29,6$  e  $109,3 \pm 22,8$  mg/dL nas fases pré e pós-suplementação, respectivamente. Estes valores, quando analisados de acordo com os diferentes genótipos, foram de  $113,5 \pm 29,4$  e  $111,2 \pm 20,1$  mg/dL para Pro/Pro; de  $108,7 \pm 31,8$  e  $105,0 \pm 27,3$  mg/dL para Pro/Leu; e de  $130,4 \pm 22,6$  e  $114,6 \pm 20,6$  mg/dL para Leu/Leu.

As concentrações médias ( $\pm$ DP) de VLDL-c nas fases pré e pós-suplementação foram de  $19,6 \pm 9,4$  e  $21,7 \pm 8,3$  mg/dL, respectivamente. Para os diferentes perfis de genótipos, os mesmos valores foram de  $25,2 \pm 23,0$  e  $22,3 \pm 7,8$  mg/dL para Pro/Pro; de  $17,4 \pm 10,1$  e  $20,1 \pm 7,8$  mg/dL para Pro/Leu; e de  $24,2 \pm 9,4$  e  $23,8 \pm 12,3$  mg/dL para Leu/Leu. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre as fases pré e pós-suplementação quando avaliadas isoladamente e também quando analisadas de acordo com os diferentes genótipos.

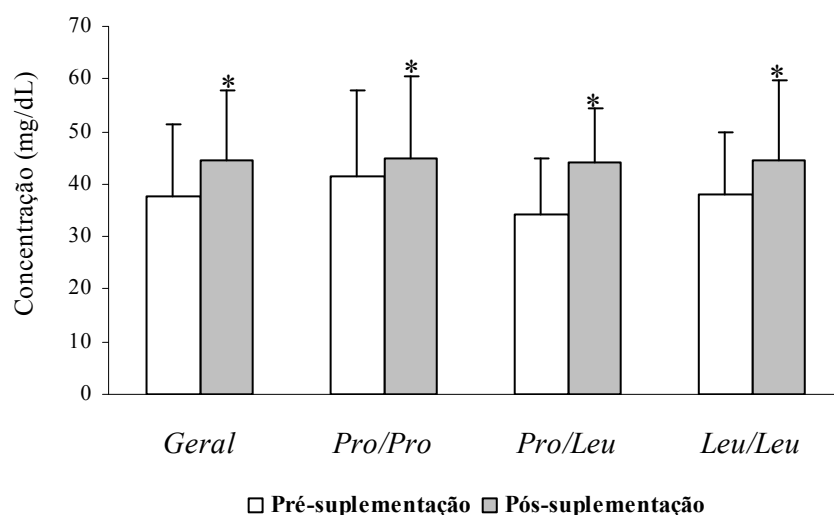
Igualmente, a análise das concentrações séricas de triacilgliceróis também não revelou diferenças estatisticamente significativas em ambas as análises. Os valores médios ( $\pm$ DP) observados foram de  $110,3 \pm 87,9$  e  $108,6 \pm 41,5$  mg/dL nas fases pré e pós-suplementação, respectivamente. De acordo com os perfis de genótipo, as concentrações

foram de  $126,1 \pm 114,6$  e  $112,3 \pm 39,0$  mg/dL para Pro/Pro; de  $86,6 \pm 50,7$  e  $100,3 \pm 38,8$  mg/dL para Pro/Leu; e de  $119,8 \pm 46,5$  e  $118,4 \pm 61,2$  mg/dL para Leu/Leu.

A seguir estão representados graficamente os dados que apresentaram diferenças estatisticamente significativas.



**Figura 17** – Concentrações séricas de colesterol total nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil; dados gerais e separados por genótipo. (\*) significativamente diferente em relação a fase pré-suplementação.

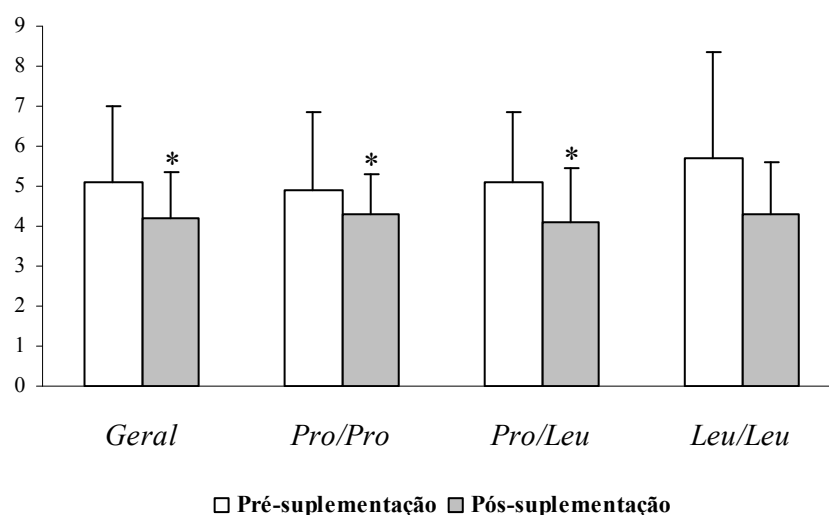


**Figura 18** – Concentrações séricas de HDL-c nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil, dados gerais e separados por genótipos. (\*) significativamente diferente em relação a fase pré-suplementação.

### 6.5.9. Determinação dos Índices de Castelli I e II

Para avaliar o risco aterogênico, foram determinados os índices de Castelli I e II (CASTELLI, ABBOTT, McNAMARA, 1983). O primeiro refere-se à razão entre as concentrações de colesterol total e HDL-c, e o segundo, à razão entre LDL-c e HDL-c.

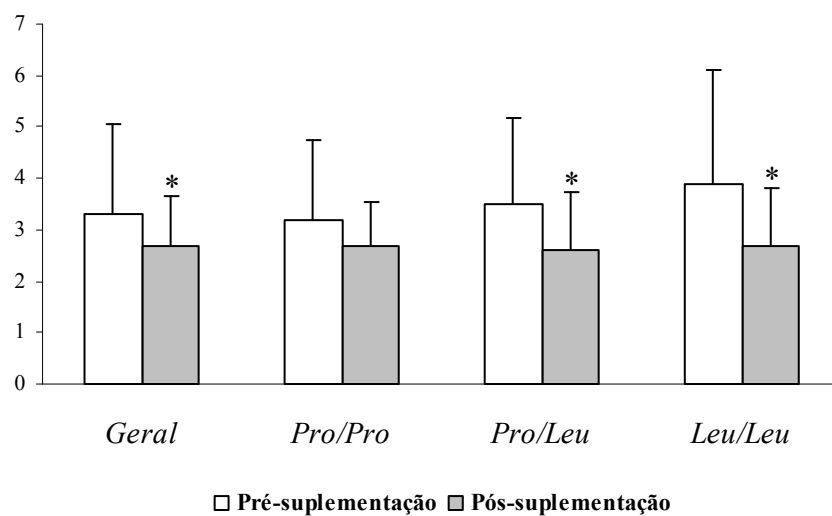
Os valores médios do índice de Castelli I foram de  $5,0 \pm 1,8$  e  $4,2 \pm 1,1$  nas fases pré e pós-suplementação, respectivamente. Para o índice de Castelli II estes valores foram de  $3,4 \pm 1,7$  e  $2,7 \pm 1,0$ . Para os dois índices houve diferença estatisticamente significativa entre as fases ( $p < 0,0002$  e  $p < 0,0004$ , respectivamente). Com relação ao índice de Castelli I, quando separados por genótipos, os valores nas fases pré e pós-suplementação foram de  $4,9 \pm 1,9$  e  $4,3 \pm 1,0$  ( $p < 0,07$ ) para as participantes Pro/Pro; de  $5,2 \pm 2,0$  e  $4,3 \pm 1,3$  ( $p < 0,0002$ ) para aqueles Pro/Leu; e de  $5,7 \pm 2,7$  e  $4,3 \pm 1,3$  para as Leu/Leu. Esta mesma distribuição de valores para o índice de Castelli II foi de  $3,2 \pm 1,6$  e  $2,7 \pm 0,8$  para Pro/Pro; de  $3,6 \pm 1,8$  e  $2,7 \pm 1,1$  ( $p < 0,0002$ ) para Pro/Leu; e de  $3,9 \pm 2,2$  e  $2,7 \pm 1,1$  ( $p < 0,09$ ) para Leu/Leu. Estes dados estão demonstrados graficamente nas figuras 19 e 20.



**Figura 19** – Índice de Castelli I (razão colesterol total:HDL-c) nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil; dados gerais e separados por genótipos.

(\*) significativamente diferente em relação a fase pré-suplementação.

Valor desejável:  $< 4,3$  mg/dL (Castelli, Abbott, Mcnamara, 1983)



**Figura 20** – Índice de Castelli II (razão LDL-c:HDL-c) nas fases pré e pós-suplementação com castanha-do-brasil; dados gerais e separados por genótipos. (\*) significativamente diferente em relação a fase pré-suplementação. Valor desejável: <2,9 mg/dL (Castelli, Abbott, Mcnamara, 1983)

## 7. DISCUSSÃO

Os objetivos estabelecidos neste trabalho podem ser separados de duas maneiras distintas: (1) Avaliar o estado nutricional relativo ao selênio e o grau de estresse oxidativo em mulheres obesas mórbidas e verificar a resposta destes parâmetros à suplementação com castanha-do-brasil; (2) Avaliar as diferenças existentes entre os genótipos relacionados ao polimorfismo Pro198Leu no gene que codifica para a enzima GPx1, tanto na fase inicial, quanto após a suplementação.

A avaliação do estado nutricional relativo a micronutrientes é marcada pela falta de um biomarcador padrão, de procedimentos totalmente aceitos para realização das avaliações e pela dificuldade de interpretação dos resultados obtidos. No caso do selênio, geralmente são utilizados marcadores sanguíneos, os quais refletem um estado nutricional de curto a médio prazo e amostras de unhas e cabelos, que indicam exposição ocorrida entre 6 e 12 meses anteriores à avaliação. Neste estudo, utilizaram-se marcadores sanguíneos e unhas, bem como registro alimentar de três dias para caracterizar o *status* de selênio das participantes. Na fase inicial, ou seja, antes da suplementação, os resultados referentes aos primeiros objetivos citados acima revelaram que 32,4% das participantes do estudo apresentaram concentrações reduzidas de selênio plasmático quando comparadas aos valores de referência adotados por Alegria et al. (1996), os quais variam entre 53 e 109 µg/L. Nos eritrócitos, a inadequação foi de 43,2%. Entretanto, devido às variações consideráveis existentes no *status* de selênio em nível mundial, não há parâmetros de referência inteiramente aceitos como normais para estes índices. Por exemplo, se o critério de adequação para selênio plasmático preconizado por Nève (1995), o qual é de 70 µg/L, for utilizado para as comparações, 86,5% das participantes deste estudo estavam deficientes em selênio na fase pré-suplementação. Ainda, quando utilizado o ponto de corte de concentração de selênio sérico ou plasmático mais bem aceito,



que é o valor mínimo necessário para a maximização da atividade da GPx plasmática (>84-100 µg/L), 100% das participantes apresentaram deficiência. Concentrações de selênio eritrocitário ou em sangue total seguem praticamente a mesma tendência dos valores séricos/plasmáticos. É possível, portanto, afirmar que a deficiência de selênio na fase inicial do estudo foi elevada. Estes dados podem ainda ser confirmados pelas concentrações reduzidas de selênio encontradas nas unhas.

Quando há deficiência do mineral, a atividade das enzimas dele dependentes pode ser utilizada como parâmetro de avaliação, visto que há redução de atividade nestes casos. De acordo com os resultados da avaliação da atividade eritrocitária total da GPx, 27% das voluntárias apresentaram valores abaixo da referência, entretanto o valor máximo de atividade não foi alcançado por 97,3% delas. Como esperado, houve correlação estatisticamente significativa entre as concentrações de selênio nos eritrócitos e os valores de atividade eritrocitária total da enzima ( $r=0,4945$ ,  $p<0,01$ ).

Os dados relativos às concentrações sanguíneas de selênio e à atividade eritrocitária total da GPx estão de acordo com trabalhos que demonstram que indivíduos obesos apresentam estado nutricional deficiente com relação a micronutrientes e redução na atividade de enzimas antioxidantes. Kimmons et al. (2006), observaram níveis significativamente mais baixos de selênio sérico em indivíduos obesos e com sobrepeso em comparação àqueles com peso eutrófico. De maneira semelhante, Arnaud et al. (2006), verificaram concentrações séricas de selênio significativamente menores em mulheres francesas obesas no período pré-menopausa em relação àqueles com peso eutrófico ( $\approx 84,5 \pm 16,0$  x  $87,2 \pm 17,6$  µg/L). Olusi (2002), encontrou valores de atividade eritrocitária total da GPx significativamente menores em indivíduos que apresentavam superobesidade, obesidade grau III, grau II e grau I ( $76,3 \pm 6,9$ ;  $80,8 \pm 7,2$ ;  $84,3 \pm 6,7$ ;  $90,0 \pm 7,4$  e  $95,1 \pm 3,6$  U/gHb, respectivamente) em relação àqueles com peso eutrófico ( $98,4 \pm 3,3$  U/gHb). O IMC foi negativamente correlacionado

com a atividade da enzima. Os valores médios ( $\pm$ DP) de  $36,6 \pm 17,1$  U/gHb verificados na fase pré-suplementação com castanha-do-brasil foram 48% menores do que aqueles observados nos indivíduos com superobesidade. No presente estudo não se observou correlação estatisticamente significativa entre os valores de IMC e a atividade da GPx ( $r=-0,1161$ ,  $p>0,5$ ). Na literatura, o fato de indivíduos obesos apresentarem concentrações de selênio e atividade da GPx reduzidas normalmente é atribuído a um possível aumento nos níveis de estresse oxidativo sistêmico e adipócito-específico, o que poderia, por sua vez, aumentar o catabolismo de nutrientes considerados antioxidantes.

No presente trabalho foram utilizados marcadores de avaliação do grau de estresse oxidativo. O primeiro dentre eles, o MDA, é um dos principais produtos resultantes da peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados e existem três mecanismos propostos para sua formação: (1) sob condições de estresse, o composto se originaria a partir de endoperóxidos bicíclicos gerados durante a biossíntese de prostaglandinas; (2) após formação sucessiva de hidroperóxidos e  $\beta$ -clivagem de cadeias de ácidos graxos, o que gera hidroperoxialdeídos, o MDA seria formado por  $\beta$ -cisão ou (3) pela reação do radical acroleína final com o radical hidroxil. Apesar de sua reatividade química baixa em condições fisiológicas e pH neutro, o MDA tem a capacidade de interagir com bases de ácidos nucleicos e formar vários tipos de adutos e também de criar ligações cruzadas entre as fitas da molécula de DNA, podendo promover efeitos biológicos deletérios importantes. A toxicidade do MDA pode promover mutações, as quais por sua vez, podem aumentar as chances de surgimento de câncer e, também, está diretamente relacionada à estabilidade cardiovascular (DEL RIO, STEWART, PELLEGRINI, 2005). A metodologia mais empregada para avaliação dos níveis sanguíneos de MDA tem sido aquela em que se realiza sua condensação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), resultando na formação de compostos que podem ser facilmente avaliados por espectrofotometria, que devem ser nomeados como substâncias reativas ao ácido

---

tiobarbitúrico (TBARS). Entretanto, a especificidade deste método vem sendo bastante discutida, pois se sabe que o TBA pode reagir com inúmeras outras substâncias derivadas da oxidação. As variações consideráveis nos resultados obtidos com a utilização desse método sugerem a ocorrência de oxidação das amostras durante os ensaios. Por outro lado, essa metodologia ainda é empregada em diversos estudos considerando sua praticidade e custos reduzidos. Resultados positivos podem ser observados com a utilização desta técnica principalmente quando se avaliam diferenças entre indivíduos enfermos e saudáveis.

Devido a uma série de fatores peculiares, indivíduos obesos apresentam grau de estresse oxidativo elevado quando comparados a indivíduos com peso eutrófico. De acordo com o estudo de Ustundag et al. (2007), essa característica é encontrada desde a infância. Estes pesquisadores verificaram níveis plasmáticos de TBARS significativamente maiores em crianças obesas quando comparadas com grupo controle de peso normal ( $1,20 \pm 0,28 \times 0,26 \pm 0,09 \mu\text{mol/L}$ ), além de atividade reduzida de enzimas antioxidantes. O mesmo padrão foi observado por Mohn et al. (2005), sendo que pré-adolescentes com obesidade grave apresentaram valores elevados de TBARS em partículas de LDL em comparação a seus controles ( $0,90 \pm 0,31 \times 0,45 \pm 0,24 \text{ nmol/mg}$ ). Esta particularidade é demonstrada também em adultos. Ozata et al. (2002), encontraram concentrações significativamente maiores de TBARS em eritrócitos de homens obesos em relação àqueles de peso normal ( $7,8 \pm 3,4 \times 3,9 \pm 0,9 \mu\text{mol/L}$ ), bem como valores reduzidos de atividade das enzimas GPx e SOD. A mesma tendência foi verificada por Dandona et al. (2001), com indivíduos obesos apresentando concentrações plasmáticas de TBARS superiores quando comparados com controles de peso eutrófico ( $1,7 \pm 0,2 \times 1,3 \pm 0,1 \mu\text{mol/L}$ ). No mesmo estudo citado anteriormente, Olusi (2002) verificou que conforme aumentava o grau de obesidade, maiores eram as concentrações plasmáticas de TBARS, ou seja:  $2,5 \pm 0,04$ ;  $2,8 \pm 0,05$ ;  $4,3 \pm 0,01$ ;  $4,8 \pm 0,15$ ;  $5,2 \pm 0,18$  e  $5,3 \pm 0,2 \mu\text{mol/L}$  para peso eutrófico, obesidade grau I, grau II, grau III e

superobesidade, respectivamente. Konukoglu et al. (2003), avaliaram este parâmetro entre mulheres obesas normo e hipertensas no período pós-menopausa em comparação a controles de peso eutrófico, também normo ou hipertensos. Os autores verificaram que as pacientes obesas normotensas apresentaram concentrações plasmáticas de TBARS significativamente maiores do que aquelas do grupo controle normotenso ( $7,2 \pm 1,6$  x  $5,6 \pm 0,7$   $\mu\text{mol/L}$ ) e o mesmo aconteceu com as mulheres obesas hipertensas em relação aos controles também caracterizados como hipertensos ( $8,45 \pm 1,1$  x  $6,9 \pm 0,5$   $\mu\text{mol/L}$ ).

Os resultados obtidos com relação a este parâmetro no presente protocolo de estudo foram semelhantes àqueles citados acima. Na fase pré-suplementação com castanha-do-brasil, os valores médios ( $\pm\text{DP}$ ) de TBARS plasmáticos foram de  $5,0 \pm 3,7$   $\mu\text{mol/L}$ , assemelhando-se aos encontrados em obesos grau III e superobesos, no estudo de Olusi (2002). Estes valores foram também semelhantes aos observados em indivíduos portadores de diabetes *mellitus* tipo II, os quais foram de  $4,5 \pm 1,3$   $\mu\text{mol/L}$  comparados com  $1,4 \pm 0,5$   $\mu\text{mol/L}$  no grupo controle (TURK et al., 2002). Assemelharam-se também àqueles encontrados por Su et al. (2008), em pacientes com glicose de jejum alterada e tolerância à glicose alterada ( $5,7 \pm 0,7$  x  $5,8 \pm 0,7$   $\mu\text{mol/L}$ , respectivamente) em comparação a indivíduos com tolerância normal à glicose ( $3,8 \pm 0,6$   $\mu\text{mol/L}$ ). Também se aproximaram dos resultados obtidos no estudo de Inal, Kanbak, Sunal (2001), para o grupo na faixa etária de 49 a 60 anos, que foram de  $4,4 \pm 0,1$   $\mu\text{mol/L}$ , significativamente maiores em relação aos grupos de faixa etária menor. Entretanto, no presente estudo não se verificaram correlações estatisticamente significativas entre as concentrações plasmáticas de TBARS x IMC ( $r=0,0152$ ,  $p=0,929$ ), idade ( $r=0,0883$ ,  $p=0,603$ ) ou glicemia ( $r=-0,2304$ ,  $p=0,17$ ). Por outro lado, houve correlação positiva significativa com a atividade eritrocitária total da GPx ( $r=0,4837$ ,  $p<0,01$ ), sugerindo um mecanismo homeostático compensatório.

Outro marcador de estresse oxidativo utilizado neste trabalho foi a excreção urinária de 8-isoprostanos. Isoprostanos são substâncias semelhantes a prostaglandinas e são derivados da peroxidação do ácido araquidônico, induzida por radicais livres e independente de cicloxigenases. A descoberta da formação destes compostos *in vivo* em seres humanos, na década de 1990, foi de extrema importância uma vez que atualmente estes são considerados a medida mais confiável para avaliar o grau de estresse oxidativo *in vivo* e, portanto, o papel do estresse oxidativo na patogênese de doenças humanas. Comparada a outros biomarcadores, a determinação das concentrações de isoprostanos apresenta diversas vantagens, pois estes são produtos específicos de peroxidação e quimicamente estáveis, são formados *in vivo*, estão presentes em quantidades detectáveis em diversos fluidos biológicos e, além disso, não são afetados pelo conteúdo de lipídeos da alimentação. Na presença de doenças relacionadas a um grau maior de estresse oxidativo, como por exemplo, asma, cirrose hepática, diabetes *mellitus*, doença de Alzheimer, doença cardiovascular, assim como no tabagismo, a excreção de 8-isoprostanos é elevada (MONTUSCHI, BARNES, ROBERTS II, 2004). Entretanto, existem poucos relatos acerca dos níveis observados para indivíduos obesos quando comparados a controles de peso eutrófico. Keaney et al. (2003), verificaram que o IMC é significativamente correlacionado com a excreção urinária de 8-isoprostanos. Block et al. (2002), encontraram valores plasmáticos de 8-isoprostanos superiores em obesos grau II quando comparados com indivíduos obesos grau I, com sobrepeso e com peso eutrófico. Neste estudo também houve correlação positiva com os valores de IMC. No presente trabalho, as concentrações médias de 8-isoprostanos na urina estiveram de acordo com os valores de referência (10-50 ng/mmol de creatinina). Apenas 8% das pacientes apresentaram níveis superiores ao valor limítrofe. Também não foi observada correlação significativa com os valores de IMC, glicemia ou idade. Na fase pré-suplementação, verificou-se correlação negativa apenas com os valores de selênio no plasma ( $r = -0,3496$ ,  $p < 0,04$ ), o que corrobora a

afirmação de que um *status* de deficiência de selênio estaria relacionado a um grau mais elevado de estresse oxidativo.

Um terceiro marcador de estresse oxidativo utilizado foi o ensaio do cometa, ou eletroforese com gel de célula única. Esta metodologia é extensamente utilizada na avaliação de danos ao DNA. Em estudos nutricionais, particularmente, é ideal na investigação dos possíveis efeitos de nutrientes sobre danos em DNA. Entretanto, apesar de sua utilidade, existem algumas limitações para a utilização deste método. Um dos principais problemas relaciona-se a falta de especificidade entre os valores de referência adotados por diferentes pesquisadores. Existem algumas formas de expressar os resultados obtidos com este ensaio, como por exemplo, comprimento total dos cometas, comprimento da “cauda” dos cometas, porcentagem de fluorescência na “cauda” (%T), *tail moment* (calculado por meio da multiplicação entre os dois últimos métodos) e contagem (*score*) visual com utilização de escalas, que variam geralmente entre 0 e 4. Esta diversidade de formas de avaliação e também as diferenças consideráveis existentes entre as técnicas utilizadas em diferentes laboratórios, dificulta a comparação entre os resultados. Diferenças metodológicas, como por exemplo, o período de tempo em que as lâminas permanecem na solução tampão alcalina e o tempo de eletroforese são críticos, uma vez que estes são os principais determinantes da migração dos cometas (COLLINS, 2004; MOLLER, 2006). Ainda, no caso específico deste trabalho, não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliassem danos em DNA em indivíduos obesos ou com sobrepeso.

Devido às dificuldades encontradas para comparação dos resultados, algumas considerações são necessárias. Este ensaio foi realizado em amostras de sangue total, considerando alguns fatores como quantidade necessária de sangue para extração de linfócitos e o tempo demandado, além da necessidade de armazenamento das amostras. Linfócitos são propensos a danos oxidativos após serem isolados e devem, portanto, ser usados

imediatamente após a separação ou ser criopreservados em  $-196^{\circ}\text{C}$ . De acordo com alguns estudos, a determinação dos danos em DNA em amostras de sangue total é totalmente comparável àquela realizada em linfócitos, além do fato de essas células poderem ser armazenadas por períodos de tempo consideráveis (60 dias até 4 meses) apenas com a utilização de criopreservante e meio de cultura (CHUAG, HU, 2004; HININGER et al., 2004). Um fator que poderia afetar o sucesso do ensaio seria a presença de células sanguíneas vermelhas, porém, estas têm suas membranas rompidas e são lisadas em um primeiro momento, quando da imersão das lâminas na solução de lise e, posteriormente, durante a realização da eletroforese, onde aquelas remanescentes são completamente lisadas. Por fim, uma limitação importante é o número total e a proporção de células sanguíneas brancas, pois estes podem variar de maneira importante de acordo com a presença e o estágio de certas doenças, bem como em tempo médio de vida e capacidade antioxidante. Portanto, discussão mais importante neste caso, será com relação aos efeitos exercidos pelo consumo das castanhas-do-brasil sobre este marcador.

Além dos marcadores de estresse oxidativo utilizados, também foram determinadas as concentrações de colesterol total, LDL-c, HDL-c, VLDL-c e triacilgliceróis, com o intuito de avaliar o risco cardiovascular das pacientes. Em comparação aos valores de referência utilizados pela Sociedade Brasileira de Cardiologia, 18,9% e 66,7% das voluntárias apresentaram valores elevados de colesterol total e LDL-c, respectivamente. Com relação ao HDL-c, 81,1% delas tinham valores abaixo de 50 mg/dL. Valores de triacilgliceróis superiores a 150 mg/dL foram observados em 16,2% das participantes. Os índices de Castelli I e II são utilizados para predizer o risco cardiovascular e são baseados nas razões colesterol total: HDL e LDL:HDL, respectivamente (CASTELLI, ABBOTT, McNAMARA, 1983). De acordo com Ingelsson et al. (2007), a utilização destes dois índices é comparável com àqueles da razão apolipoproteína B:apolipoproteína A-1 no que se refere a predição do risco de doenças

cardiovasculares. Na primeira fase do estudo, 63,8% das participantes apresentaram valores acima do considerado ideal para o índice de Castelli I ( $<4,3$  mg/dL) e, para o índice de Castelli II, valores elevados em relação a referência ( $<2,9$  mg/dL) foram encontrados em 66,7% delas. Os valores médios do primeiro índice se assemelharam àqueles observados por Olusi (2002) em mulheres com obesidade grau III e superobesidade. Para o segundo índice, os valores obtidos foram superiores aos de mulheres com IMC maior do que 50. Entretanto, ambos os índices apresentaram valores menores quando comparados àqueles obtidos por Konukoglu et al. (2003) em indivíduos obesos normo e hipertensivos e por Ozata et al. (2002) em homens obesos. O índice de Castelli I se correlacionou negativamente com a atividade eritrocitária total da GPx ( $r=-0,3910$ ,  $p<0,01$ ) e positivamente com a ingestão alimentar de lipídeos ( $r=0,3381$ ,  $p<0,05$ ). O mesmo padrão de correlações foi observado para o índice de Castelli II ( $r=-0,3974$ ,  $p<0,02$  para GPx e  $r=0,3273$ ,  $p<0,06$  para lipídeos).

Um dos objetivos do presente estudo foi avaliar os efeitos da suplementação com castanha-do-brasil sobre os parâmetros bioquímicos utilizados. As castanhas-do-brasil utilizadas neste protocolo de pesquisa apresentaram concentração média ( $\pm$ DP) de selênio de  $58,1 \pm 3,0$   $\mu$ g/g. Cada unidade média pesava cerca de 5 g, o que totalizou aproximadamente 290,5  $\mu$ g de selênio por castanha. Este valor é bastante superior às recomendações diárias de ingestão (RDAs), que são de 55  $\mu$ g/dia (IOM, 2000). Entretanto, não ultrapassam os valores superiores toleráveis de ingestão (ULs), os quais poderiam promover riscos de toxicidade. Além disso, a maior parte dos estudos de suplementação com selênio utiliza doses diárias de 200  $\mu$ g. A concentração de selênio verificada nas castanhas utilizadas no protocolo é também superior à maioria daquelas encontradas em outros estudos. Por exemplo, Moodley, Kindness e Jonnalagadda (2007), obtiveram concentrações médias ( $\pm$ DP) de  $36,1 \pm 0,4$   $\mu$ g/g em castanhas-do-brasil consumidas na África do Sul. Kannamkumarath et al. (2002), encontraram concentrações diferentes de selênio entre castanhas-do-brasil com e sem casca.



As primeiras apresentaram as maiores concentrações do mineral (média  $\pm$  DPR),  $35,1 \pm 3,2$   $\mu\text{g/g}$ , enquanto que naquelas sem casca os valores foram de  $8,3 \pm 3,1$   $\mu\text{g/g}$ . Resultados bastante semelhantes foram encontrados por Vonderheide et al. (2002): castanhas-do-brasil com casca apresentaram concentrações médias ( $\pm$ DPR) de  $35,0 \pm 5,0$   $\mu\text{g/g}$  e sem casca, de  $8,0 \pm 5,0$   $\mu\text{g/g}$ . Chang et al. (1995), avaliaram mais de 150 amostras de castanhas provenientes de duas regiões distintas do Brasil: Acre-Rondônia e Manaus-Belém. Nas primeiras, as concentrações médias ( $\pm$ DP) foram de  $3,06 \pm 4,01$   $\mu\text{g/g}$ . Já naquelas castanhas provenientes da região de Manaus-Belém, os valores foram de  $36,0 \pm 50,0$   $\mu\text{g/g}$ . Estes últimos dados, considerando a variação dos valores médios, são os que mais se assemelham aos observados no presente estudo. Provavelmente, o fato das castanhas serem provenientes da mesma origem geográfica do país, considerada de solo rico em selênio, pode estar relacionado às maiores concentrações do mineral. Apenas um estudo identificou concentrações de selênio maiores em castanhas-do-brasil também provenientes da região Amazônica brasileira. As concentrações médias foram de  $126$   $\mu\text{g/g}$  (CHUNHIENG et al., 2004). Avaliações realizadas no Brasil verificaram concentrações médias de  $5,8$   $\mu\text{g/g}$  (ROCHA, 2009), de  $19,0$   $\mu\text{g/g}$  (COUTINHO, 2003), de  $40,0$  e  $43,0$   $\mu\text{g/g}$  (MARTENS e COZZOLINO, 2002) e de  $169$   $\mu\text{g/g}$  (BORTOLI, 2010).

O selênio apresenta-se nos alimentos de diversas formas, principalmente em produtos vegetais, onde mais de 15 delas podem ser encontradas. A biodisponibilidade depende inteiramente da forma química do mineral, sendo que, de maneira geral, os compostos orgânicos como selenometionina, selenocisteína e compostos metilados de baixo peso molecular são mais bem absorvidos do que os inorgânicos como o selenito e o selenato. A castanha-do-brasil, em comparação com outros alimentos de origem vegetal, pode ser considerada boa fonte de proteínas. Devido ao fato de que durante a fase de crescimento dos vegetais o selênio é estocado nas sementes em detrimento das folhas, este mineral, quando

presente particularmente em oleaginosas, pode apresentar-se de duas formas distintas: (1) ligado firmemente a proteínas, na forma de selenoaminoácidos; ou (2) ligado de maneira mais fraca, na forma de selenodissulfidos ou metilselenossulfidos, os quais podem ser reduzidos facilmente, liberando compostos de baixo peso molecular. De acordo com Kannamkumarath, Wrobel, Wuilloud (2005), a maior parte do selênio presente na castanha-do-brasil apresenta-se ligada firmemente à fração protéica, e, em concordância com os resultados de Kannamkumarath et al. (2002), Vonderheide et al. (2002) e Chunhieng et al. (2004), a selenometionina é a forma primária de selênio incorporada a fração protéica desta castanha. Esta última observação tem importância considerável uma vez que a selenometionina pode seguir diferentes rotas metabólicas. Ela pode, no lugar da metionina, se incorporar a proteínas, em caso desta ser um fator limitante na alimentação. Pode também ser convertida em selenocisteína pela via da transsulfuração e, posteriormente, converter-se em selenito de hidrogênio. Neste caso, seguirá a mesma rota do selenito que poderá ser utilizado na síntese das diversas selenoproteínas ou também ser metilado através de reações enzimáticas com tióis-S-metiltransferases, gerando as formas monometiladas (metilselenol), dimetiladas (dimetilselenito) e trimetiladas (trimetilselenônio). Por fim, através de reação enzimática com a metioninase, pode gerar metilselenol. Apenas o selenito de hidrogênio proveniente da conversão das diferentes formas de selênio, será transformado em selenofosfato, numa reação mediada pela selenofosfato sintetase e, por fim, será incorporado às selenoproteínas na forma de selenocisteína, ou será excretado (MEUILLET et al., 2004; LETAVAYOVÁ, VLCKOVÁ, BROZMANOVÁ, 2006).

Conforme esperado, o consumo de uma unidade de castanha-do-brasil ao dia durante dois meses foi suficiente para aumentar significativamente as concentrações de selênio no plasma e eritrócitos, bem como a atividade eritrocitária total da enzima GPx em mulheres obesas participantes do estudo. O aumento médio  $\pm$ DP observado nas concentrações

plasmáticas de selênio foi de  $152,1 \pm 91,6\%$  (22,0 – 397,5). Com relação a concentração de selênio nos eritrócitos, o aumento médio  $\pm DP$  foi de  $278,0 \pm 174,8\%$  (26,0 – 847,2). Para a atividade eritrocitária total da GPx estes valores foram de  $66,0 \pm 74,9\%$  (10,6 – 480,2).

Thomson et al. (2008) verificaram aumento de 64,2% nas concentrações de selênio plasmático, de 8,3% na atividade plasmática da GPx e de 13,2% na atividade da GPx em sangue total com o fornecimento de duas castanhas-do-brasil por um período de três meses em indivíduos neozelandeses. Esses percentuais de aumento observados na fase pós-suplementação com as castanhas foram significativamente superiores àqueles obtidos no grupo suplementado com L-selenometionina e no grupo que recebeu placebo. Quando comparados aos resultados obtidos no presente estudo, estes valores foram notavelmente menores, o que pode ser atribuído a concentração de selênio presente nas castanhas utilizadas por estes pesquisadores. O consumo de duas unidades de castanha forneceu em média 53  $\mu g$  do mineral, com uma variação entre 20 e 84  $\mu g$ .

Outra característica marcante da suplementação com castanha-do-brasil entre as voluntárias com obesidade grau III foi o aumento dos níveis plasmáticos de TBARS. Com exceção de duas participantes, houve elevação significativa nestes níveis, sendo o aumento percentual médio  $\pm DP$  observado de  $87,6 \pm 66,4\%$  (-41,3 – 247,1). Diferentemente, Kocyigit, Koylu e Keles (2006) verificaram efeito positivo do consumo de pistache durante três semanas na redução dos níveis plasmáticos de MDA em cerca de 20%. De maneira semelhante, Jenkins et al. (2008) também observaram uma redução significativa de aproximadamente 20% nas concentrações de MDA sérico em indivíduos que consumiram uma dieta enriquecida com amêndoas durante um mês.

Característica peculiar de nozes e castanhas em geral é a porcentagem elevada de lipídeos. As castanhas-do-brasil utilizadas na suplementação apresentaram valores médios  $\pm DP$  de lipídeos de  $70,7 \pm 0,3$  g/100 g. Este valor é semelhante àqueles verificados por

Moodley, Kindness, Jonnalagadda (2007), os quais foram de  $65,0 \pm 1,1$  g/100 g; por Ramos, Borá (2003), de  $68,6 \pm 1,1$  g/100 g; e àquele fornecido pelo *USDA National Nutrient Database for Standard Reference*, que é de 66,4 g/100 g. Entretanto, é consideravelmente superior ao encontrado no estudo de Ryan et al. (2006), que foi de  $60,8 \pm 1,1$  g/100 g. Estes autores também estudaram o perfil de ácidos graxos de diversas nozes e verificaram que a castanha-do-brasil apresentou a menor razão de insaturados:saturados em relação à noz pecan, pistache, castanha de caju e pinhão. Particularmente, a castanha-do-brasil foi a noz com maior quantidade de ácidos graxos saturados, principalmente ácido palmítico (C16) e esteárico (C18). Além disso, a quantidade de ácidos graxos monoinsaturados, notadamente o ácido oléico (18:1), foi significativamente menor em relação às outras nozes. O percentual de ácidos graxos poliinsaturados, sobretudo o linoléico (18:2) foi semelhante ao observado para noz pecan e pinhão e especialmente maior do que aquele de pistaches e castanhas de caju. O fato de a castanha-do-brasil ser particularmente rica em ácidos graxos saturados em detrimento dos monoinsaturados e também rica em ácidos graxos poliinsaturados poderia ter contribuído para o aumento nos níveis plasmáticos de TBARS, visto que o MDA é um produto de peroxidação final principalmente de ácidos graxos poliinsaturados. Entretanto, é improvável que o consumo de apenas uma unidade de castanha seja suficiente para fornecer quantidades destes ácidos graxos capazes de interferir nas concentrações daquelas substâncias. Outro fator que pode ter exercido influência sobre este parâmetro foi o aumento de peso marginalmente significativo observado na fase pós-suplementação. Entretanto, todas as voluntárias do estudo foram orientadas a não alterar seus hábitos alimentares durante a realização do protocolo e o VET de uma castanha-do-brasil não seria suficiente para promover esta elevação. Além disso, as concentrações de TBARS não se correlacionaram com os valores de peso ( $r=-0,0353$ ,  $p=0,836$ ) e de IMC ( $r=-0,0720$ ,  $p=0,672$ ).

Por outro lado, o perfil de ácidos graxos das castanhas-do-brasil pode ter influenciado os parâmetros lipídicos e, por consequência, os índices de Castelli I e II, preditores do risco cardiovascular. Houve um aumento significativo nas concentrações séricas de HDL-c na fase pós-suplementação. O percentual médio  $\pm$ DP de aumento observado foi de  $22,9 \pm 24,2\%$ . Apesar de as concentrações séricas médias de colesterol total e de LDL-c não terem sofrido alterações significativas entre as fases, o aumento observado nas concentrações de HDL-c foram suficientes para melhorar os índices de Castelli I e II, os quais foram reduzidos em média 12,6 e 13,4%, respectivamente após o consumo das castanhas-do-brasil. A avaliação do consumo de ácidos graxos monosaturados, poliinsaturados e saturados não evidenciou diferenças entre as fases pré e pós-suplementação. Entretanto, é importante destacar as limitações referentes a avaliação do consumo alimentar, principalmente em indivíduos obesos, como por exemplo os sub-relatos extensamente documentos na literatura, além das deficiências encontradas nas tabelas de composição alimentar, não sendo possível excluir completamente o efeito do perfil de ácidos graxos das castanhas na melhora dos parâmetros lipídicos séricos. Padrões semelhantes de melhora no perfil lipídico já foram observados em trabalhos que utilizaram pistache (EDWARDS et al., 1999; KOCYIGIT, KOYLU e KELES, 2006; SHERIDAN et al., 2007), noz macadâmia (GARG, BLAKE e WILLS, 2003) ou amêndoas (JENKINS et al., 2002). Alguns estudos, entretanto, não observaram aumentos significativos nas concentrações de HDL-c com o consumo de nozes (ROS et al., 2004) ou amendoim (ALPER e MATTES, 2003). Ainda, existem alguns que observaram reduções nestes valores com o consumo de noz macadâmia (CURB et al., 2000; GRIEL et al., 2008). Strunz et al. (2008) não encontraram diferenças significativas nas concentrações de HDL-c após o consumo de 45 g de castanha-do-brasil por um período de quinze dias. Entretanto, estes autores verificaram uma recepção significativamente maior de ésteres de colesterol por parte das partículas de HDL, o que

---

poderia influenciar ambos o metabolismo e a função desta lipoproteína no transporte reverso de colesterol, facilitando a eliminação do colesterol na bile em detrimento de seu transporte e depósito em artérias pelas lipoproteínas Apo-B, configurando, por consequência, um mecanismo antiaterogênico.

A avaliação da ingestão de outros nutrientes considerados antioxidantes, dentre eles, as vitaminas C e E e os minerais zinco, cobre e manganês não revelou diferenças importantes entre as duas fases do estudo. Portanto, sugere-se que os efeitos observados podem, de maneira geral, ser atribuídos exclusivamente ao conteúdo de selênio fornecido pelas castanhas.

Após o consumo das castanhas, não se observaram alterações significativas nos valores de excreção urinária de 8-isoprostanos. Considerando sua superioridade como marcador de estresse oxidativo e o fato de que os níveis não se alteram em resposta ao perfil de lipídeos da alimentação, é possível inferir que a suplementação com castanha-do-brasil durante dois meses não foi suficiente para reduzir significativamente a excreção de 8-isoprostanos nestas participantes, ainda que esta redução tenha sido observada em 62% delas e que os níveis médios observados estavam dentro da faixa normal recomendada.

Os resultados referentes ao ensaio do cometa não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre as duas fases do estudo ( $77,3 \pm 21,6 \mu\text{m}$  x  $72,2 \pm 28,1 \mu\text{m}$ ,  $p=0,1295$ ). Entretanto, observou-se correlação negativa marginal entre os tamanhos dos cometas e a atividade eritrocitária total da GPx ( $r=-0,3052$ ,  $p<0,07$ ).

Um dos principais objetivos do trabalho foi analisar a resposta de todos os parâmetros avaliados à suplementação com castanha-do-brasil, relacionando-os ao polimorfismo Pro198Leu no gene que codifica para a GPx1. Inicialmente, com relação à prevalência deste polimorfismo, os dados obtidos foram bastante semelhantes àqueles observados por Forsberg, De Faire e Morgenstern (1999), por Fosberg et al. (2000) e por

Ravn-Haren et al. (2006), com algumas pequenas diferenças no percentual de indivíduos homozigotos para a variante. Foram, entretanto, diferentes daqueles observados por Kuzuya et al. (2008) e Lei et al. (2009), os quais verificaram prevalência muito menor do alelo variante. Os dois primeiros estudos não verificaram diferenças significativas na atividade da enzima GPx entre os diferentes genótipos. Já Ravn-Haren et al. (2006), observaram uma redução de 5% na atividade da enzima para cada cópia adicional do alelo variante, em mulheres com câncer de mama e em controles saudáveis. Células de câncer de mama que expressaram o alelo variante apresentaram resposta menor à estimulação da atividade da GPx1 observada durante a suplementação com selênio, em comparação ao alelo selvagem. Lei et al. (2009), verificaram que indivíduos heterozigotos em conjunto com os homozigotos para a variante apresentavam risco 123% maior de desenvolver a doença de Keshan quando comparados aos homozigotos selvagens. Além disso, a frequência de alelos variantes foi maior nos pacientes residentes nas áreas endêmicas do que nos controles externos e, a frequência destes alelos foi menor à medida que a concentração sanguínea de selênio foi mais elevada. Quando comparados aos indivíduos homozigotos selvagens, aqueles heterozigotos ou homozigotos para a variante também apresentaram atividade da GPx1 e concentrações de selênio significativamente menores. A atividade da GPx1 foi significativamente maior em cardiomiócitos transfectados com o alelo selvagem e estes também foram mais responsivos a suplementação com selênio do que aqueles que continham o alelo variante.

No presente trabalho, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas nas concentrações sanguíneas de selênio e na atividade eritrocitária total da GPx entre os diferentes genótipos, tanto na fase pré quanto na fase pós-suplementação. Entretanto, as participantes que tiveram pelo menos um alelo variante apresentaram atividade da GPx 16,4% menor do que as homozigotas selvagens na fase pré-suplementação. Após o consumo das

castanhas-do-brasil, os valores da atividade da GPx foram 15,5% menores nas participantes que apresentaram alelos variantes.

Jablosnka et al. (2009), também não observaram diferenças significativas entre as concentrações de selênio plasmático e a atividade da GPx1 entre os diferentes genótipos relacionados ao polimorfismo Pro198Leu em indivíduos saudáveis. Estes autores verificaram, entretanto, que a associação destes parâmetros com o polimorfismo não foi a mesma entre os diferentes alelos. A atividade da GPx1 se correlacionou positivamente com as concentrações de selênio em indivíduos carreadores do alelo selvagem ( $r=0,44$ ,  $p<0,001$ ), porém o mesmo não ocorreu naqueles indivíduos homocigotos para a variante ( $r=0,25$ ,  $p=0,45$ ). Concluiu-se, a partir deste estudo, que o referido polimorfismo apresenta importância orgânica funcional, a qual é relacionada com respostas distintas da atividade da GPx1 ao suprimento de selênio, sendo que indivíduos carreadores de alelos variantes apresentam níveis reduzidos de atividade enzimática quando comparados a indivíduos com genótipo selvagem.

No presente estudo, também foram observadas tais diferenças entre os genótipos, porém, relacionadas à associação da atividade da GPx com as concentrações eritrocitárias de selênio, tanto antes quanto após a suplementação com castanha-do-brasil. Nas participantes com genótipo Pro/Pro observou-se correlação positiva daqueles marcadores ( $r=0,5965$ ,  $p<0,01$ ;  $r=0,4291$ ,  $p<0,08$ ) nas fases pré e pós-suplementação, respectivamente. Para as voluntárias carreadoras de alelos variantes, não houve esta interação ( $r=0,4386$ ,  $p=0,117$  e  $r=-0,2082$ ,  $p=0,475$  para Pro/Leu); ( $r=0,6240$ ,  $p=0,261$  e  $r=-0,5303$ ,  $p=0,358$  para Leu/Leu) nas duas fases respectivas. Mesmo considerando o tamanho amostral reduzido, estes resultados estão de acordo com àqueles evidenciados pelos autores citados anteriormente. Estes dados, considerados em conjunto, sugerem um direcionamento alterado do mineral para a síntese de



selenoproteínas em indivíduos que apresentam pelo menos um alelo variante com relação a este polimorfismo.

Outros parâmetros bioquímicos analisados como concentrações plasmáticas de TBARS e perfil lipídico sérico foram consideravelmente influenciados pela suplementação com castanhas-do-brasil, conforme observado anteriormente. Entretanto, estas alterações não foram relacionadas aos genótipos, uma vez que não houve diferenças naqueles marcadores quando avaliados entre cada perfil de genótipo. Por outro lado, os resultados obtidos no ensaio do cometa foram significativamente diferentes entre os genótipos. Participantes homozigotas para o alelo selvagem apresentaram redução no índice de danos em DNA, o que não ocorreu naquelas carreadoras de um ou dois alelos variantes. Além disso, estas últimas apresentaram valores de danos significativamente maiores em relação às homozigotas selvagens. Este fato também foi observado quando estas participantes foram agrupadas àquelas com genótipo heterozigoto. Estes resultados podem estar relacionados ao mecanismo antioxidante, considerando a atividade reduzida da GPx nas voluntárias carreadoras de um ou dois alelos variantes. Ainda, nas participantes homozigotas para a variante, os valores de danos em DNA se correlacionaram negativamente com a atividade da GPx na fase pós-suplementação ( $r=-0,9379$ ,  $p<0,02$ ), o que não ocorreu naquelas heterozigotas ( $r=-0,0348$ ,  $p=0,906$ ) e nas homozigotas selvagens ( $r=-0,2086$ ,  $p=0,406$ ).

## 8. CONCLUSÕES

Inicialmente, a comparação dos dados obtidos com aqueles da literatura científica permite concluir que indivíduos com obesidade mórbida apresentam níveis elevados de estresse oxidativo, bem como um *status* de deficiência de selênio. Considerados em conjunto e cautelosamente avaliados, todos os dados apresentados sugerem um efeito benéfico do consumo de castanha-do-brasil como fonte de selênio. Apesar do aumento observado nos valores plasmáticos de TBARS, a suplementação também promoveu efeitos benéficos em outros marcadores e não alterou as concentrações urinárias de 8-isoprostanos. Demonstrou-se também a influência do polimorfismo Pro198Leu no gene que codifica para a GPx1 sobre as concentrações sanguíneas de selênio e a atividade eritrocitária total da GPx. Pode-se concluir que há uma interação entre este polimorfismo e o *status* de selênio, bem como dos níveis antioxidantes. Estes últimos podem estar também associados à presença de maiores danos em DNA naquelas participantes com alelos variantes.

Apesar de algumas limitações, principalmente relacionadas ao tamanho amostral, este estudo foi bem controlado, o que permite concluir que os resultados são consideravelmente significantes. De forma semelhante a outros estudos da área de nutrigenética, os resultados não podem ser generalizados para outras populações, visto que diferenças raciais e étnicas relacionadas ao estilo de vida podem exercer influência sobre estes. Certamente, estudos com maior número de participantes são necessários para confirmar os dados obtidos no presente estudo.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEGRIA, A.; BARBERÁ, R.; CLEMENTE, G.; FARRÉ, R.; GARCÍA, M.J.; LAGARDA, M.J. Selenium and glutathione peroxidase reference values in whole blood and plasma of a reference population living in Valencia, Spain. **J. Trace Elem. Med. Res.**, v. 10, n. 4, p. 223-8, 1996.

ALPER, C.M.; MATTES, R.D. Peanut Consumption Improves Indices of Cardiovascular Disease Risk in Healthy Adults. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 22, n. 2, p. 133-41, 2003.

ANDRADE-WARTHA, E.R.S. Propriedades antioxidantes de clones do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale L.*): efeito sobre a lipoperoxidação e enzimas participantes do sistema antioxidante de defesa do organismo animal. Tese de Doutorado. FCF/USP. São Paulo, 2007. 111 p.

ARNAUD, J.; BERTRAIS, S.; ROUSSEL, A.M.; ARNAULT, N.; RUFFIEUX, D.; FAVIER, A.; BERTHELIN, S.; ESTAQUIO, C.; GALAN, P.; CZERNICHOW, S.; HERCBERG, S. Serum selenium determinants in French adults: the SU.VI.M.AX study. **Br. J. Nutr.**, v. 95, p. 313-20, 2006.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC**. 13<sup>a</sup> ed. Washington: Assoc. Off. Agric. Chem., 1980. 858p.

BANERJEE, A.K.; MANDAL, A.; CHANDA, D.; CHAKRABORTI, S. Oxidant, antioxidant and physical exercise. **Molec. Cel. Biochem.**, v. 253, p. 307-12, 2003.

BEATON, G.H. Approaches to analysis of dietary data: relationship between planned analyses and choice of methodology. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 59, suppl., p. 253-61, 1994.

BEHR, C.S. Efeito de uma dieta enriquecida com castanha-do-Brasil (*Bertolletia excelsa, L.*) no estado nutricional relativo ao selênio de idosos não institucionalizados. Dissertação de Mestrado – FCF – FEA – FSP/USP. São Paulo, 2004. 99p.

BLOCK, G., DIETRICH, M., NORKUS, E.P., MORROW, J.D., HUDES, M., CAAN, B., PACKER, L. Factors Associated with Oxidative Stress in Human Populations. **Am J Epidemiol.**, v. 156, n. 3, p. 274-85, 2002.

BORTOLI, M.C. Avaliação dos níveis sanguíneos do hormônio tireoidiano ativo (T3) e do estado nutricional relativo ao selênio de mulheres residentes em área de exposição ao mercúrio. Tese de Doutorado – FCF/USP. São Paulo, 2010. 130p.

BOULOUMIE, A.; MARUMO, T.; LAFONTAN, M.; BUSSE, R. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. **Faseb J.**, v. 13, p. 1231-8, 1999.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 27, n. 9/10, p. 951-65, 1999.

BROWN, K.M.; ARTHUR, J.R. Selenium, selenoproteins and human health: a review. **Public Health Nutr.**, v. 4 (2B), p. 593-9, 2001.

CASTELLI, W.P.; ABBOTT, R.D.; MCNAMARA, P.M. Summary estimates of cholesterol used to predict coronary heart disease. **Circulation**, v. 67, n. 4, p. 730-4, 1983.

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. 801-2, 1995.

CHUANG, CH.; HU, ML. Use of whole blood directly for single-cell gel electrophoresis (comet) assay in vivo and white blood cells for in vitro assay. **Mut. Res.**, v. 564, p. 75-82, 2004.

CHUNHIENG, T.; PÉTRITIS, K.; ELFAKIR, C.; BROCHIER, J.; GOLI, T.; MONTET, D. Study of Selenium Distribution in the Protein Fractions of the Brazil Nut, *Bertholletia excelsa*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 4318-22, 2004.

COLLINS, A.R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair - Principles, Applications, and Limitations. **Mol. Biotechnol.**, v. 26, n. 3, p. 249-61, 2004.

COUTINHO, V.F. Efeito da suplementação com castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*, *H.B.K.*) no estado nutricional de praticantes de capoeira em relação ao selênio. Tese de Doutorado. FCF/USP. São Paulo, 2003. 175p.

CURB, J.D.; WERGOWSKIE, G.; DOBBS, J.C.; ABBOTT, R.D.; HUANG, B. Serum Lipid Effects of a High-Monounsaturated Fat Diet Based on Macadamia Nuts. **Arch. Intern. Med.**, v. 160, p.1154-8, 2000.

DANDONA, P.; MOHANTY, P.; GHANIM, H.; ALJADA, A.; BROWNE, R.; HAMOUDA, W.; PRABHALA, A.; AFZAL, A.; GARG, R. The Suppressive Effect of Dietary Restriction and Weight Loss in the Obese on the Generation of Reactive Oxygen Species by Leukocytes, Lipid Peroxidation, and Protein Carbonylation. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 86, p. 355-62, 2001.

DAVÌ, G.; GUAGNANO, M.T.; CIABATTONI, G.; BASILI, S.; FALCO, A.; MARINOPICCOLI, M.; NUTINI, M.; SENSI, S.; PATRONO, C. Platelet activation in obese women. Role of inflammation and oxidant stress. **JAMA**, v. 288, n. 16, p. 2008-14, 2002.

DEL RIO, D.; STEWART, A.J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, v. 15, n. 4, p. 316-28, 2005.

DOTAN, Y.; LICHTENBERG, D.; PINCHUK, I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. **Prog. Lipid Res.**, v. 43, p. 200-27, 2004.

EDWARDS, K.; KWAW, I.; MATUD, J.; KURTZ, I. Effect of Pistachio Nuts on Serum Lipid Levels in Patients with Moderate Hypercholesterolemia. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 18, n. 3, p. 229-32, 1999.

ESPÍNDOLA, R.M.; MAZZANTINI, R.P.; ONG, T.P.; CONTI, A.; HEIDOR, R.; MORENO, F.S. Geranylgeraniol and  $\beta$ -ionone inhibit hepatic preneoplastic lesions, cell proliferation, total plasma cholesterol and DNA damage during the initial phases of hepatocarcinogenesis, but only the former inhibits NF- $\kappa$ B activation. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 6, p. 1091-9, 2005.

FERREIRA, K.S.; GOMES, J.C.; BELLATO, C.R.; JORDÃO, C.P. Concentrações de selênio em alimentos consumidos no Brasil. **Rev Panam Salud Publica**, v. 11, n. 3, p. 172-7, 2002.

FLOHÉ, L.; BRIGELIUS-FLOHÉ, L.; SALIOU, C.; TRABER, M.G.; PACKER, L. Redox regulation of NF-Kappa B activation. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 22, n. 6, p. 1115-26, 1997.

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 Mol. Dis.**, v. 26, n. 5, p. 423-6, 2000.

FORSBERG, 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. **Hum. Mutat.**, v. 13, p. 294-300, 1999.

FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. **Clin. Chem.**, v. 18, n. 6, p. 499-502, 1972.

GARG, M.L.; BLAKE, R.J.; WILLS, R.B.H. Macadamia Nut Consumption Lowers Plasma Total and LDL Cholesterol Levels in Hypercholesterolemic Men. **J. Nutr.**, v. 133, p. 1060-3, 2003.

GONZAGA, I.B. Avaliação nutricional relativa ao selênio em crianças com dieta enriquecida de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*, L.). Tese de Doutorado. FCF/USP. São Paulo, 2002, 157 p.

GONZAGA, I.B.; MARTENS, A.; COZZOLINO, S.M.F. Selênio. In: COZZOLINO, S.M.F., ed. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. Barueri: Manole, 2005. p.539-77.

GRIEL, A.E.; CAO, Y.; BAGSHAW, D.D.; CIFELLI, A.M.; HOLUB, B.; KRIS-ETHERTON, P.M. A Macadamia Nut-Rich Diet Reduces Total and LDL-Cholesterol in Mildly Hypercholesterolemic Men and Women. **J. Nutr.**, v. 138, p. 761-7, 2008.

HALLIWELL, B; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanisms, measurement, and significance. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 57 (suppl), p. 715S-25S, 1993.

HININGER, I.; CHOLLAT-NAMY, A.; SAUVAIGO, S.; OSMAN, M.; FAURE, H.; CADET, J.; FAVIER, A.; ROUSSEL, A-M. Assessment of DNA damage by comet assay on frozen total blood: method and evaluation in smokers and non-smokers. **Mut. Res.**, v. 558, p. 75-80, 2004.

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 Res.**, v. 63, n. 12, p. 3347-51, 2003.

HU, Y.J.; LI, Z.F.; DIAMOND, A.M. Enhanced discrimination of single nucleotide polymorphism in genotyping by phosphorothioate proofreading allele-specific amplification. **Anal. Biochem.**, v. 369, p. 54-9, 2007.

INAL, M.E.; KANBAK, G.; SUNAL, E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. **Clin. Chim. Acta**, v. 305, n. 1-2, p. 75-80, 2001.

INGELSSON, E.; SCHAEFER, E.J.; CONTOIS, J.H.; MCNAMARA, J.R.; SULLIVAN, L.; KEYES, M.J.; PENCINA, M.J.; SCHOONMAKER, C.; WILSON, P.W.F.; D'AGOSTINO, F.B.; VASAN, R.S. Clinical Utility of Different Lipid Measures for Prediction of Coronary Heart Disease in Men and Women. **JAMA**, v. 298, n. 7, p. 776-85, 2007.

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

INSTITUTE OF MEDICINE. NATIONAL ACADEMIES PRESS. **Dietary reference intakes: applications in dietary planning.** Washington: National Academy Press, 2003. Disponível em: <http://www.nap.edu/openbook/0309088534/html/>. Acesso em: 07 Jun 2005.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.** v. 1, 2ª. ed., São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1976. p. 21-22; 24-25; 36-37.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. POF 2002-2003. Análise da Disponibilidade Domiciliar de Alimentos e do Estado Nutricional no Brasil. Rio de Janeiro, IBGE: 2004.

ISHIDA, K.; MORINO, T.; TAKAGI, K.; SUKENAGA, Y. Nucleotide sequence of a human gene for glutathione peroxidase. **Nucleic Acids Res.**, v. 15, n. 23, p. 10051, 1987.

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. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 48, n. 6., p. 383-6, 2009.

JAIME, P. C.; LATORRE, M. R. D. O. ; FORNÉS, N. A. S.; ZERBINI, C. A. F. Estudo comparativo entre dois métodos de ajuste energético do consumo de nutrientes. **Nutrire (SBAN)**, São Paulo, v. 26, p. 11-18, 2003.

JENKINS, D.J.A.; KENDALL, C.W.C.; MARCHIE, A.; JOSSE, A.R.; NGUYEN, T.H.; FAULKNER, D.A.; LAPSLEY, K.G.; BLUMBERG, J. Almonds Reduce Biomarkers of Lipid Peroxidation in Older Hyperlipidemic Subjects. **J. Nutr.**, v. 138, p. 908-13, 2008.

JENKINS, D.J.A.; KENDALL, C.W.C.; MARCHIE, A.; PARKER, T.L.; CONNELLY, P.W.; QIAN, W.; HAIGHT, J.S.; FAULKNER, D.; VIDGEN, E.; LAPSLEY, K.G.; SPILLER, G.A. Dose Response of Almonds on Coronary Heart Disease Risk Factors: Blood Lipids, Oxidized Low-Density Lipoproteins, Lipoprotein(a), Homocysteine, and Pulmonary Nitric Oxide A Randomized, Controlled, Crossover Trial. **Circulation**, v. 106, p. 1327-32, 2002.

KANNAMKUMARATH, S.S.; WROBEL, K.; WROBEL, K.; VONDERHEIDE, A.; CARUSO, J.A. HPLC-ICP-MS determination of selenium distribution and speciation in different types of nut. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 373, p. 454-60, 2002.

KANNAMKUMARATHA, S.S.; WROBELB, K.; WUILLOUDA, R.G. Studying the distribution pattern of selenium in nut proteins with information obtained from SEC-UV-ICP-MS and CE-ICP-MS. **Talanta**, v. 66, p. 153-9, 2005.

KAUWELL, G.P.A. Emerging Concepts in Nutrigenomics: A Preview of What Is to Come. **Nutr. Clin. Pract.**, v. 20, n. 1, p. 75-87, 2005.

KEANEY, J.F. JR., LARSON, M.G., VASAN, R.S., WILSON, P.W.F., LIPINSKA, I., COREY, D., MASSARO, J.M., SUTHERLAND, P., VITA, J.A., BENJAMIN, E.J. Obesity and Systemic Oxidative Stress. Clinical Correlates of Oxidative Stress in The Framingham Study. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 23, p. 434-439, 2003.

KIMMONS, J.E.; BLANCK, M.; TOHILL, B.C.; ZHANG, J.; KHAN, L.K. Associations Between Body Mass Index and the Prevalence of Low Micronutrient Levels Among US Adults. **MedGenMed.**, v. 8, n. 4, p. 59, 2006.

KOCYIGIT, A.; KOYLU, A.A.; KELES, H. Effects of pistachio nuts consumption on plasma lipid profile and oxidative status in healthy volunteers. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, v. 16, p. 202-9, 2006.

KONUKOGLU, D.; SERIN, O.; ERCAN, M.; TURHAN, M.S. Plasma homocysteine levels in obese and non-obese subjects with or without hypertension; its relationship with oxidative stress and copper. **Clin. Biochem.**, v. 36, p. 405-8, 2003.

KRYUKOV, G.V.; CASTELLANO, S.; NOVOSELOV, S.V.; LOBANOV, A.V.; ZEHTAB, O.; GUIGO, R.; GLADYSHEV, V.N. Characterization of mammalian selenoproteomes. **Science**, v. 300, p. 1439-43, 2003.

KUZUYA, M.; ANDO, F.; IGUCHI, A.; SHIMOKATA, I. Glutathione peroxidase 1 Pro198Leu variant contributes to the metabolic syndrome in men in a large Japanese cohort. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 87, p. 1939-44, 2008.

LEI, C.; NIU, X.; WEI, J.; ZHU, J.; ZHU, Y. Interaction of glutathione peroxidase-1 and selenium in endemic dilated cardiomyopathy. **Clin. Chim. Acta**, v. 399, p. 102-8, 2009.

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

MARITIM, A.C.; SANDERS, R.A.; WATKINS III, J.B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, v. 17, p. 24-38, 2003.

MARTENS, A.V.; COZZOLINO, S.M.F. Mapeamento da distribuição de selênio em território brasileiro por meio da análise de alimentos nativos: feijão (*faseolus vulgaris L.*) e carne bovina para o consumo humano e águas e solo oriundos. Relatório Científico encaminhado à FAPESP. Processo nº 00/11578-3, 2002.

MATÉS, J.M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; DE CASTRO, I.N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clin. Biochem.**, v. 32, n. 8, v. 595-603, 1999.

MEUILLET, E.; STRATTON, S.; CHERUKURI, D.P.; GOULET, A.; KAGEY, J.; PORTERFIELD, B.; NELSON, M.A. Chemoprevention of prostate cancer with selenium: an update on current clinical trials and preclinical findings. **J. Cel. Biochem.**, v. 91, p. 443-58, 2004.

MOHN, A.; CATINO, M.; CAPANNA, R.; GIANNINI, C.; MARCOVECCHIO, M.; CHIARELLI, F. Increased Oxidative Stress in Prepubertal Severely Obese Children: Effect of a Dietary Restriction-Weight Loss Program. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 90, n. 5, p. 2653-8, 2005.

MOLLER, P. Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. **Mut. Res.**, v. 612, p. 84-104, 2006.

MONTUSCHI P, BARNES PJ, ROBERTS II LJ. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. **FASEB J.**, v. 18, p. 1791-800, 2004.



MOODLEY, R.; KINDNESS, A.; JONNALAGADDA, S.B. Elemental composition and chemical characteristics of five edible nuts (almond, Brazil, pecan, macadamia and walnut) consumed in Southern Africa. **J. Environ. Sci. Health B**, v. 42, n. 5, p. 585-91, 2007.

NADIN, S.B.; VARGAS-ROIG, L.M.; CIOCCA, D.R. A silver staining method for single-cell gel assay. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 49, n. 9, p. 1183-6, 2001.

NÈVE, J. Human selenium supplementation as assessed by changes in blood selenium concentration and glutathione peroxidase activity. **J. Trace Elem. Med. Biol.**, v. 9, p. 65-73, 1995.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem.**, v.95, p.351-358, 1979.

OLUSI, S.O. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 26, p. 1159-64, 2002.

ORTUÑO, J.; ROS, G.; PERIAGO, M.J.; MARTÍNEZ, C.; LÓPEZ, G.; RODRIGO, J. Importancia nutricional del selenio. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v. 47, n.1, p. 6-13, 1997.

OZATA, M.; MERGEN, M.; OKTENLI, C.; AYDIN, A.; SANISOGLU, S.Y.; BOLU, E.; YILMAZ, M.I.; SAYAL, A.; ISIMER, A.; OZDEMIR, I.C. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. **Clin. Biochem.**, v. 35, p. 627-31, 2002.

PAPP, L. V.; LU, J.; HOLMGREN, A.; KHANNA, K. H. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. **Antioxid. Redox. Signal.**, 9:755-806, 2007.

PLEBAN, P.A.; MUNYANI, A.; BEACHUM, J. Determination of selenium concentration and glutathione peroxidase activity in plasma and erythrocytes. **Clin. Chem.**, v. 28, n. 2, p. 311-6, 1982.

RAMOS, C.M.P; BORA, P.S. Extraction and Functional Characteristics of Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* HBK) Globulin. **Food Sci. Tech. Int.**, v. 9, n. 4, p. 265-5, 2003.

RAVN-HAREN, G.; OLSEN, A.; TJØNNELAND, A.; DRAGSTED, L.O.; NEXØ, B.A. WALLIN, A.; OVERVAD, K.; RAASCHOU-NIELSEN, O.; VOGEL, U. Associations between GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study. **Carcinogenesis**, v. 27, n.4, p. 820-25, 2006.

REILLY, C. **Selenium in food and health**. London: Chapman & Hall, 1996. 338p.

ROCHA, A.V. Estado nutricional relativo ao selênio de crianças residentes em duas localidades de Rondônia, Amazônia Ocidental. Dissertação de Mestrado. FCF/USP. São Paulo, 2009. 118p.

RODRIGUEZ, S.; GAUNT, T.R.; DAY, N.M. Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies. **Am. J. Epidemiol.**, v. 169, n. 4, p. 505-14, 2009.

ROS, E.; NÚÑEZ, I.; PÉREZ-HERAS, A.; SERRA, M.; GILABERT, R.; CASALS, E.; DEULOFEU, R. A Walnut Diet Improves Endothelial Function in hypercholesterolemic Subjects: A Randomized Crossover Trial. **Circulation**, v. 109, p. 1609-14, 2004.

RYAN, E.; GALVIN, K.; O'CONNOR, T.P.; MAGUIRE, A.R.; O'BRIEN, N.M. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of brazil, pecan, pine, pistachio and cashew nuts. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, v. 57, n. 3/4, p. 219-28, 2006.

SHERIDAN, M.J.; COOPER, J.N.; ERARIO, M.; CHEIFETZ, C.E. Pistachio Nut Consumption and Serum Lipid Levels. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 26, n. 2, p. 141-8, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 88, supl. 1, p. 2-19, 2007.

STRAIF, D.; WERZ, O.; KELLNER, R.; BAHR, U.; STEINHILBER, D. Glutathione peroxidase-1 but not -4 is involved in the regulation of cellular 5-lipoxygenase activity in monocytic cells. **Biochem. J.**, v. 349, p. 455-61, 2000.

STRUNZ, C.C.; OLIVEIRA, T.V.; VINAGRE, J.C.M.; LIMA, A.; COZZOLINO, S.; MARANHÃO, R.C. Brazil nut ingestion increased plasma selenium but had minimal effects on lipids, apolipoproteins, and high-density lipoprotein function in human subjects. **Nutr. Res.**, v. 28, p. 151-5, 2008.

SU, Y.; LIU, X.M.; SUN, Y.M.; JIN, H.B.; FU, R.; WANG, Y.Y.; WU, Y.; LUAN, Y. The relationship between endothelial dysfunction and oxidative stress in diabetes and prediabetes. **Int. J. Clin. Pract.**, v. 62, n. 6, p. 877-82, 2008.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D.M.; TEW, K.D. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. **Biomed. Pharmacoth.**, v. 57, p. 134-44, 2003.

THOMSON, C.D. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 58, p. 391-402, 2004.

THOMSON, C.D.; CHISHOLM, A.; MCLACHLAN, S.K.; CAMPBELL, J.M. Brazil nuts: an effective way to improve selenium status. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 87, p. 379-84, 2008.

TILG, H; MOSCHEN, A.R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, n. 10, p. 772-83, 2006.

TURK, H.M.; SEVINC, A.; CAMCI, C.; CIGLI, A.; BUYUKBERBER, S.; SAVLI, H.; BAYRAKTAR, N. Plasma lipid peroxidation products and antioxidant enzyme activities in patients with type 2 diabetes mellitus. **Acta Diabetol.**, v. 39, p. 117-22, 2002.

U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2007. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 21. Nutrient Data Laboratory Home Disponível em: <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata>. Acesso em: 14.Mai.2009.

USTUNDAG, B.; GUNGOR, S.; AYGÜN, A.S.; TURGUT, M.; YILMAZ, E. Oxidative status and serum leptin levels in obese prepubertal children. **Cell. Biochem. Funct.**, v. 25, p. 479-83, 2007.

UTOMO, A.; JIANG, X.; FURUTA, S.; YUN, J.; LEVIN, D.S.; WANG, Y.C.; DESAI, K.V.; GREEN, J.E.; CHEN, P.L.; LEE, W.H. Identification of a novel putative non-selenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential for alleviating oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p.43522-9, 2004.

VAN ASSENDELFT, O.W. The measurement of hemoglobin. In: IZAK, G.; LEWIS, S.M., eds. **Modern concepts in hematology: symposia of the International Committee for Standardization in Hematology**. New York: Academic Press, 1972. p.14-25.

VINCENT, H.K.; TAYLOR, A.G. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. **Int. J. Obes.**, v. 30, p. 400-18, 2006.

VONDERHEIDE, A.P.; WROBEL, K.; KANNAMKUMARATH, S.S.; B'HYMER, C.; MONTES-BAYÓN, M.; LEÓN, C.P.; CARUSO, J.A. Characterization of Selenium Species in Brazil Nuts by HPLC-ICP-MS and ES-MS. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 5722-8, 2002.

WINTERBOURN, C.C.; GUTTERIDGE, J.M.; HALLIWELL, B. Doxorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O<sub>2</sub>. **J. Free Radic. Biol. Med.**, v. 1, p. 43-9, 1985.

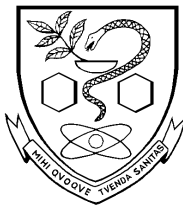
WHITEHOUSE, R.C.; PRASAD, A.S.; RABBANI, P.I.; COSSACK, Z.T. Zinc in plasma, neutrophils, lymphocytes, and erythrocytes as determined by flameless atomic absorption spectrophotometry. **Clin. Chem.**, v.28, n.3, p.475-80, 1982.

World Health Organization. Diet nutrition and the prevention of cronic diseases. Report of a joint FAO/WHO Expert Consultation. Geneva: WHO; 2003. [Technical Report Series 916].

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol. Rev.**, v. 74, p. 139-62, 1994.

## **10. ANEXOS OBRIGATÓRIOS**

1. Cópia do documento: Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado;
2. Parecer dos Comitês de Ética em Pesquisa;
3. Currículo Lattes;
4. Ficha de Aluno atualizada, emitida pelo FenixWeb.



**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](mailto:pgfarma@usp.br), (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco  
Presidente da CPG/FCF/USP



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 60/2007

São Paulo, 08 de maio de 2007.

Ilmo(a). Sr(a).  
Cristiane Cominetti  
Orientador Profa. Silvia M. Franciscato Cozzolino  
FBA

Prezado(a) Senhor(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 26 de março de 2007, **APROVOU** o projeto "Efeitos da suplementação com castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) sobre o estresse oxidativo em mulheres obesas e sua relação com o polimorfismo Pro198Leu no gene da glutathiona peroxidase 1" (Protocolo CEP nº 409) apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Valentina Porta  
Coordenadora do Comitê de Ética Pesquisa  
FCF/USP

## APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 30/01/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 0897/07, intitulado: "**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM CASTANHA-DO-BRASIL (BERTHOLLETIA EXCELSA H.B.K.) SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO EM MULHERES OBESAS E SUA RELAÇÃO COM O POLIMORFISMO PRO198LEU NO GENE DA GLUTATIONA PEROXIDASE 1**" apresentado pelo Departamento de **GASTROENTEROLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Arthur Belarmino Garrido Junior**

Pesquisador (a) Executante: **Cristiane Cominetti**

CAPPesq, 12 de Fevereiro de 2008



Prof. Dr. Eduardo Massad  
**Presidente da Comissão de  
Ética para Análise de Projetos  
de Pesquisa**

**Cristiane Cominetti**  
Curriculum Vitae

Fevereiro/2010



## Cristiane Cominetti

Curriculum Vitae

---

### Dados Pessoais

**Nome** Cristiane Cominetti  
**Filiação** Pedro Cominetti e Maria Ivone Cominetti  
**Nascimento** 25/11/1980 - Pinhalzinho/SC - Brasil  
**Carteira de Identidade** 3290744 SSP - SC - 27/08/1998  
**CPF** 02770387901

**Endereço residencial** Av. Escola Politécnica, 4600  
Rio Pequeno - Sao Paulo  
05350-000, SP - Brasil  
Telefone: 11 35780155

**Endereço profissional** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas,  
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental  
Av. Professor Lineu Prestes, 580  
Cidade Universitária - Sao Paulo  
05508-900, SP - Brasil  
Telefone: 11 30913625

### Endereço eletrônico

e-mail para contato : [ccominet@usp.br](mailto:ccominet@usp.br)  
e-mail alternativo : [ccominetti@yahoo.com](mailto:ccominetti@yahoo.com)

---

### Formação Acadêmica/Titulação

- 2006** Doutorado em Ciências dos Alimentos.  
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil  
Título: Efeitos da suplementação com castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) sobre o estresse oxidativo em mulheres obesas e sua relação com o polimorfismo Pro198Leu no gene da glutathione peroxidase 1  
Orientador: Sílvia Maria Franciscato Cozzolino  
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2004 - 2006** Mestrado em Ciências dos Alimentos.  
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil  
Título: Avaliação do Estado Nutricional Relativo ao Zinco de Pacientes Submetidos à Cirurgia Bariátrica (Gastroplastia com Derivação em Y de Roux), Ano de obtenção: 2006  
Orientador: Sílvia Maria Franciscato Cozzolino  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 1999 - 2002** Graduação em Nutrição.  
Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO, Guarapuava, Brasil
- 

### Formação complementar

- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Bioestatística (Módulo Básico).  
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
- 2008 - 2008** Extensão universitária em PCR: Planejamento e Otimização.  
Instituto de Ciências Biomédicas IV, ICB IV, Brasil
- 2008 - 2008** Extensão universitária em Fundamentos Teóricos dos Métodos de Biologia Molecular

	Aplicados à Pesquisa e ao Diagnóstico Clínico. Instituto de Ciências Biomédicas IV, ICB IV, Brasil
<b>2008 - 2008</b>	Curso de curta duração em Bioestatística (Módulo Avançado). Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
<b>2007 - 2007</b>	Curso de curta duração em Aplicações da Bioestatística em Estudos de Nutriçã. Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, SBAN, Sao Paulo, Brasil
<b>2005 - 2005</b>	Curso de curta duração em Biologia Molecular Aplicada à Nutrição. Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, SBAN, Sao Paulo, Brasil
<b>2002 - 2002</b>	Curso de curta duração em Obesidade na Prática do Consultório. Universidade do Vale do Itajaí, UNIVALI, Itajai, Brasil
<b>2002 - 2002</b>	Curso de curta duração em Avaliação da Composição Corporal Aplicada à Clínic. Universidade do Vale do Itajaí, UNIVALI, Itajai, Brasil
<b>2001 - 2001</b>	Extensão universitária em Avaliação e Educação Nutricional da População de G. Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO, Guarapuava, Brasil

---

## Atuação profissional

### 1. Universidade de São Paulo - USP

---

#### Vínculo institucional

<b>2006 - Atual</b>	Vínculo: Pesquisa e desenvolvimento , Enquadramento funcional: Doutoranda , Carga horária: 40, Regime: Dedicção Exclusiva
<b>2005 - 2005</b>	Vínculo: Estagiário , Enquadramento funcional: Monitor , Carga horária: 6, Regime: Parcial

---

#### Atividades

##### **07/2009 - 07/2009** Pós-graduação, Interunidades em Nutrição Humana Aplicada

*Disciplinas Ministradas:*

*Ministrou a aula intitulada: "DRIs - Ingestões Dietéticas de Referência e Como Calcular a Prevalência de Inadequação de Ingestão de Nutrientes" na disciplina NHA5701 - Fundamentos Biológicos da Nutrição Humana Aplicada*

##### **04/2009 - 04/2009** Graduação, Graduação em Farmácia

*Disciplinas Ministradas:*

*Ministrou a aula intitulada "Composição de Alimentos e Recomendações de Ingestão", na disciplina Alimentos e Nutrição - FBA-413 , Ministrou a aula intitulada: "Biodisponibilidade de Nutrientes, na disciplina Alimentos e Nutrição - FBA-413*

##### **04/2008 - 04/2008** Graduação, Graduação em Farmácia

*Disciplinas Ministradas:*

*Ministrou a aula intitulada: "DRIs - Ingestões Dietéticas de Referência" na disciplina Alimentos e Nutrição Experimental FBA 0413*

##### **03/2008 - 03/2008** Pós-graduação, Curso de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde Pública

*Disciplinas Ministradas:*

*Coordenação de seminário e apresentação da aula intitulada "Selênio, Zinco e Ferro", na disciplina HNT-5736 Nutrição Humana*

**10/2006 - 10/2006** Pós-graduação, Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

*Disciplinas Ministradas:*

*Ministrou a aula intitulada: "Minerais e doenças crônicas não transmissíveis" na disciplina de Seminários em Ciência dos Alimentos e Nutrição FBA5870*

**02/2006 - Atual** Projetos de pesquisa, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

*Participação em projetos:*

*Efeitos da suplementação com castanha-do-Brasil (Bertholletia excelsa H.B.K.) sobre o estresse oxidativo em mulheres obesas e sua relação com o polimorfismo Pro198Leu no gene da glutathione peroxidase 1*

**08/2005 - 12/2005** Estágio, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

*Estágio:*

*Monitoria na disciplina de Bromatologia Básica - FBA200 - para o curso de Nutrição*

## 2. Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO

---

### Vínculo institucional

**2000 - 2002** Vínculo: Outro , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 20, Regime: Parcial

---

### Atividades

**07/2000 - 07/2002** Estágio

*Estágio:*

*Estágio extracurricular na disciplina de Técnica Dietética*

---

### Projetos

**2006 - Atual** Efeitos da suplementação com castanha-do-Brasil (Bertholletia excelsa H.B.K.) sobre o estresse oxidativo em mulheres obesas e sua relação com o polimorfismo Pro198Leu no gene da glutathione peroxidase 1

Descrição: Este trabalho tem por objetivo o estudo das relações entre obesidade, estresse oxidativo e o polimorfismo Pro198Leu no gene que codifica para a enzima glutathione peroxidase 1 (GPx1), além da utilização de um protocolo de suplementação alimentar com castanha-do-Brasil, fonte importante de selênio, como terapia antioxidante. Sabe-se que indivíduos obesos apresentam um grau de estresse oxidativo elevado com relação a indivíduos com peso eutrófico. O estresse oxidativo elevado, por sua vez, é considerado um mecanismo básico para o desencadeamento de doenças crônicas, entre elas o câncer, as alterações neurodegenerativas e os problemas cardiovasculares. Vários fatores podem contribuir com o maior grau de estresse oxidativo, dentre os quais, destaca-se a ingestão reduzida de antioxidantes e de compostos bioativos. Outro aspecto que deve ser considerado é a presença de polimorfismos em genes que codificam para enzimas antioxidantes. Destaca-se um destes, que é encontrado no gene que codifica para a enzima GPx 1, onde há a substituição de uma prolina por uma leucina no códon 198. Entretanto, as consequências fenotípicas deste polimorfismo para o sistema antioxidante são pouco estudadas, o que justifica a sua determinação, além do estudo de sua relação com o perfil antioxidante e também com a resposta a intervenções alimentares. Com base nos resultados que serão obtidos, o protocolo proposto neste projeto poderá ser utilizado como medida alternativa para a redução do estresse oxidativo, principalmente em indivíduos obesos. Dependendo, ainda, das diferenças encontradas em função do polimorfismo, os resultados serão úteis também no direcionamento de intervenções alimentares

Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Doutorado (1);

Integrantes: Cristiane Cominetti (Responsável); ; Silvia Maria Franciscato Cozzolino; Arthur Belarmino Garrido Jr; Thomas Prates Ong; Fernando Salvador Moreno

Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

---

## Áreas de atuação

1. Bioquímica da Nutrição
2. Dietética
3. Análise Nutricional de População
4. Nutrição

---

## Idiomas

- Inglês** Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem
- Espanhol** Compreende Razoavelmente , Fala Pouco, Escreve Pouco, Lê Razoavelmente

---

## Prêmios e títulos

- 2009** Finalista do 5to Premio Latinoamericano Kellogg's de Investigación en Alimentación y Nutrición Humana., Instituto de Nutrición y Salud Kellogg's
- 2005** Top Prêmio Atualidade Gendric 2005 com o trabalho: "Avaliação do Estado Nutricional Relativo ao Zinco de Pacientes Submetidos à Cirurgia Bariátrica", GENDRIC - Grupo de Estudos de Nutricionistas de Campinas e Região

---

## Produção em C, T& A

---

### Produção bibliográfica

#### Artigos completos publicados em periódicos

1. COMINETTI, C, Garrido, Arthur, Cozzolino, Silvia  
Zinc Nutritional Status of Morbidly Obese Patients Before and After Roux-en-Y Gastric Bypass: A Preliminary Report. *Obesity Surgery*. , v.16, p.448 - 453, 2006.  
*Palavras-chave: Bariatric surgery, Morbid obesity, Nutritional Status, Zinc*  
*Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital*

#### Capítulos de livros publicados

1. COZZOLINO, S.M.F., COMINETTI, C  
Aspectos fisiológicos e epidemiológicos da deficiência em zinco In: *Fome Oculta - Diagnóstico, Tratamento e Prevenção*.1 ed.São Paulo : Atheneu, 2009, v.1, p. 53-67.
2. PEDROSA, L. F. C., COMINETTI, C, COZZOLINO, S.M.F.  
Cobre In: *Biodisponibilidade de Nutrientes*.3 ed.Barueri : Manole, 2009, v.1, p. 597-615.
3. COMINETTI, C, COZZOLINO, S.M.F.  
Leite e redução do risco da obesidade In: *Leite para adultos, Mitos e Fatos Frente à Ciência*.1 ed.São Paulo : Livraria Varela, 2009, v.1, p. 243-257.
4. COMINETTI, C, BORTOLI, M. C., COZZOLINO, S.M.F.

Leite: fonte de proteínas, minerais e vitaminas In: Leite para adultos, Mitos e Fatos Frente à Ciência.1 ed.São Paulo : Livraria Varela, 2009, v.1, p. 177-214.

5. COMINETTI, C, GARRIDO JR, A.B., COZZOLINO, S.M.F.  
Micronutrientes e Cirurgia Bariátrica In: Biodisponibilidade de Nutrientes.3 ed.Barueri : Manole, 2009, v.1, p. 842-867.

6. COMINETTI, C, MARREIRO, D. N., COZZOLINO, S.M.F.  
Minerais e Obesidade In: Biodisponibilidade de Nutrientes.3 ed.Barueri : Manole, 2009, v.1, p. 811-841.

7. COMINETTI, C, COZZOLINO, S.M.F.  
Recomendações de Nutrientes In: Biodisponibilidade de Nutrientes.3 ed.Barueri : Manole, 2009, v.1, p. 12-45.

8. COMINETTI, C, COZZOLINO, S.M.F.  
Vitamina B6 (Piridoxina) In: Biodisponibilidade de Nutrientes.3 ed.Barueri : Manole, 2009, v.1, p. 397-421.

9. COMINETTI, C, COZZOLINO, S.M.F.  
Vitamina D (Calciferol) In: Biodisponibilidade de Nutrientes.3 ed.Barueri : Manole, 2009, v.1, p. 298-318.

10. COZZOLINO, S.M.F., COMINETTI, C, BORTOLI, M. C.  
Grupo das Carnes e Ovos In: Pirâmide dos Alimentos: fundamentos básicos da nutrição.1 ed.Barueri : Manole, 2008, v.1, p. 167-210.

11. COZZOLINO, S.M.F., BORTOLI, M. C., COMINETTI, C  
Grupo dos Feijões e Oleaginosas In: Pirâmide dos alimentos: fundamentos básicos da nutrição.1 ed.Barueri : Manole, 2008, v.1, p. 211-240.

12. COMINETTI, C, COZZOLINO, S.M.F.  
Ingestões Dietéticas de Referência In: Ciências Nutricionais - Aprendendo a Aprender.2 ed.São Paulo : Sarvier, 2008, v.1, p. 407-427.

13. COMINETTI, C, BORTOLI, M. C., COZZOLINO, S.M.F.  
Importância Nutricional de Minerais In: Fisiologia da Nutrição Humana - Aspectos Básicos, Aplicados e Funcionais.1 ed.São Paulo : Atheneu, 2007, v.1, p. 111-124.

14. COMINETTI, C, COZZOLINO, S.M.F.  
O Papel do Selênio no Crescimento e Desenvolvimento Infantil In: O Papel dos Nutrientes no Crescimento e Desenvolvimento Infantil ed.São Paulo : Sarvier, 2007, p. 83-96.

15. COMINETTI, C, GARRIDO JR, A.B., COZZOLINO, S.M.F.  
Micronutrientes e Cirurgia Bariátrica In: Biodisponibilidade de Nutrientes.2 ed.Barueri : Manole, 2006, v.1, p. 755-779.

16. COMINETTI, C, MARREIRO, D. N., COZZOLINO, S.M.F.  
Minerais e Obesidade In: Biodisponibilidade de Nutrientes.2 ed.Barueri : Manole, 2006, v.1, p. 735-754.

17. COMINETTI, C, COZZOLINO, S.M.F.  
Nutrição e Saúde Pública (no prelo) In: Saúde Pública. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2006, v.1

18. COMINETTI, C, COZZOLINO, S.M.F.  
Vitamina B6 (Piridoxina) In: Biodisponibilidade de Nutrientes.2 ed.Barueri : Manole, 2006, v.1, p. 347-371.

19. COMINETTI, C, MARREIRO, D. N., COZZOLINO, S.M.F.  
Minerais e Obesidade In: Biodisponibilidade de Nutrientes.1 ed.Barueri : Manole, 2005, v.1, p. 663-682.

20. COMINETTI, C, COZZOLINO, S.M.F.  
Vitamina B6 (Piridoxina) In: Biodisponibilidade de Nutrientes.1 ed.Barueri : Manole, 2005, v.1, p. 343-367.

## Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. COMINETTI, C, BORTOLI, M. C., PURGATTO, E., ONG, T. P., MORENO, F. S., GARRIDO JR, A.B., COZZOLINO, S.M.F. Associação do Polimorfismo Pro198Leu no Gene que Codifica para a Enzima Glutathione Peroxidase 1, Status de Selênio e Danos em DNA em Mulheres Obesas Mórbidas In: 10 Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN - Dos Genes à Coletividade, 2009, São Paulo. **Nutrire - Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**. São Paulo: SBAN, 2009. v.34. p.45 - 45
2. COMINETTI, C, BORTOLI, M. C., GARRIDO JR, A.B., COZZOLINO, S.M.F. Efeitos da ingestão de castanha-do-brasil na redução do risco cardiovascular em mulheres obesas mórbidas In: XV Congresso Latinoamericano de Nutrición - SLAN 2009, 2009, Santiago. **Anales del XV Congreso Latinoamericano de Nutrición - SLAN 2009**. , 2009. v.1. p.1 - 1
3. BORTOLI, M. C., COMINETTI, C, FARIAS, L.A., FÁVARO, D.I.T., COZZOLINO, S.M.F. Glutathione peroxidase activity, thyroid hormone and mercury levels in women in Cubatão, São Paulo, Brazil In: XV Congresso Latinoamericano de Nutrición - SLAN 2009, 2009, Santiago. **Anales del XV Congreso Latinoamericano de Nutrición - SLAN 2009**. , 2009. v.1. p.1 - 1
4. COMINETTI, C, BORTOLI, M. C., GARRIDO JR, A.B., COZZOLINO, S.M.F. Status de Selênio em Mulheres Obesas Mórbidas Antes e Após a Ingestão Diária de Castanhas-do-brasil In: 10 Congresso da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN - Dos Genes à Coletividade, 2009, São Paulo. **Nutrire - Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**. São Paulo: SBAN, 2009. v.34. p.402 - 402
5. Rocha, A.V., Bueno, R.B., COMINETTI, C, BORTOLI, M. C., Pires, L.V., Pinto, M.B.S., Camargo, L.M.A., COZZOLINO, S.M.F. Assessment of selenium nutritional status of riverine children from Rondônia state, western Amazon In: 13th International Meeting on Trace Elements in Man and Animals, 2008, Pucón. **Book of abstracts 13th International Meeting on Trace Elements in Man and Animals**. , 2008. v.1. p.148 - 149
6. COMINETTI, C, BORTOLI, M. C., ONG, T. P., MORENO, F. S., GARRIDO JR, A.B., COZZOLINO, S.M.F. Effects of brazilian nuts intake on the selenium blood concentrations and on erythrocyte glutathione peroxidase activity in morbid obese women In: 13th International Meeting on Trace Elements in Man and Animals, 2008, Pucón. **Book of abstracts 13th International Meeting on Trace Elements in Man and Animals**. , 2008. v.1. p.106 - 107
7. BORTOLI, M. C., COMINETTI, C, FÁVARO, D.I.T., COZZOLINO, S.M.F. Estado nutricional relativo ao selênio de mulheres residentes em Cubatão (SP) In: 13 Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF-USP, 43 Semana Universitária Paulista de Farmácia, 23 Seminário de Pós-Graduação e 16 Reunião de Iniciação Científica, 2008, São Paulo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo: 2008. v.44. p.20 - 20
8. BORTOLI, M. C., COMINETTI, C, FARIAS, L.A., FÁVARO, D.I.T., COZZOLINO, S.M.F. Mercury level and selenium status in women living in Cubatão, São Paulo, Brazil In: 13th International Meeting on Trace Elements in Man and Animals, 2008, Pucón. **Book of abstracts 13th International Meeting on Trace Elements in Man and Animals**. , 2008. v.1. p.107 - 108
9. COMINETTI, C, GARRIDO JR, A.B., COZZOLINO, S.M.F. Concentração plasmática, urinária e ingestão de zinco de indivíduos no pré-operatório de gastroplastia com derivação em Y de Roux In: 1º Simpósio Latino-americano da Federação Internacional para a Cirurgia da Obesidade (IFSO), 2005, Foz do Iguaçu. **Anais do 1º Simpósio Latino-Americano da IFSO**. , 2005. v.10. p.04 - 05
10. COMINETTI, C, GARRIDO JR, A.B., COZZOLINO, S.M.F. Efeitos da Gastroplastia com Derivação em Y de Roux no Estado Nutricional Relativo ao Zinco In: 8º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, 2005, São Paulo. **Nutrire - Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**. , 2005. v.30. p.392 - 392
11. COMINETTI, C, GARRIDO JR, A.B., COZZOLINO, S.M.F. Effects of the gastroplasty with Roux-em-Y Bypass on the plasma, erythrocyte and urine zinc concentrations In: 18th International Congress of Nutrition, 2005, Durban - South Africa. **Annals of Nutrition & Metabolism**. , 2005. v.49. p.308 - 308

12. COMINETTI, C, GARRIDO JR, A.B., COZZOLINO, S.M.F. Zinc Concentration on Plasma, Urine and Diet of Individual Undergoing a Gastroplasty with Roux-en-Y Bypass In: Tema 12 - Trace Element in Man and Animals, 2005, Coleraine - Northern Ireland. **Book of Abstracts - Theme: Scientific Developments, Novel Applications and Progress into the 21st Century.** , 2005. p.52 - 52

#### **Artigos em revistas (Magazine)**

1. COMINETTI, C, COZZOLINO, S.M.F.  
Intolerância à lactose. Qualidade em Alimentação - Nutrição. São Paulo, p.38 - 39, 2009.

#### **Apresentação de Trabalho**

1. COMINETTI, C, BORTOLI, M. C., PURGATTO, E., ONG, T. P., MORENO, F. S., GARRIDO JR, A.B., COZZOLINO, S.M.F.

**Associação do Polimorfismo Pro198Leu no Gene que Codifica para a Enzima Glutathione Peroxidase 1, Status de Selênio e Danos em DNA em Mulheres Obesas Mórbidas**, 2009. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

2. COMINETTI, C, BORTOLI, M. C., GARRIDO JR, A.B., COZZOLINO, S.M.F.

**Status de Selênio em Mulheres Obesas Mórbidas Antes e Após a Ingestão Diária de Castanhas-do-brasil**, 2009. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

#### **Demais produções bibliográficas**

1. COMINETTI, C, COZZOLINO, S.M.F.

**Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes - Selênio.** Série de Publicações Ilsi Brasil. São Paulo:Ilsi Brasil, 2009. (Outra produção bibliográfica)

2. COMINETTI, C, COZZOLINO, S.M.F.

**Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes - Zinco.** Série de Publicações Ilsi Brasil. São Paulo:Ilsi Brasil, 2009. (Outra produção bibliográfica)

#### **Produção Técnica**

##### **Demais produções técnicas**

1. COMINETTI, C

**Ministrou a palestra intitulada: "Biodisponibilidade de Nutrientes", na III Semana de Nutrição da Universidade Mackenzie**, 2009. (Outra produção técnica)

2. COMINETTI, C

**Ministrou a palestra intitulada: "Nutrigenômica: Fundamentos e Perspectivas", no XIII Congresso Brasileiro de Nutrologia, XIV Conferência sobre Obesidade e Síndrome Metabólica, VI Conferência de Direito Humano à Alimentação Adequada, VII Annual Meeting International Colleges for Advancements of Nutrition**, 2009. (Outra produção técnica)

3. COMINETTI, C

**Ministrou a palestra intitulada: "Ingestão de micronutrientes no Brasil e estado nutricional de grupos vulneráveis" no 4º Congresso Paulista de Nutrição - CPNutri**, 2007. (Outra produção técnica)

4. COMINETTI, C

**Ministrou a palestra intitulada: "Minerais e seu papel na redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis" no curso pré-congresso Alimentos funcionais (legislação, finalidades e avanços). XIX CONBRAN - Congresso Brasileiro de Nutrição.**, 2006. (Outra produção técnica)

5. COMINETTI, C

**Ministrou a palestra intitulada "Minerais no Pós Operatório de Gastroplastia" no Hospital e Maternidade São Luiz**, 2006. (Outra produção técnica)

6. COMINETTI, C

**Ministrou parte da aula intitulada "Capacitação em Segurança Alimentar e Nutricional" do CONSEA/SP**, 2006. (Outra produção técnica)

7. COMINETTI, C

**Ministrou a palestra intitulada "Cuidados Nutricionais em Cirurgia Bariátrica - Micronutrientes", no Curso de Treinamento em Cirurgia Bariátrica - CETIG do Instituto Garrido de Gastroenterologia e Cirurgia da Obesidade, 2005. (Outra produção técnica)**

8. COMINETTI, C

**Ministrou parte da aula intitulada "Capacitação em Segurança Alimentar e Nutricional" do CONSEA/SP, 2005. (Outra produção técnica)**

## Eventos

### Participação em eventos

1. Apresentação Oral no(a) **10 Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN, 2009. (Congresso)**

Associação do Polimorfismo PRO198LEU no Gene que Codifica para a Enzima Glutathione Peroxidase 1, Status de Selênio e Danos em DNA em Mulheres Obesas Mórbidas.

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XV Congreso Latinoamericano de Nutrición - SLAN 2009. XVI Jornadas de la Sociedad Chilena de Nutrición, 2009. (Congresso)**

Efeitos da ingestão de castanha-do-brasil na redução do risco cardiovascular em mulheres obesas mórbidas.

3. Conferencista no(a) **XIII Congresso Brasileiro de Nutrologia, XIV Conferência sobre Obesidade e Síndrome Metabólica, VI Conferência de Direito Humano à Alimentação Adequada, VII Annual Meeting International Colleges for Advancements of Nutrition, 2009. (Congresso)**

Nutrigenômica: Fundamentos e Perspectivas.

4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **13th International Meeting on Trace Elements in Man and Animals, 2008. (Congresso)**

Effects of brazilian nuts intake on the selenium blood concentrations and on erythrocyte glutathione peroxidase activity in morbid obese women.

5. Conferencista no(a) **4º Congresso Paulista de Nutrição - CPNutri, 2007. (Congresso)**

Ingestão de micronutrientes no Brasil e estado nutricional de grupos vulneráveis.

6. **Encontro Científico: O Papel da Nutrição no Crescimento e Desenvolvimento Infantil, 2007.**

7. **I Simpósio de Pesquisa e Ensino em Nutrigenômica, 2007. (Simpósio)**

8. **9 Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - A Ciência da Alimentação e da Nutrição: Novos Paradigmas, 2007. (Congresso)**

9. Conferencista no(a) **XIX Congresso Brasileiro de Nutrição – CONBRAN, 2006. (Congresso)**

XIX CONBRAN – Congresso Brasileiro de Nutrição.

10. **Workshop sobre Carboidratos - 5º Evento da Série de Workshops Internacionais sobre Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde, 2006. (Simpósio)**

11. Apresentação Oral no(a) **1º Simpósio Latino-americano da Federação Internacional para a Cirurgia da Obesidade (IFSO), 2005. (Simpósio)**

1º Simpósio Latino-americano da Federação Internacional para a Cirurgia da Obesidade (IFSO).

12. Apresentação de Poster / Painel no(a) **8º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, 2005. (Congresso)**

8º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição.

13. **A obesidade no Brasil: novas evidências científicas, 2005. (Seminário)**



14. **II Seminário Internacional sobre Alimentos Funcionais, 2004.** (Seminário)
15. **I Congresso Paulista de Nutrição Humana, II Congresso Paulista de Nutrição Clínica, I Fórum de Ética, Bioética e Educação em Nutrologia, 2004** (Congresso)
16. **I Fórum de Discussões ILSI Brasil sobre Fortificação de Alimentos e Suplementação – Foco nas Necessidades Nutricionais de Crianças e Adolescentes, 2004** (Seminário)
17. **Minerais em Dietas Iberoamericanas – Avaliação do Estado Nutricional, 2003** (Simpósio)

## Totais de produção

### Produção bibliográfica

Artigos completos publicado em periódico.....	1
Capítulos de livros publicados.....	20
Revistas (Magazines).....	1
Trabalhos publicados em anais de eventos.....	12
Apresentações de Trabalhos (Congresso).....	2
Demais produções bibliográficas.....	2

### Produção Técnica

Outra produção técnica.....	9
-----------------------------	---

### Eventos

Participações em eventos (congresso).....	9
Participações em eventos (seminário).....	7
Participações em eventos (simpósio).....	4
Participações em eventos (encontro).....	1
Participações em eventos (outra).....	6

## Outras informações relevantes

### 1 Artigos enviados para publicação:

COMINETTI, C.; BORTOLI, M.C.; ABDALLA, D.S.P.; COZZOLINO, S.M.F. Aspectos principais sobre a relação entre estresse oxidativo, selênio e nutrigenética. **Revista de Nutrição da PUCAMP**. Enviado para publicação em 11/08/2009.

COMINETTI, C; BORTOLI, M.C.; PURGATTO, E.; ONG, T.P.; MORENO, F.S.; GARRIDO JR, A.B.; COZZOLINO, S.M.F. Associations between GPx 1 Pro198Leu polymorphism, selenium nutritional status and levels of DNA damage in obese women after the consumption of Brazil nuts. **Nutrition**. Enviado para publicação em 10/02/2010.

## Citações em bases bibliográficas

**Web of Science** Número total de citações : 4;Número de trabalhos : 1Data : 13/09/2009; Fator H: 1;  
Nome(s) do autor utilizado(s) na consulta para obter o total de citações:  
Cominetti, C

**SCOPUS** Número total de citações : 6;Número de trabalhos : 1Data : 20/09/2009  
Nome(s) do autor utilizado(s) na consulta para obter o total de citações:  
Cominetti, C

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



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

9132 - 5012249/2 - Cristiane Cominetti

Email: ccominet@usp.br  
Data de Nascimento: 25/11/1980  
Cédula de Identidade: RG - 3.290.744 - SC  
Local de Nascimento: Estado de Santa Catarina  
Nacionalidade: Brasileira  
Graduação: Bacharel em Nutrição - Universidade Estadual do Centro-Oeste - Paraná - Brasil - 2002  
Mestrado: Mestre em Ciência dos Alimentos - Área: Nutrição Experimental - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2006

Curso: Doutorado  
Programa: Ciência dos Alimentos  
Área: Nutrição Experimental  
Data de Matrícula: 20/02/2006  
Início da Contagem de Prazo: 20/02/2006  
Data Limite: 20/02/2010  
Orientador: Prof(a). Dr(a). Sílvia Maria Franciscato Cozzolino - 20/02/2006 até o presente. E-Mail: smfcozzo@usp.br  
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 20/02/2006  
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 29/06/2009  
Data do Depósito do Trabalho: 10/02/2010  
Título do Trabalho: "Efeitos da suplementação com castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) sobre o estresse oxidativo em mulheres obesas e sua relação com o polimorfismo Pro198Leu no gene da glutatona peroxidase 1"  
Data Máxima para Aprovação da Banca: 11/04/2010  
Data de Aprovação da Banca: 17/03/2010  
Data Máxima para Defesa: 15/06/2010  
Data da Defesa:  
Resultado da Defesa:  
Histórico de Ocorrências: Ingressou no Doutorado em 20/02/2006  
Matrícula de Acompanhamento em 05/02/2010

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 05/02/2010

Impresso em: 31/05/10 09:11:55

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



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

9132 - 5012249/2 - Cristiane Cominetti

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
NHA5705 1/1	Fundamentos da Biologia Molecular Aplicados à Nutrição Humana (Curso Interunidades: Nutrição Humana Aplicada - Universidade de São Paulo)	01/09/2006	08/07/2006	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5704 3/3	Parâmetros Bioquímicos Indicativos do Estado Nutricional	13/06/2006	17/07/2006	45	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBA5702 3/2	Compostos Bioativos em Alimentos e sua Relação com a Saúde Humana	09/04/2007	25/04/2007	30	2	83	A	N	Concluída
HNT5732 4/1	Métodos para Avaliação do Consumo Alimentar de Populações (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	31/07/2007	08/10/2007	60	4	80	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Publicação do capítulo "Importância nutricional de minerais" no livro Fisiologia da Nutrição Humana. Aspectos Básicos, Aplicados e Funcionais, p.112-124, v. 1, São Paulo, 2007 (1)	27/09/2007	27/09/2007	-	2	0	-	-	-
Atividade do Programa	Publicação do capítulo "Aspectos fisiopatológicos e epidemiológicos da deficiência em zinco" no livro Fome Oculta. Diagnóstico, Tratamento Importância, p. 53-67, v. 1, São Paulo, 2008 (1)	01/08/2008	01/08/2008	-	2	0	-	-	-
FBC5795 7/2	Radicais Livres em Bioquímica Clínica	04/11/2008	08/12/2008	75	5	100	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Publicação do capítulo "Micronutrientes e cirurgia bariátrica", no livro Biodisponibilidade de Nutrientes, p. 842-867, v. 1, São	17/04/2009	17/04/2009	-	2	0	-	-	-

Programa Paulo, 2009 (1)

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	20	20	21
Atividades Programadas:			
Seminários:			
Estágios:			
Total:	20	20	21

Créditos Atribuídos à Tese: 167

**Observações:**

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto no Artigo 65 do Regimento de Pós-Graduação e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 01/06/2009.

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 05/02/2010

Impresso em: 31/05/10 09:11:55