

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

BÁRBARA RITA CARDOSO

**Efeitos do consumo de castanha-do-brasil (*Bertholetia excelsa* H.B.K.)
sobre o estresse oxidativo em pacientes com comprometimento
cognitivo leve e a relação com variações em genes de selenoproteínas**

Tese para obtenção do grau de Doutor

Orientadora:

Prof^ª. Tit. Silvia Maria Franciscato Cozzolino

São Paulo

2014

Ficha Catalográfica

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

C268e	<p>Cardoso, Bárbara Rita Efeitos do consumo de castanha-do-brasil (<i>Bertholetia excelsa</i> H.B.K.) sobre o estresse oxidativo em pacientes com comprometimento cognitivo leve e a relação com variações em genes de selenoproteínas / Bárbara Rita Cardoso. -- São Paulo, 2014. 110p.</p>
	<p>Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental Orientador : Cozzolino, Silvia Maria Franciscato</p>
	<p>1. Selênio 2. Estresse oxidativo 3. Estado nutricional I. T. II. Cozzolino, Silvia Maria Franciscato, orientador.</p>
	<p>641.17 CDD</p>

BÁRBARA RITA CARDOSO

Efeitos do consumo de castanha-do-brasil (*Bertholetia excelsa* H.B.K.) sobre o estresse oxidativo em pacientes com comprometimento cognitivo leve e a relação com variações em genes de selenoproteínas

Comissão julgadora da
Tese para obtenção do grau de Doutor

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

Wilson Jacob-Filho
1º Examinador

Alexandre Leopold Busse
2º Examinador

Sandra Maria Lima Ribeiro
3º Examinadora

Tânia Markourakis
4º Examinadora

São Paulo, 10 de junho de 2014.

À Vó Rosi (*in memorian*), que sempre
me fez acreditar que tudo daria certo.

À minha mãe, Raquel
Ao meu pai, Henio
À minha irmã, Luisa
Me fortalecem e me permitem voar.

Ao meu esposo e meu amor, Danillo
[...] sem você eu não sou ninguém.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível porque pude contar com o apoio de muitas pessoas que encontrei ao longo do caminho. Por isso, sou grata:

À professora Silvia Cozzolino, pessoa de coração enorme, que com humildade e ética trabalha para que a Nutrição evolua. Me ensinou a ser uma pessoa melhor e ainda mais apaixonada pela Nutrição.

Aos amigos do Laboratório de Nutrição-Minerais por me acompanharem nesta trajetória dentro da USP e contribuírem com sorrisos, abraços apertados e troca de informações para que este trabalho acontecesse. Ariana Rocha, Bruna Reis, Carla Soraya Maia, Cristiane Cominetti, Fernanda Guilherme, Graziela Biude, Isabela Saraiva, Janaina Lombelo, Kaluce Almondes, Katia Calllou, Larissa Bezerra, Leila Hashimoto, Liliane Pires, Luciana Nishimura, Luciane Alencar, Milena Barcza, Rafael Bueno: obrigada pela amizade e por estarem sempre a postos para ajudar! Em especial, agradeço à querida Verônica Bandeira, que me ajudou a coletar os dados e que foi imprescindível nos primeiros anos de trabalho. Tenho certeza de que a tua dedicação vai te abrir portas e te levar ao sucesso.

À professora Ana Paula de Melo Loureiro e a sua aluna Fabiana Almeida dos Santos, que permitiram a realização das análises de MDA no Laboratório de Marcadores Moleculares de Exposição à Xenobióticos / FCF-USP.

Ao professor Thomas Ong, que me ajudou a interpretar alguns dados e que, mais do que isso, me inspira a seguir na ciência. Obrigada por acreditar em mim.

Ao professor Eduardo pela grande ajuda sobre técnicas de análise.

Ao professor Wilson Jacob-Filho que abriu as portas da Geriatria do Hospital das Clínicas para a realização deste trabalho.

À equipe do Ambulatório de Memória do Idoso do Hospital das Clínicas – FMUSP –, que colaborou para que o trabalho fosse efetivamente realizado. Em especial: à Dr^a Regina, ao Dr. Alexandre Busse e à neuropsicóloga Valéria, que fez as avaliações cognitivas.

Ao Dr. Daniel Apolinário, que colaborou incansavelmente para a análise estatística dos dados e que fez correções de grande valia para o trabalho.

Aos meus pais, Henio e Raquel, que ao longo de toda minha trajetória me incentivaram, apoiaram e consolaram quando foi preciso. Vocês são exemplo e inspiração para mim.

À minha irmã, Luisa, que se faz presente mesmo longe. Que me estende a mão quando preciso, que comemora comigo as minhas vitórias e que me faz ver a vida com outros olhos, mais críticos e reflexivos.

Ao meu grande amor, Danillo, por me apoiar e por me completar. Sou muito mais feliz ao teu lado.

Às(aos) “Oliveiras”, família amada que mesmo distante se faz presente diariamente na minha vida. Saber que posso contar com vocês onde quer que eu esteja me dá coragem para continuar.

Aos meus sogros, Wilson e Izilda, e ao meu cunhado, Dawill, por estarem sempre por perto e por estenderem a mão sempre que precisei.

Aos meus amigos de Laguna que, apesar de longe, não permitem que a amizade acabe. Sou grata por ter vocês na minha vida e pela nossa amizade de mais de 20 anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela contribuição financeira com a concessão da bolsa de estudo.

RESUMO

CARDOSO, Bárbara Rita. **Efeitos do consumo de castanha-do-brasil (*Bertholetia excelsa* H.B.K.) sobre o estresse oxidativo em pacientes com comprometimento cognitivo leve e a relação com variações em genes de selenoproteínas.** São Paulo, 2014. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

Visto que o estresse oxidativo está intimamente relacionado com a progressão da demência, este se apresenta como um possível alvo terapêutico a fim de preservar as funções cognitivas. No mesmo sentido, estudos mostram o papel antioxidante do selênio, mineral que atua por meio das selenoproteínas, com destaque para a família de enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase (GPx) e a selenoproteína responsável pelo transporte de selênio, a selenoproteína P (SePP). Entretanto, diferentes genótipos dos genes que codificam essas selenoproteínas podem refletir em diferentes respostas diante de intervenções alimentares. Assim, este trabalho teve como objetivo verificar os efeitos da suplementação com castanha-do-brasil sobre o estresse oxidativo em pacientes com comprometimento cognitivo leve (CCL) e verificar sua relação com os polimorfismos rs1050450 (Pro198Leu) no gene da GPx1, rs3877899 e rs7579 no gene da selenoproteína P. Participaram do estudo 31 indivíduos com CCL, voluntários, de ambos os sexos, frequentadores do Ambulatório de Memória do Idoso do Serviço de Geriatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com idade igual ou superior a 60 anos, que foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos Castanha e Controle. O grupo Castanha recebeu uma unidade de castanha-do-brasil por dia durante seis meses. Foram avaliados os seguintes marcadores: determinação de selênio no plasma e nos eritrócitos, atividade da GPx eritrocitária, avaliação dos níveis de *oxygen radical absorbance capacity* (ORAC) e de malondialdeído (MDA) plasmáticos, perfil lipídico sérico e expressão gênica de GPx1 e SePP. Além disso, os participantes foram submetidos à avaliação cognitiva e genotipados quanto aos polimorfismos rs1050450, rs3877899 e rs7579. Cada unidade de castanha-do-brasil forneceu 288,75µg de selênio. Dentre os 31 participantes selecionados, apenas 20 concluíram o estudo, e observou-se que, antes da intervenção, os grupos de estudo não apresentavam diferença quanto aos níveis de selênio no plasma e no eritrócito, bem como na atividade da GPx e nos níveis plasmáticos de ORAC e de MDA. Porém, após a suplementação, verificou-se aumento significativo no selênio plasmático ($290,6 \pm 74,6$) e eritrocitário ($574,6 \pm 181,4$) e na atividade da

GPx ($59,55 \pm 20,79$) no grupo Castanha, diferente do grupo Controle ($47,48 \pm 11,7$ no plasma; $33,5 \pm 16,1$ no eritrócito; $42,54 \pm 13,05$ atividade da GPx). Em relação ao MDA, verificou-se que ambos os grupos apresentaram aumento após a intervenção, porém não significativo. No caso do ORAC, não se verificou alteração entre os grupos após os seis meses. O escore CERAD, que avalia desempenho cognitivo, não foi diferente entre os grupos após o tratamento, entretanto as mudanças observadas na fluência verbal e na praxia construtiva ao longo do acompanhamento foram mais favoráveis no grupo Castanha. A frequência dos genótipos de referência foram 40% para Pro198Leu, 55% para rs7579 e 60% para rs3877899. Não foram identificadas diferenças entre os níveis de selênio, de atividade da GPx, de MDA e de ORAC entre os genótipos, porém em análise multivariada verificou-se que o alelo variante do Pro198Leu se relacionou com aumento de 0,613 dp na concentração de selênio no plasma no *baseline*. A influência dos polimorfismos na resposta à intervenção com castanha-do-brasil foi avaliada nos 11 participantes do grupo Castanha, e observou-se que os genótipos não influenciaram na resposta quanto os níveis de selênio plasmático e eritrocitário, bem como de MDA. Entretanto, quanto à atividade da GPx, embora todos os genótipos tenham apresentado aumento após a intervenção, isso não foi significativo para o genótipo dominante do rs7579 e para o variante do rs3877899. A expressão de GPx1 e de SePP também foi diferente entre os genótipos: indivíduos com alelo variante do Pro198Leu apresentaram redução da expressão da GPx1, enquanto carreadores do genótipo homocigoto dominante tiveram aumento. Também percebeu-se que a expressão da SePP foi reduzida em todos os genótipos, entretanto essa mudança foi mais relevante para os genótipos variantes do Pro198Leu e rs7579 e para o genótipo GG do rs3877899. A partir desses resultados, concluiu-se que o consumo de apenas uma castanha-do-brasil diariamente, durante seis meses, é suficiente para recuperar o estado nutricional relativo ao selênio, e isso parece ter efeitos positivos sobre a cognição em idosos com CCL. Além disso, observou-se que o polimorfismo Pro198Leu no gene da GPx1 parece influenciar o estado nutricional quanto ao selênio, bem como a expressão de GPx, enquanto que os polimorfismos rs7579 e rs3877899 parecem não influenciar, de maneira significativa, o metabolismo de selênio frente ao consumo de castanha-do-brasil.

Palavras-chave: Castanha-do-brasil. Selênio. Estresse oxidativo. Declínio cognitivo. Comprometimento cognitivo leve.

ABSTRACT

CARDOSO, Bárbara Rita. **Effects of the intake of Brazil nut (*Bertholetia excels* H.B.K) on the oxidative stress in patients with mild cognitive impairment and its relation with polymorphisms in selenoprotein genes.** São Paulo, 2014. Thesis (PhD) – Faculty of Pharmaceutical Science, University of São Paulo.

Since oxidative stress is closely related to progression of dementia, the antioxidant system may be a potential therapeutic target to preserve cognitive function. In this way, studies show the antioxidant role of selenium, which plays as selenoproteins especially glutathione peroxidase (GPx) family and selenoprotein P (SePP). However, different genotypes of selenoprotein genes may result in different response to dietary intake. Therefore, this work aimed to verify the effects of Brazil nuts intake on oxidative stress and the role of the polymorphisms rs1050450 (Pro198Leu) in GPx1 gene and rs7579 and rs3877899 in SePP gene in mild cognitive impairment (MCI) patients. Study subjects comprised 31 voluntary patients with MCI who attended the Memory and Aging Unit of the Geriatrics Division, University of São Paulo Medical School (Brazil). They were randomly assigned to ingestion of Brazil nuts or to the control group. Brazil nuts group received one nut daily during six months. The following parameters were analysed: selenium concentration in plasma and erythrocyte, GPx activity in erythrocyte, plasmatic levels of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and of malondialdehyde (MDA), serum lipid profile. Besides, we evaluated cognitive performance and the patients were genotyped to rs1050450, rs3877899 e rs7579 polymorphisms. Each Brazil nut provided 288.75µg of selenium. Among 31 enrolled participants, only 20 finished the study. No differences regarding selenium levels, GPx activity, ORAC and MDA levels were observed at baseline between groups. However, after treatment, we observed significant increase in selenium in plasma (290.6 ± 74.6) and in erythrocyte (574.6 ± 181.4) and in GPx activity (59.55 ± 20.79) in treated group, unlike control group (47.48 ± 11.70 selenium in plasma; 33.5 ± 16.1 selenium in erythrocyte; 42.54 ± 13.05 GPx activity). Although not significant, MDA level increased after 6 months in both groups and ORAC levels were not different across time. CERAD total score was not different across time between groups, however changes in verbal fluency and constructional praxis subtests across time were significantly more favorable on the supplemented group when

compared with control group. The frequency of dominant genotypes for Pro198Leu, rs7579 and rs3877899 were 40%, 55% and 60%, respectively. We did not observe differences regarding to selenium ORAC and MDA levels and GPx activity among genotypes, however after linear regression analysis the presence of variant allele of Pro198Leu was associated with an increase of 0.613 SD in selenium plasma level at baseline. The effect of polymorphisms in response to Brazil nut intake was analysed in Brazil nut group, and we observed that selenium and MDA levels were not affected by polymorphisms. However although GPx activity increased in all genotype groups, this was not significant in dominant genotype of rs7579 and variant genotypes of rs3877899. GPx1 and SePP expression was also different among groups across time: variant allele of Pro198Leu presented decreased expression of GPx1 while dominant homozygous presented increase of expression. We also observed that SePP expression was reduced in all genotypes, but this was more important in variant genotypes of Pro198Leu and rs7579 and in GG genotype of rs3877899. From these results, we can conclude that consumption of only one Brazil nut is enough to restore selenium status, and this may be positive effects on cognition performance. Furthermore we observed that Pro198Leu polymorphism may influence selenium nutritional status and GPx activity whereas rs7579 and rs3877899 polymorphisms did not have an effect on selenium metabolism after Brazil nut intake.

Key words: Brazil nuts. Oxidative stress. Cognitive decline. Mild cognitive impairment.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMI – Ambulatório de Memória do Idoso

CCL – comprometimento cognitivo leve

CDR – *Clinical Dementia Rating*

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CERAD – *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*

ERN – espécies reativas de nitrogênio

ERO – espécies reativas de oxigênio

FCF-USP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

GPx – glutathiona peroxidase

HCFMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HDL-c – lipoproteína de alta densidade

LDL-c – lipoproteína de baixa densidade

Leu – leucina

MDA – malondialdeído

ORAC – *oxygen radical absorbance capacity*

Pro – prolina

SePP – selenoproteína P

TBARS – ácido tiobarbitúrico

VLDL – lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho experimental	31
Figura 2: Efeitos com consumo de castanha-do-brasil durante seis meses na expressão de SePP e GPx1 de acordo com A) genótipos de rs7579, B) genótipos de rs3877899, C) genótipos de Pro198Leu.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características dos participantes no início do estudo	55
Tabela 2: Composição centesimal e concentração de selênio das castanhas-do-brasil utilizadas no estudo.....	56
Tabela 3: Selênio plasmático e eritrocitário, atividade de GPx, ORAC e MDA dos grupos Castanha e Controle, no início do estudo e após seis meses.....	56
Tabela 4: Avaliação cognitiva dos grupos Castanha e Controle, no início do estudo e após seis meses.....	57
Tabela 5: Análises de correlação entre mudanças no escore total CERAD e mudanças nos parâmetros de selênio, de atividade da GPx, de ORAC e de MDA.....	58
Tabela 6: Frequência dos genótipos e dos alelos para os polimorfismos Pro198Leu, rs7579 e rs3877899.....	76
Tabela 7: Níveis de selênio plasmático e eritrocitário, consumo de selênio, atividade da GPx, ORAC e MDA dos participantes de acordo com o genótipo para Pro198Leu, rs7579 e rs3877899	75
Tabela 8: Associação entre os parâmetros de selênio e os polimorfismos Pro198Leu, rs7679 e rs3877899 em modelos de regressão linear ajustados	76
Tabela 9: Associação entre ORAC, MDA e atividade da GPx e os polimorfismos Pro198Leu, rs7679 e rs3877899 em modelos de regressão linear ajustados.....	77
Tabela 10: Selênio no plasma e no eritrócito, atividade da GPx e MDA no início do estudo e após seis meses de intervenção de acordo com os genótipos para os polimorfismos Pro198Leu, rs7579 e rs3877899	93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Critérios para diagnóstico de Comprometimento Cognitivo Leve (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013; PETERSEN et al., 2014).....	19
Quadro 2: Critérios de inclusão para participação do estudo	29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 Comprometimento cognitivo leve e estresse oxidativo	19
2.2 Selênio, selenoproteínas e comprometimento cognitivo leve.....	21
2.3 Polimorfismos nos genes que codificam GPx1 e selenoproteína P	24
2.4 Intervenção alimentar com castanha-do-brasil	26
3 OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo geral.....	28
3.2 Objetivos específicos	28
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	29
4.1 Amostra.....	29
4.2 Protocolo Experimental	30
4.3 Avaliação da composição química das castanhas	31
4.4 Avaliação do consumo de selênio.....	32
4.5 Avaliação cognitiva	32
4.6 Coleta de sangue	33
4.7 Concentração de selênio no plasma e eritrócitos	34
4.8 Análise da atividade eritrocitária da enzima GPx.....	35
4.9 Avaliação do perfil lipídico	35
4.10 Determinação dos polimorfismos rs1050450 da enzima glutathione peroxidase 1, e rs7579 e rs3877899 da selenoproteína P.....	36
4.11 Determinação da expressão gênica da glutathione peroxidase 1 e da selenoproteína P.....	36
4.12 Determinação do oxygen radical absorbance capacity (ORAC)	37
4.13 Determinação da concentração plasmática de malondialdeído (MDA)	38
4.14 Análise estatística dos dados.....	38
Referências.....	40
ARTIGO 1: Efeitos do consumo de castanha-do-brasil no estado nutricional relativo ao selênio e desempenho cognitivo em idosos com comprometimento cognitivo leve: ensaio clínico piloto.....	49
Introdução	49
Métodos.....	50
Participantes.....	50
Protocolo	51
Avaliação da composição química das castanhas	51
Coleta de sangue	52
Determinação do perfil lipídico	52
Avaliação do estado nutricional relativo ao selênio	53
Avaliação da atividade da GPx eritrocitária	53
Determinação do ORAC	53
Determinação do MDA.....	53
Avaliação da função cognitiva.....	54
Análise estatística.....	54
Resultados	55
Discussão	58

Conclusões	62
Referências.....	63
ARTIGO 2: Associações entre polimorfismos em genes de selenoproteínas e o estado nutricional relativo ao selênio e estresse oxidativo em pacientes com comprometimento cognitivo leve	69
Introdução	69
Métodos.....	70
Participantes.....	70
Coleta de sangue	71
Extração de DNA e genotipagem	71
Avaliações bioquímicas	72
Avaliação do consumo de selênio.....	73
Análise estatística.....	73
Resultados.....	74
Discussão	78
Referências.....	82
ARTIGO 3: Efeitos de polimorfismos nos genes da glutathiona peroxidase 1 da selenoproteína P em resposta ao consumo de castanha-do-brasil em idosos com comprometimento cognitivo leve	87
Introdução	87
Materiais e Métodos.....	88
Participantes do estudo	88
Protocolo de estudo.....	89
Coleta de sangue	89
Extração do DNA e genotipagem	89
Determinação da expressão gênica da GPx1 e da SePP	90
Análises bioquímicas	91
Análise estatística.....	91
Resultados.....	92
Discussão	95
Conclusões	97
Referências.....	99
APÊNDICE I	103
APÊNDICE II.....	104
APÊNDICE III.....	107
ANEXO I.....	109

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento da população é um fenômeno mundial que resulta em uma transformação no perfil de saúde, com aumento de predomínio das doenças crônicas não comunicáveis. Dessa maneira, observa-se um aumento na prevalência das doenças demenciais e, segundo Ferri et al. (2005), 4,6 milhões de novos casos de demência serão diagnosticados a cada ano e, caso estratégias de prevenção não sejam implantadas, em 2040 o número de afetados chegará a mais de 81 milhões de pessoas.

O conceito de ‘comprometimento cognitivo leve’ (CCL) foi introduzido na década de 1980 por Reisberg et al. (1988) e definido por Petersen et al. (1999), e se refere ao declínio cognitivo em idosos mais acentuado que no envelhecimento normal, porém não configura uma demência detectável, representando então um estado intermediário entre o envelhecimento normal e a demência. Em 2013, a Associação Americana de Psiquiatria (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, 2013) publicou os novos critérios para demência e passou a incluir o diagnóstico de ‘transtorno neurocognitivo menor’, que se assemelha ao CCL e reconhece essa desordem como um possível estágio que antecede a demência, denominada ‘transtorno neurocognitivo maior’.

Segundo diferentes estudos, a taxa de conversão de CCL para demência é estimada entre 5 e 10% ao ano, enquanto que 40 a 70% dos casos se mantêm estáveis ou reverterem para um estado cognitivo de normalidade. Em meta-análise que incluiu 13 estudos clínicos envolvendo um total de 4301 indivíduos, a taxa de conversão anual de CCL para demência foi de 9,6% e, durante todo o período de acompanhamento, 39,2% converteram para demência (MITCHELL; SHIRI-FESHKI, 2009; LUCK et al., 2010; STEPHAN et al., 2010; KADUSZKIEWICZ et al., 2014).

O reconhecimento dos mecanismos envolvidos no curso do declínio cognitivo ao longo do tempo ainda é um desafio para a ciência. Entretanto, reconhece-se o papel central que a inflamação e o estresse oxidativo apresentam na formação das placas senis e dos emaranhados neurofibrilares, características fisiopatológicas da Doença de Alzheimer (CHAUHAN; CHAUHAN, 2006; CROUCH et al., 2008, ETGEN et al., 2010).

Sob esse aspecto, destaca-se que o cérebro se apresenta como uma fonte de radicais livres e, com o avanço da idade, os neurônios apresentam maior ineficiência no processo de produção

de energia, com aumento da geração de radicais livres. Paralelamente, ocorre diminuição da ação do sistema antioxidante, contribuindo para as mudanças morfológicas e funcionais, as quais provocam apoptose neuronal e afetam as árvores de dendritos e sinapses, a neurotransmissão, a circulação e o metabolismo – o que altera os sistemas motor e sensorial, a memória e o aprendizado (BOURDEL-MARCHASSON et al. 2001; MARIANI et al., 2005; ZHU et al., 2007; ANSARI e SCHEFF, 2010).

As defesas antioxidantes do organismo podem intervir em quaisquer dos três estágios do processo de oxidação: iniciação, propagação ou término. Por isso, tem-se dado grande importância aos minerais que desempenham função essencial como constituintes de enzimas antioxidantes, como o selênio. Esse mineral exerce seu papel por meio de selenoproteínas, com destaque para a enzima glutathione peroxidase (GPx) e a selenoproteína P, que são expressas abundantemente no cérebro (DAMIER et al., 1993; HOFFMANN et al., 2007; ZHANG et al., 2008).

Visto que o estresse oxidativo está intimamente relacionado com a progressão da demência, este se apresenta como um possível alvo terapêutico a fim de se reduzir a conversão do CCL para Doença de Alzheimer (MANGIALASCHE et al., 2009; PARUDARIU et al., 2010). Entretanto, poucos trabalhos são encontrados na literatura a respeito dos benefícios do selênio sobre a cognição e, na maior parte dos estudos, a suplementação com esse mineral está associada a outros componentes (LESZEK et al., 1999; SCHELTENS et al., 2010; KESSE-GUYOT et al., 2011); e nenhum desses relata a utilização de alimentos ricos em selênio como fonte de suplementação. Assim, a proposta deste trabalho consistiu em aumentar o consumo de selênio em idosos com CCL por meio da ingestão diária de castanha-do-brasil, considerada a maior fonte alimentar do mineral (BEHR, 2004; THOMSON et al., 2008)

Contudo, polimorfismos em genes que codificam selenoproteínas podem alterar o metabolismo de selênio e as necessidades desse nutriente (FERGUSON; KARUNASINGHE, 2011; HESKETH, 2008; HESKETH; MÉPLAN, 2011), e nesse sentido, estudos apontam que o polimorfismo Pro198Leu no gene que codifica a GPx1 e os polimorfismos rs7579 e rs3877899 no gene da selenoproteína P repercutem em alteração na síntese de selenoproteínas (MÉPLAN, 2007; COMINETTI et al., 2011a; CARDOSO et al., 2012).

Desse modo, este trabalho visou avaliar os efeitos do consumo de castanha-do-brasil sobre o estado nutricional de selênio e o estresse oxidativo de idosos com CCL, bem como a influência dos polimorfismos Pro198Leu, rs7579 e rs3877899 na resposta ao tratamento.

Estruturalmente, esta tese é apresentada na forma de capítulos, sendo os primeiros referentes à revisão da literatura, aos objetivos e à apresentação da casuística e métodos. Na sequência, os dados obtidos no estudo são expostos separadamente em três artigos, em que o primeiro se refere aos efeitos do consumo de castanha-do-brasil no estado nutricional relativo ao selênio e desempenho cognitivo em idosos com CCL; o segundo discorre sobre as associações entre polimorfismos em genes de selenoproteínas e o estado nutricional relativo ao selênio e estresse oxidativo em pacientes com CCL; e o terceiro aborda os efeitos de polimorfismos nos genes da glutathione peroxidase 1 da selenoproteína P em resposta ao consumo de castanha-do-brasil em idosos com CCL.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Comprometimento cognitivo leve e estresse oxidativo

O diagnóstico de CCL engloba a preservação da capacidade de realização das atividades da vida diária, embora o risco para o desenvolvimento de uma demência seja maior (Quadro 1). Essa entidade é clinicamente heterogênea e, conforme a etiologia e o prognóstico, pode ser classificada em subtipos, considerando-se a base cognitiva. O CCL do tipo amnésico se caracteriza pela perda evidente de memória, além de apresentar biomarcadores mais condizentes com a Doença de Alzheimer, enquanto que o CCL não amnésico, em que não se identificam prejuízos na memória, se correlaciona com patologias cerebrovasculares (PETERSEN et al., 2009; HUGHES et al., 2011). O CCL também pode ser distinguido em CCL de múltiplos domínios ou de único domínio, conforme o número de domínios cognitivos prejudicados. Assim, o indivíduo pode ser classificado em um dos quatro subtipos clínicos possíveis: a) CCL amnésico de único domínio; b) CCL amnésico de múltiplos domínios; c) CCL não-amnésico de único domínio; d) CCL não-amnésico de múltiplos domínios (PETERSEN et al., 2014; HUGHES et al., 2011).

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">a) Queixa cognitiva referida pelo paciente ou por informante, ou observado pelo médicob) Distúrbio cognitivo evidenciado pela avaliação clínicac) Alteração de um ou mais domínios cognitivos quando comparado ao esperado para o indivíduod) Preservação da independência para realização das atividades da vida diáriae) Ausência de critérios para diagnóstico de demência |
|---|

Quadro 1: Critérios para diagnóstico de Comprometimento Cognitivo Leve (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013; PETERSEN et al., 2014).

Autores apontam que o desequilíbrio da homeostase, levando ao aumento da peroxidação lipídica, está intimamente ligado às desordens neurodegenerativas, sendo a oxidação da célula o primeiro processo que antecede essa enfermidade (CHAUHAN; CHAUHAN, 2006; ZHU et al., 2007). Nesse sentido, percebe-se que alguns parâmetros de estresse oxidativo são indistinguíveis

entre o CCL e a Doença de Alzheimer, sugerindo que o estresse oxidativo é uma das primeiras alterações na patogênese da demência (PRATICÒ, 2008; SEKLER et al., 2008; ANSARI e SCHEFF, 2010; SMITH et al., 2010; PADURARIU et al., 2010).

Segundo Chauhan e Chauhan (2006), baixas concentrações de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) são importantes para a manutenção do estado celular redox, para o funcionamento adequado do sistema imune e para sinalização celular apropriada. Além disso, sugere-se que os hidroperóxidos contribuam para a maturação dos eritrócitos e participem da diferenciação e da proliferação celular. Porém, o estado redox deve ser um mecanismo cuidadosamente regulado, pois caso o excesso de ERO e de ERN não sejam neutralizado, acabam reagindo com proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, causando prejuízos às funções celulares (BRIGÉLIUS-FLOHÉ, 1999).

O sistema nervoso central é particularmente vulnerável aos danos causados pelos radicais livres, por apresentar alto consumo de oxigênio e também pelo fato de o cérebro possuir grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados e nível diminuído de enzimas antioxidantes, quando comparado a outros tecidos (BRAINS; SHAW, 1997; BOURDEL-MARCHASSON et al. 2001; KEENEY et al., 2011). Ressalta-se a relevância dos efeitos do envelhecimento sobre as mudanças morfológicas e funcionais no sistema nervoso central, que afetam as árvores de dendritos e sinapses, a neurotransmissão, a circulação e o metabolismo, prejudicando a memória e o aprendizado. Além disso, existe tendência a aumentarem as reações que produzem ERO, paralelamente à diminuição dos processos que protegem o organismo dessas moléculas reativas (MARIANI et al., 2005; ZHU et al., 2007).

Nesse sentido, o desequilíbrio do sistema antioxidante frente à produção de radicais livres se relaciona com disfunção celular, o que contribui para o comprometimento da sinalização celular e do sistema enzimático celular, alteração do transporte de íons pela membrana neuronal e deterioração da função mitocondrial e de mecanismos que regulam a expressão gênica. Desse modo, estudos mostram que marcadores de estresse oxidativo como malondialdeído (MDA) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) estão aumentados em indivíduos com CCL; enquanto que a atividade antioxidante, mensurada pela atividade de enzimas antioxidantes e pela capacidade antioxidante total, se associa negativamente com declínio da cognição, sugerindo que o estresse oxidativo desempenha papel causal no declínio da cognição através da desestabilização de diversos mecanismos associados à degeneração neuronal (BERR et al., 2000;

TORRES et al., 2011; STEPHAN et al., 2012). Diante disto, Padurariu et al. (2010) sugerem que o aumento da produção de radicais livres observado no CCL pode provocar um rápido consumo de antioxidantes plasmáticos. Uma vez depletado, o sistema antioxidante deixa de proteger o organismo contra os danos oxidativos, e aí, em um ciclo vicioso, os pacientes com CCL ou demência apresentam uma atividade antioxidante insuficiente frente à produção de radicais livres, o que pode levar às alterações patológicas que caracterizam as doenças neurodegenerativas.

2.2 Selênio, selenoproteínas e comprometimento cognitivo leve

O selênio foi descoberto em 1818 pelo químico sueco Jons Jacob Berzelius. Após 140 anos, Schwarz e Foltz (1957) identificaram a função essencial do selênio para a saúde animal ao verificar que esse mineral atuava na prevenção de necrose em ratos (OLDFIELDS, 2002). Anos depois, Flohé et al. (1973) identificaram o selênio como cofator indispensável para o funcionamento da enzima GPx, enfatizando a importância desse mineral (KÖHRLE et al., 2000). Atualmente, diversas funções são atribuídas ao selênio, que as desempenha na forma de selenoproteínas, destacando-se: papel antioxidante, participação na conversão de T₄ em T₃, proteção contra ação nociva de metais pesados e xenobióticos, prevenção de doenças crônicas não transmissíveis e aumento da resistência pelo sistema imunológico (HOLBEN; SMITH, 1999; NAVARRO-ALARCOM; CABRERA-VIQUE, 2008).

Foram identificadas 25 selenoproteínas no genoma humano, das quais um terço apresenta capacidade antioxidante. São elas: cinco GPx, três iodotironina deiodinases, três tioredoxina redutases, uma selenoproteína de 15-kDa, selenoproteínas H, I, K, M, N, O, P, R, S, T, U, V e selenofosfato sintetase 2. O selênio se incorpora a essas proteínas na forma de selenocisteína, reconhecido como vigésimo primeiro aminoácido essencial por se diferenciar da cisteína pela presença de um átomo de selênio no lugar enxofre (HATFIELD et al., 2014).

Os estudos que avaliam a relação entre os níveis de selênio e o declínio cognitivo sugerem que a deficiência de selênio pode ser um risco para as demências (BERR et al., 2000; GAO et al., 2007; BERR et al., 2012), entretanto os resultados ainda são contraditórios. Cardoso et al. (2010) e Vural et al. (2010) verificaram que os pacientes com Doença de Alzheimer apresentavam grande deficiência de selênio quando comparados a idosos saudáveis, ao passo que

Ceballos-Picot et al. (1996) encontraram níveis aumentados de selênio plasmático em pacientes com Doença de Alzheimer quando comparados ao grupo Controle. Já Smorgon et al. (2004), ao avaliarem a associação entre elementos-traços e desempenho cognitivo em diferentes grupos com doenças neurodegenerativas, encontraram correlação direta entre concentração de selênio plasmático e nível de função cognitiva e, dessa maneira, os pacientes com Doença de Alzheimer apresentaram níveis reduzidos desse mineral quando comparados ao grupo controle.

A síntese de selenoproteínas é totalmente dependente da disponibilidade de selênio, e há uma hierarquia na sensibilidade ao consumo do mineral. Nesse sentido, observa-se que algumas selenoproteínas respondem rapidamente à deficiência de selênio com diminuição da sua atividade, enquanto outras se mantêm estáveis sob deficiência moderada e apenas reduzem a atividade frente à prolongada e notável depleção (BRIGÉLIUS-FLOHÉ, 1999). Assim, a deiodinase 1 é a selenoproteína menos vulnerável e encontra-se no topo da hierarquia; e, dentro da família das GPx, verifica-se uma prioridade para a GPx 2 e 4 em relação às GPx 1 e 3, enquanto que a selenoproteína P se encontra em posição intermediária. Uma provável interpretação para essa hierarquia entre as GPx sugere que estas são classificadas conforme a importância do seu desempenho para o organismo (SCHWEIZER et al., 2004; SCHOMBURG; SCHWEIZER, 2009).

Do mesmo modo, ocorre uma hierarquia quanto aos órgãos em relação ao *status* de selênio. Nesse sentido, o cérebro é o último órgão a ser depletado com a deficiência de selênio e, na repleção, este é o primeiro a estabelecer seus níveis adequados do mineral, mostrando a importância do selênio no funcionamento cerebral (BENTON, 2002; STEINBRENNER; SIES, 2013). Com base em modelo animal, observou-se que o suprimento de selênio para o cérebro é dependente de selenoproteína P. A selenoproteína P é o maior transportador de selênio, sendo responsável por até 60% do total desse mineral no soro. Tal função deve-se à presença de dez selenocisteínas, das quais uma se localiza no domínio N-terminal e nove encontram-se no resíduo C-terminal. Acredita-se que o domínio N-terminal atue como uma enzima, enquanto que o resíduo menor apresenta mecanismos para garantir o transporte adequado das moléculas de selênio, as quais são altamente reativas (FERGUSON et al., 2012).

Assim, observa-se que a selenoproteína P é essencial para o suprimento de selênio para a síntese de outras selenoproteínas em diferentes tecidos, como o cérebro, onde interage com um receptor específico para posterior liberação do selênio, disponibilizando-o para a síntese de

selenoproteínas (ZHANG et al., 2010; FAIRWEATHER-TAIT et al., 2011). À SePP também atribui-se papel antioxidante, visto que inibe a oxidação de moléculas de lipoproteínas de baixa densidade e é capaz de reduzir hidroperóxidos com a doação de elétrons a partir da glutathiona ou da tioredoxina (BURK et al., 2005; STEINBRENNER et al., 2006; FAIRWEATHER-TAIT et al., 2011)

Acredita-se que haja síntese de selenoproteína P no cérebro, que é então secretada no líquido cefalorraquidiano, onde se liga a células neuronais ou fica disponível para outros tecidos, servindo como um estoque de selênio. A biossíntese, armazenamento celular e recaptção de selenoproteína P, origina o denominado ‘ciclo da selenoproteína P’, e é consistente com o fato de que a expressão e a atividade desta selenoproteína podem ser mantidas no cérebro mesmo em situações de depleção orgânica, pois o *status* de selênio no cérebro funciona independentemente do restante do organismo. (SCHOMBURG; SCHWEIZER, 2009; ZHANG et al., 2010; COMINETTI et al., 2011a; FAIRWEATHER-TAIT et al., 2011).

Lu et al. (2004) e Miller et al. (2008) sugerem que os níveis de selenoproteína P tendem a aumentar com a idade e também nos casos de Doença de Alzheimer. Nesse sentido, Bellinger et al. (2008) identificaram a presença de selenoproteína P agregada a placas senis e também a emaranhados neurofibrilares e, assim, levantaram duas hipóteses: a selenoproteína P pode atuar de maneira direta como antioxidante ou, de maneira indireta, transportando selênio para a síntese de outras selenoproteínas antioxidantes. Nesse sentido, Takemoto et al. (2010) observaram, *in vitro*, que células neuronais expostas aos efeitos oxidativos das placas senis eram protegidas quando na presença de selenoproteína P.

As GPx constituem uma família com cinco enzimas dependentes de selênio. No cérebro, essas enzimas são expressas nos neurônios e principalmente nas células da glia, e têm como principal função a eliminação de peróxidos (GARCIA et al., 2009; ZHANG et al., 2010). Para isso, as GPx estão envolvidas numa sequência de reações que visam à redução de peróxidos de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos (TAPIERO et al., 2003; SCHUESSEL et al., 2004; GONZAGA et al., 2005). Todas essas enzimas obtêm elétrons via glutathiona, porém diferem entre si quanto à especificidade para os diferentes substratos de hidroperóxido e à distribuição nos tecidos (HERBETTE et al., 2007).

A GPx1, também conhecida como citosólica, é encontrada em todas as células, apresentando expressão mais elevada em tecidos com alta produção de peróxidos, como rins,

figado e eritrócitos. Essa enzima tem a capacidade de reduzir ampla quantidade de peróxidos de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos livres. A GPx2, ou gastrintestinal, possui a mesma estrutura e o mesmo substrato da GPx1, sendo encontrada principalmente em órgãos do aparelho digestivo, como estômago e intestino, enquanto a GPx3 tem sua maior expressão nos rins. A GPx4 é encontrada principalmente nos testículos, nos espermatozoides, no coração, no fígado, nos rins e no cérebro, nas isoformas mitocondrial, citosólica e nuclear. Diferente das outras GPx, a GPx4 é capaz de reduzir hidroperóxidos de fosfolípidios e colesterol diretamente, sendo sua isoforma mitocondrial quem media a resposta apoptótica frente ao estresse oxidativo. A GPx 6 foi recentemente identificada no epitélio olfatório e em tecidos embrionários (FLORIAN et al., 2001; SAREWKO et al., 2002; TAPIERO et al., 2003; LEI et al., 2007; HERBETTE et al., 2007; COMINETTI et al., 2011a).

Alguns estudos sugerem que o declínio cognitivo está associado com a redução da atividade da GPx. Nesse sentido, Cardoso et al. (2010), Vural et al. (2010) e Torres et al. (2011) observaram menor atividade dessa família de enzimas nos pacientes com Doença de Alzheimer quando comparados a indivíduos saudáveis; enquanto que Padudariu et al. (2010) verificaram que, além dos pacientes demenciados, aqueles com declínio cognitivo leve também apresentavam menor atividade de GPx1.

2.3 Polimorfismos nos genes que codificam GPx1 e selenoproteína P

Pesquisas estão voltadas para a detecção de variações em diversos genes, incluindo aqueles que codificam enzimas de defesa antioxidante, e as suas possíveis consequências fenotípicas, dentre as quais se destacam variações inter-individuais em resposta a micronutrientes (FERGUSON; KARUNASINGHE, 2011; HESKETH, 2008; HESKETH; MÉPLAN, 2011). Nesse sentido, uma vez que o metabolismo do selênio ocorre em sistema hierárquico, em que a depleção de selênio gera manutenção da síntese de algumas selenoproteínas em detrimento de outras, um polimorfismo em gene que codifica determinada selenoproteína pode alterar sua própria função ou até mesmo de outras selenoproteínas. Assim, a combinação de polimorfismos em genes que codificam selenoproteínas com o consumo inadequado de selênio poderia influenciar, de forma negativa, os mecanismos antioxidantes, aumentando a suscetibilidade para algumas doenças; por outro lado, variações em genes de selenoproteínas poderiam também

interferir significativamente na resposta frente ao consumo de selênio (MÉPLAN et al., 2006; SHINKAI et al., 2006; HESKETH; MÉPLAN, 2011).

Com o intuito de encontrar novos polimorfismos em genes que codificam para enzimas antioxidantes, FORSBERG et al. (1999) detectaram um ponto de mutação na posição 593 C/T que causa a substituição de uma prolina (Pro) por uma leucina (Leu) no códon 198 no gene da GPx1 (rs1050450). Jablonska et al. (2009), Cominetti et al. (2011a) e Karunasinghe et al. (2012) verificaram diferentes associações entre a atividade da GPx e a concentração de selênio no plasma quando comparados os três genótipos, mostrando indícios de que o genótipo pode interferir na atividade da enzima e, assim, a avaliação da atividade da enzima deve ser acompanhada da genotipagem quando o intuito for caracterizar o estado de selênio.

Ravn-Haren et al. (2006), ao analisar os genótipos relacionados ao polimorfismo Pro198Leu em mulheres dinamarquesas com e sem diagnóstico de câncer de mama, observaram uma redução de 5% na atividade da enzima GPx para cada cópia adicional do alelo variante. Já Cardoso et al. (2012) observaram menores concentrações séricas de selênio em pacientes com Doença de Alzheimer portadores do genótipo Pro/Pro quando comparados a idosos saudáveis com o mesmo genótipo. Também verificaram associação entre atividade da GPx e concentração eritrocitária de selênio somente nos indivíduos com genótipo de referência, sugerindo que o alelo Leu é menos responsivo ao aumento do consumo de selênio. Outro estudo, realizado por Paz-Y-Miño et al. (2010), apontou uma associação entre o alelo Leu e o aumento do risco para Doença de Alzheimer.

Já em relação à selenoproteína P, cinco polimorfismos genéticos foram identificados, dos quais dois merecem destaque: o polimorfismo rs7579, no qual ocorre a troca de uma guanina por uma alanina no ponto 25191, e que está presente na região codificadora do gene; e o polimorfismo rs3877899 (Ala234Thr), que corresponde à troca de uma guanina por uma alanina no ponto 24731, resultando em substituição do aminoácido alanina (Ala) por treonina (Thr) no códon 234. Uma vez que esse ponto de mutação se localiza na região 3'UTR do gene, esse polimorfismo associa-se com um potencial efeito sobre a incorporação de selenocisteína durante a síntese proteica (AL-TAIE et al., 2004; MÉPLAN et al., 2007).

Estudos sugerem que esses dois polimorfismos no gene que codifica a selenoproteína P interferem no estado nutricional de selênio e na resposta ao consumo desse nutriente (MÉPLAN et al., 2007; MÉPLAN et al., 2009). Méplan et al. (2007) observaram que indivíduos obesos com

genótipo homozigoto de referência apresentaram maiores níveis de selênio plasmático após receberem suplementação com 100 µg de selenito de sódio quando comparados aos indivíduos com alelo variante. Já indivíduos com alelo variante de rs7579 tinham menores níveis séricos do mineral antes e após a suplementação. A partir dos dados encontrados, os autores levantaram a hipótese de que o polimorfismo rs3877899 provoca alterações pós-traducionais, o que poderia afetar a concentração dessa proteína quando o consumo é inadequado. Por outro lado, o polimorfismo rs7579 poderia afetar a eficiência da síntese de selenoproteína P por induzir uma mudança na função SECIS. Os autores destacam ainda que os dois polimorfismos agem de maneira conjunta e, por afetarem a síntese da selenoproteína responsável pelo transporte de selênio, podem acarretar mudanças nos diversos parâmetros bioquímicos que avaliam o estado nutricional quanto ao mineral.

2.4 Intervenção alimentar com castanha-do-brasil

O rim e o fígado bovinos, frutos do mar, peixes, carnes e trigo apresentam-se como boas fontes de selênio, entretanto é importante ressaltar que a quantidade de selênio contida nos alimentos reflete suas concentrações no solo e, assim, um mesmo tipo de alimento pode apresentar concentração heterogênea do mineral caso seja proveniente de áreas diferentes (GONZAGA et al., 2005; RAYMAN, 2008; THOMSON et al., 2008). Desse modo, a castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) se coloca como a melhor fonte do mineral por conter grandes concentrações, cujos valores variam entre 5,8 e 169,9 µg/g do alimento (PACHECO; SCUSSEL, 2007; BORTOLI et al., 2010; COMINETTI et al., 2012; PIRES, 2012; ROCHA et al., 2014). Além disso, o selênio encontrado na castanha-do-brasil apresenta-se predominantemente como selenometionina, a forma com maior biodisponibilidade (BODÓ et al., 2003; DA SILVA et al., 2013). Destaca-se também que a castanha apresenta quantidades elevadas de compostos fenólicos e expressiva atividade antioxidante, pois inibe peroxidação lipídica em cascata e promove a neutralização do radical DPPH (PIRES et al., 2010).

Thomson et al. (2008) melhoraram o *status* de selênio de indivíduos saudáveis ao suplementá-los com duas castanhas-do-brasil diariamente durante 12 semanas. Porém outros estudos verificaram que o consumo de apenas uma castanha-do-brasil diariamente foi também

eficiente em recuperar o *status* de selênio em pacientes hemodializados, em mulheres obesas e em idosos (BEHR, 2004; STOCKLER-PINTO et al., 2010; COMINETTI et al., 2011b).

Desse modo, a castanha-do-brasil também pode ser eficiente em melhorar o *status* de selênio de pacientes com CCL, e isso pode ser um alvo terapêutico importante no que diz respeito à manutenção das funções cognitivas desses pacientes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do consumo de castanha-do-brasil sobre o estresse oxidativo, o estado nutricional relativo ao selênio, a expressão gênica de selenoproteínas e a função cognitiva de idosos com CCL.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o estado nutricional relativo ao selênio e o nível de estresse oxidativo de indivíduos com CCL;

- Verificar a influência dos polimorfismos Pro198Leu no gene da GPx1, e dos polimorfismos rs3877899 e rs7579 no gene da selenoproteína P sobre o *status* de selênio, a atividade antioxidante e a resposta à suplementação nos participantes.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Amostra

Este estudo foi realizado com indivíduos com CCL, voluntários, de ambos os sexos, frequentadores do Ambulatório de Memória do Idoso (AMI) do Serviço de Geriatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com idade igual ou superior a 60 anos.

Os participantes foram solicitados a preencher um questionário, a fim se obter informações socioeconômicas, sobre o uso de medicamentos e/ou suplementos e a presença de doenças (Apêndice I). A partir desses dados coletados, todos os frequentadores do ambulatório no período entre maio de 2011 e agosto de 2012 que preencheram os critérios de inclusão (Quadro 2) foram convidados a participar do estudo.

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">a) Preenchimento dos critérios para diagnóstico de CCL, propostos por Windblad et al. (2004), que incluem: alteração cognitiva, porém sem demência; evidência de perda cognitiva verificada por entrevista subjetiva e por avaliação objetiva; preservação das atividades da vida diária;b) idade igual ou superior a 60 anos;c) fluência em Português;d) ausência de outras doenças neurológicas e psiquiátricas, como depressão e psicose;e) ausência de inflamação aguda, infecção, febre, diarreia ou câncer;f) ausência de demência, conforme os critérios do NINCDS-ADRDA (MCKHANN et al., 1984);g) não consumo regular de castanha-do-brasil ou de suplementos alimentares com selênio;h) ausência de alergia alimentar a oleaginosas. |
|--|

Quadro 2: Critérios de inclusão para participação do estudo

No momento da entrevista, todos os participantes da pesquisa foram esclarecidos sobre os procedimentos aos quais seriam submetidos. Os participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice II), o qual descreve informações sobre o projeto, de acordo com a Resolução CNS nº 196/96, itens III, IV e V, que trata da proteção dos

participantes e orienta procedimentos referentes às pesquisas que necessitam experiências com humanos.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEP FCF-USP) sob o protocolo CEP n° 568 (Anexo 1).

4.2 Protocolo Experimental

Os participantes da pesquisa foram distribuídos aleatoriamente no dia da primeira coleta de sangue por randomização simples, preparada com alocação 1:1 em envelopes opacos e lacrados, enumerados sequencialmente. No momento da primeira coleta de sangue, cada participante abria um envelope contendo a palavra “castanha” ou “controle”, e assim passava a constituir o respectivo grupo.

O grupo Castanha foi orientado a consumir uma unidade de castanha-do-brasil por dia, por um período de 6 meses. As castanhas foram fornecidas aos participantes a cada 60 dias, juntamente com as informações nutricionais, as orientações e um calendário para controle do consumo. Periodicamente os pesquisadores entravam em contato por telefone ou pessoalmente a fim de verificar a adesão ao tratamento. Todos os participantes foram orientados para devolver as castanhas não consumidas, e a adesão ao tratamento foi considerada com o consumo mínimo de 85% das castanhas. Ambos os grupos foram orientados para que nenhuma alteração no padrão alimentar fosse realizada durante o período de estudo. As castanhas utilizadas no estudo eram originárias da Amazônia, e foram cedidas à pesquisa pelo Instituto Excelsa.

Os participantes do estudo foram submetidos a 2 avaliações periódicas, incluindo a coleta de sangue, a realização do registro alimentar de 3 dias e a avaliação cognitiva. Tais avaliações foram realizadas imediatamente antes do início do estudo e após 6 meses de estudo, dentro de uma semana após o término das castanhas.

O material biológico coletado foi analisado para: avaliar o perfil lipídico; caracterizar o estado nutricional dos indivíduos quanto ao selênio; mensurar a atividade da enzima GPx; avaliar o estresse oxidativo; verificar a expressão gênica da GPx1 e da selenoproteína P; determinar o polimorfismo Pro198Leu no gene que codifica a GPx1 e os polimorfismos rs7579 e rs3877899 no gene que codifica a selenoproteína P.

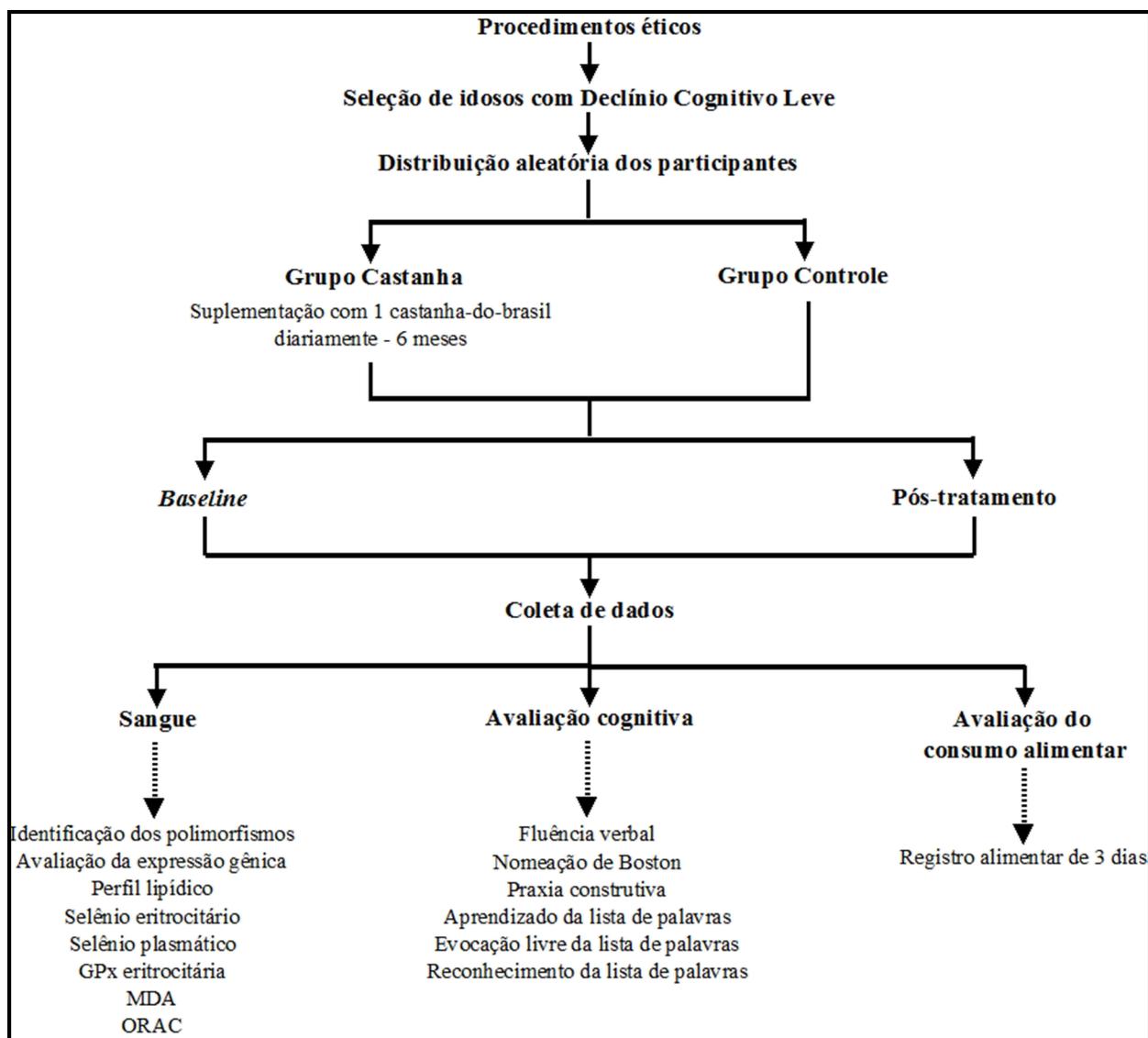


Figura 1: Desenho experimental

4.3 Avaliação da composição química das castanhas

Uma análise laboratorial em triplicata, de acordo com a AOAC (1990), foi realizada em amostra aleatória de castanhas antes do início da intervenção. Para tanto, as castanhas foram trituradas e liofilizadas, e a determinação de umidade foi realizada pela diferença de peso antes e depois da liofilização, enquanto que as cinzas foram analisadas pela perda de peso após aquecimento a 550°C. Proteínas totais foram determinadas pelo método de micro-Kjeldahl, enquanto o teor lipídico foi avaliado pelo método de Soxhlet. Obteve-se o valor de carboidrato pela diferença entre o teor lipídico e proteico da massa seca total.

O teor de selênio foi determinado por espectrofotometria de absorção atômica por geração de hidretos acoplados a cela de quartzo (HGQTAAS) (HAO, 1996). Nesse caso, amostras de castanha com aproximadamente 300 mg foram transferidas para tubos micro-Kjeldhal, onde foram adicionados 5 mL de ácido nítrico P.A. (Merk) para o processo de digestão, que foi realizado em bloco digestor com temperatura aproximada de 150°C. Após a volatilização 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. Posteriormente, essas amostras foram aquecidas sob temperatura de 200°C por um período de duas horas. Após essa etapa, as amostras foram diluídas para 100 mL de água deionizada e submetidas à leitura.

4.4 Avaliação do consumo de selênio

A avaliação do consumo de selênio foi realizada pelo método de registro alimentar de três dias. No momento da entrega dos formulários (Apêndice 3), os participantes foram orientados quanto ao registro de todos os alimentos e bebidas consumidos durante dois dias de semana não consecutivos e um de final de semana.

Os dados dos registros (proteínas, carboidratos, lipídios e selênio) foram calculados com o *software* NutWin, versão 1.5.1.11, do Departamento de Informática da Escola Paulista de Medicina/UNIFESP. O banco de dados desse *software* foi alimentado com dados de selênio em alimentos nacionais provenientes do trabalho de Ferreira et al. (2002).

Os valores de selênio resultantes do cálculo dos registros alimentares foram ajustados pela energia através do método residual de Willett (WILLETT, 1998), calculado por meio de regressão linear (regressão linear do consumo do nutriente sobre o consumo calórico total) e de adição de uma constante (consumo energético médio do grupo).

4.5 Avaliação cognitiva

A avaliação das funções cognitivas foi realizada por médico ou neuropsicólogo treinado e cego quanto à composição dos grupos de estudo. Foram utilizados os seguintes subtestes da bateria CERAD:

a) Teste de Fluência Verbal (ISAACS; KENNIE, 1973): nesse teste, solicita-se que o entrevistado fale todos os animais que conseguir se lembrar, e são pontuados todos os animais

mencionados pelo indivíduo no período de um minuto. Este teste avalia a fluência verbal, que depende da capacidade de acesso semântico, e da riqueza de vocabulário do participante

b) Teste de Nomeação de Boston (KAPLAN et al., 1983): nele são apresentadas 15 figuras ao entrevistado (árvore, cama, apito, flor, casa, canoa, pegador de gelo, escova de dentes, vulcão, máscara, camelo, gaita, rede, funil e dominó), que deve nomeá-las corretamente, valendo um ponto cada acerto. Esse teste é considerado uma prova de linguagem, avaliando a capacidade de nomeação e a capacidade de percepção visual.

c) Praxia construtiva (ROSEN et al., 1984): nesse teste, solicita-se que o entrevistado faça a cópia de quatro desenhos apresentados pelo examinador (círculo, losango, retângulos sobrepostos e cubo). Cada cópia é avaliada separadamente, considerando-se formato, ângulos, dimensão e tamanho das figuras. Essa prova avalia habilidades perceptivas e visuoconstrutivas, e a pontuação máxima é de 11 pontos.

d) Aprendizado da lista de palavras (ATKINSON; SHIFFRIN, 1971): nesse teste, o examinador lê uma lista com dez palavras a um ritmo de 2 segundos por palavra. Após a leitura é feita a evocação livre, por um período máximo de 90 segundos. O procedimento é repetido outras duas vezes. A pontuação é obtida pela soma das palavras evocadas nas três tentativas. Esse teste avalia a memória episódica, e os três resgates consecutivos avaliam a curva de aprendizagem.

e) Evocação livre da lista de palavras (ATKINSON; SHIFFRIN, 1971): esse teste é aplicado imediatamente após o teste da praxia, e solicita-se que o entrevistado recorde a lista de palavras apresentada anteriormente no período máximo de 90 segundos, podendo-se alcançar a pontuação máxima de 10 pontos. Essa prova avalia a capacidade de consolidação na memória de longo prazo.

4.6 Coleta de sangue

Nas dependências do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), realizou-se a coleta de material biológico, em que foram coletados 20 mL de sangue após 12 horas de jejum de todos os participantes nas duas fases de estudo. Foram utilizadas seringas plásticas descartáveis e agulhas de aço inoxidável, estéreis e descartáveis. O sangue foi colocado em um tubo com EDTA para coleta a vácuo e mantido sob baixa

temperatura com auxílio de gelo para ser transportado. O plasma foi separado do sangue total por centrifugação a 3000 x.g durante 15 minutos a 4°C. A massa eritrocitária obtida do sangue total, também por centrifugação, foi lavada três vezes com 5 mL de solução salina a 0,9%, homogeneizada lentamente por inversão e centrifugada a 10.000 x.g por 10 minutos (SORVALL® RC5C) a 4°C, sendo o sobrenadante descartado. Tanto o plasma como a massa eritrocitária foram acondicionados em microtubos previamente desmineralizados e armazenados a -80°C. Essas amostras foram utilizadas para a análise de selênio, de selenoproteína P e da atividade da GPx.

Separou-se 1 mL de sangue em tubos com EDTA para extração do DNA genômico e posterior determinação dos polimorfismos rs1050450, rs7579 e rs3877899. Para análise da expressão de RNA, 300 µL de sangue total foram acondicionados em frascos contendo 1,5 mL de RNA-later (QIAGEN, Valencia, CA, USA) e refrigerados imediatamente a -80°C até o momento da extração do RNA.

Para determinação do perfil lipídico, 1 mL de soro foi acondicionado separadamente a 80°C até o momento da análise.

As amostras de sangue foram identificadas com códigos e armazenadas no Laboratório de Nutrição-Minerais – FCF/USP, em banco de materiais biológicos.

4.7 Concentração de selênio no plasma e eritrócitos

A concentração de selênio no plasma e nos eritrócitos foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica por geração de hidretos acoplados a cela de quartzo (HGQTAAS) (HAO et al., 1996).

Esse método consiste na separação do selênio das amostras e na formação de hidretos gasosos de selênio (H₂Se), originados da reação dos compostos de selênio (IV). Para isso, foram adicionados 5 mL de ácido nítrico 68% P.A. (Merk) às alíquotas de plasma e eritrócitos previamente colocadas em tubos micro-Kjeldhal. Esses tubos foram colocados em um bloco digestor cuja temperatura foi elevada gradativamente de 50°C a 150°C. Após a volatilização 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. Posteriormente, essas amostras foram aquecidas sob

temperatura de 200°C por um período de duas horas. Após essa etapa, as amostras foram diluídas para 25 mL de água deionizada e submetidas à leitura.

Todos os reagentes utilizados na análise tinham qualidade analítica ou maior pureza (Merck®). A fim de se reduzir a contaminação por minerais, todos os materiais utilizados para a análise de selênio, incluindo vidraria, recipientes e frascos, foram desmineralizados em banho de ácido nítrico (20%) durante 12 horas e posteriormente enxaguados dez vezes em água ultrapura.

Para controle do método de análise de selênio, foi adotado como padrão de referência o material certificado SERONORM®, cujo conteúdo foi preparado conforme as instruções do fabricante e processado da mesma maneira como as demais amostras.

4.8 Análise da atividade eritrocitária da enzima GPx

A determinação da atividade da GPx foi realizada no eritrócito com o auxílio de *kit* comercial (Ransel 505 – RANDOX Laboratories, Crumlin/UK) adaptado para o uso em analisador bioquímico automático (Liasys® MAS, Rome, Italy).

O método se baseia na reação em que a GPx catalisa a oxidação da glutatona reduzida por um hidroperóxido. Na presença de GPx e NADPH, a glutatona oxidada é imediatamente convertida à forma reduzida com a oxidação concomitante do NADPH em NADH⁺. A diminuição na absorvância a 340 nm é, então, determinada (PAGLIA; VALENTINE, 1967).

Para determinação da GPx, foram adicionados 600 µL de água ultrapura a 4°C à papa de hemácias. Após agitação no vórtex, o material foi colocado sob refrigeração por 10 minutos e, posteriormente, centrifugado em 11200 x.g durante 2 minutos. Realizou-se uma diluição do sobrenadante com o diluente fornecido pelo *kit* antes da análise. Determinou-se a concentração de hemoglobina no mesmo hemolisado conforme Van Assendelft (1972) e o resultado final foi expresso em unidades de enzima por grama de hemoglobina.

4.9 Avaliação do perfil lipídico

O perfil lipídico foi analisado no início do estudo para caracterização dos participantes. Para tanto, *kits* comerciais da marca Labtest (Minas Gerais, Brasil) foram utilizados para determinar triglicerídeos (Cat. N°. 87), colesterol total (Cat. N°. 76), lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) (Cat. N°. 111) e lipoproteína de alta densidade (HDL-c) (Cat. No. 98). A

fração de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-c) foi calculada conforme a equação de Friedewald (1972): $VLDL-c = \text{triglicerídeos}/5$.

4.10 Determinação dos polimorfismos rs1050450 da enzima glutathiona peroxidase 1, e rs7579 e rs3877899 da selenoproteína P

O DNA genômico foi extraído do sangue total com o *kit* Purelink Genomic DNA kit (Invitrogen, Life Technologiemensurada em Nanos Inc., Carlsbad, CA, USA), e a concentração final foi quantificada em espectrofotômetro Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

O polimorfismo Pro198Leu no gene da GPx1 e os polimorfismos rs7579 e rs3877899 no gene da SePP foram determinados por real-time PCR com o sistema TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As reações finais foram realizadas em volume de 20 μL contendo: 12.5 μL de 2x TaqMan Genotyping Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 1.25 μL de 20x SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA), 20 ng de DNA genômico e água ultrapura para completar o volume final.

As reações de PCR foram analisadas no equipamento StepOne Real-Time PCR System como segue: 10 minutos a 95°C para ativação enzimática seguida por 40 ciclos a 92°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto para anelamento e extensão.

4.11 Determinação da expressão gênica da glutathiona peroxidase 1 e da selenoproteína P

O RNAm foi extraído com o *kit* RiboPure™ – Blodd Kit (Applied Biosystems). Após essa etapa, o RNA foi tratado com DNase I, a fim de remover qualquer contaminação com DNA genômico. Na sequência, quantificou-se o RNA por meio de leitura no espectrofotômetro Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) nos comprimentos de onda (λ) de 260nm (RNA) e 280 nm (proteína). O grau de pureza da amostra foi avaliado através da relação das leituras 260 e 280 nm, sendo considerados ideais os valores entre 1,8 e 2,0.

Para transcrição reversa do RNA total para cDNA, utilizou-se Super-script III™ Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carllsbad, CA, USA), e o cDNA foi ajustado para a concentração de 20 ng/ μL e volume final de 20 μL .

Real-time PCR quantitativo (qRT-PCR) dos genes GPx1 e SePP foi realizado em duplicata para cada amostra no equipamento StepOne Real-Time PCR System utilizando-se Taqman® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) específicos para cada gene. Cada reação continha 4 µL de cDNA, 10 µL de Taqman® Universal Master Mix II (Applied Biosystems, Foster City, CA), 1 µL de 20x Taqman® Gene Expression Assay e 5 µL de água RNase-free em um volume final de 20 µL.

A especificidade da reação qRT-PCR foi demonstrada pela análise da curva de desnaturação (*melting curve*) que mostrou a presença de apenas um pico para todos os produtos da reação de GPx1 e de SePP. O gene de referência utilizado foi a β-actina e, para cada placa de análise, incluiu-se uma amostra sem c-DNA que serviu de controle negativo.

A expressão de RNA foi calculada com o método Delta-Delta C_T (ΔΔC_T) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para tanto, calculou-se o valor de ΔC_T de cada amostra pela subtração dos valores de *threshold cycle* (C_T) do gene controle (β-actina) dos valores de C_T do gene alvo. Após determinação do ΔC_T, a média do ΔC_T das amostras do *baseline* dos genótipos de referência para cada polimorfismo avaliado foi utilizada como normatizadora para cálculo do ΔΔC_T, que tem a seguinte fórmula: ΔC_T amostra - ΔC_T (média das amostras do gene de referência). Na sequência, aplicou-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$ que resultou no valor da expressão gênica relativa (*fold change*).

4.12 Determinação do oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

O ORAC foi determinado com base no método proposto por Prior et al. (2003), e baseia-se na mensuração da inibição do radical peroxil, mostrando resistência aos danos oxidativos. Para tanto, o plasma foi desproteínezado com ácido perclórico, e posteriormente as amostras foram diluídas 10x com tampão fosfato (pH 7,4). Nas análises, realizadas em duplicata, 25 µL de amostra foram adicionadas à microplaca com 48 poços, e em seguida foram adicionados 150 µL de solução de fluoresceína e 25 µL de 2,2-azobis(aminopropano) diidrocloreto (AAPH) por injetores automáticos do leitor de microplacas (Biotech Synergy H1).

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

4.13 Determinação da concentração plasmática de malondialdeído (MDA)

A concentração de malondialdeído no plasma foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) como descrito previamente por Hong et al. (2000).

Foram adicionados 36 μL hidroxitolueno butilado (BHT) e 12,5 μL de hidróxido de sódio 10N a 250 μL de plasma e, na sequência, as amostras foram incubadas no aparelho vortemp® a 60°C e 300 rpm durante 30 minutos. Em seguida adicionaram-se 500 μL de ácido tricloroacético e iodeto de potássio a 1% para precipitação das proteínas; as amostras foram agitadas no vórtex e levadas ao gelo, onde permaneceram por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos e 500 μL do sobrenadante foram retirados e transferidos para um novo microtubo, em que se acrescentaram 250 μL de ácido tiobarbitúrico dissolvido em ácido tricloroacético. Voltou-se a agitar as amostras antes de incubá-las novamente no vortemp® a 90°C e 200 rpm durante 45 minutos. Para extração do MDA, foram adicionados 250 μL de n-butanol à solução anterior, agitando-a no vórtex antes da centrifugação final (3000 rpm por 10 minutos). Retiraram-se 100 μL do sobrenadante que foi transferido para um vial e injetado no equipamento. A determinação foi realizada em HPLC da marca Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com coluna Phenomenex Reverse-phase C18 de 150 mm x 4,6 mm com partículas de 5 μm (Phenomenex, Torrance, CA). A temperatura no amostrador foi mantida em 4°C, e a temperatura da coluna a 30°C. A fase móvel utilizada foi constituída de 65% de tampão fosfato de potássio e 35% de metanol. O volume de injeção foi de 50 μL , a taxa de fluxo de 1 mL/minuto e o tempo de corrida de 10 minutos. A fase móvel utilizada será 65% de tampão fosfato de potássio (50 mM; pH 6,0) e 35% de metanol. A detecção foi realizada utilizando-se a absorvância de 532 nm.

Uma curva padrão com os pontos 0; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 e 2,5 μM foi construída utilizando-se uma solução estoque de MDA, preparada imediatamente antes da avaliação.

4.14 Análise estatística dos dados

Para realização da análise estatística dos dados, utilizou-se o programa SPSS para *Windows*, versão 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

O teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado a fim de verificar a tendência de distribuição das variáveis analisadas, e testes não paramétricos foram utilizados quando pertinente.

Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão, média da mudança do pós-tratamento em relação ao *baseline* com seu respectivo intervalo de confiança. Variáveis categóricas foram apresentadas como número absoluto e porcentagem. Características do *baseline* foram comparadas com os dados do período pós-tratamento por meio do teste t-pareado ou Wilcoxon. As diferenças entre os grupos (tratado *versus* não tratado; genótipos) foram avaliadas com o teste t para amostras independentes quando as variáveis eram contínuas, ou com o Mann-Whitney U como alternativa não paramétrica.

O coeficiente da correlação de Pearson ou de Spearman foi utilizado para estimar as correlações entre parâmetros de função cognitiva e parâmetros de *status* de selênio e de estresse oxidativo, bem como para avaliar a correlação entre selênio eritrocitário e atividade da GPx.

Para explorar a associação entre os parâmetros de selênio e os genótipos de Pro198Leu, rs7579 e rs3877899, controlando-se para confundidores, realizou-se regressão linear múltipla hierárquica. Nos modelos, os parâmetros de selênio no plasma e no eritrócito foram usados como variáveis dependentes e os genótipos foram incluídos como variáveis independentes primárias. As covariáveis foram inseridas em três passos sequenciais para examinar sua relevância: no primeiro passo, o genótipo foi inserido sem covariáveis; no segundo passo, idade e gênero foram incluídos; no último passo, o consumo de selênio foi avaliado. Também elaboraram-se modelos de regressão hierárquica para avaliar a associação entre os genótipos e os parâmetros de estresse oxidativo. Nesse caso, os valores de ORAC, MDA e GPx foram alternadamente usados como dependentes variáveis, e os genótipos novamente como variáveis independentes primárias. As covariáveis foram inseridas como seguem: 1) genótipos sem covariáveis; 2) selênio no eritrócito; 3) variáveis sociodemográficas (idade e gênero).

Referências

- AL-TAIE, O. H. et al. Expression profiling and genetic alterations of the selenoproteins GI-GPx and SePP in colorectal carcinogenesis. **Nutr. Cancer**, v. 48, p. 6-14, 2004.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. 5th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association, 2013.
- ANSARI, M. A; SCHEFF, S. W. Oxidative Stress in the Progression of Alzheimer Disease in the Frontal Cortex. **J Neuropathol Exp Neurol**. v. 69, n. 2, p. 155-167, 2010.
- AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15. ed. Washington: AOAC, 1990.
- ATKINSON, R. C.; SHIFFRIN, R. M. The control of short-term memory. **Scientific American** v. 221, p. 82-90, 1971.
- 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.
- BELLINGER, F. P. et al. Association of Selenoprotein P with Alzheimer's Pathology in Human Cortex. **J Alzheimers Dis.**, v. 15, n. 3, p. 465-472, 2008.
- BENTON, D. Selenium Intake, Mood and Other Aspects of Psychological Functioning. **Nutritional Neuroscience**, v. 5, n. 6, p. 363-374, 2002.
- BERR, C. et al. Cognitive decline is associated with systemic oxidative stress: the EVA study. Etude du Vieillissement Artériel. **J Am Geriatr Soc.**, v. 48, n. 10, p. 1285-1291, 2000.
- _____. et al. Selenium and cognitive impairment: a brief-review based on results from the EVA study. **Biofactors**. v. 38, n. 2, Mar.-Apr. p. 139-44. 2012.
- BODÓ, E. T. et al. Preparation, homogeneity and stability studies of a candidate LRM for Se speciation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 377, n. 1, p. 32-38. 2003.
- BOURDEL-MARCHASSON, I. et al. Antioxidant defences and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients. **Age Ageing.**, v. 30, p. 235-241, 2001.
- BORTOLI, M. C. **Avaliação dos níveis sanguíneos do hormônio tireoidiano ativo (T'IND.3') e do estado nutricional relativo ao selênio de mulheres residentes em área de exposição ao mercúrio**. Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP. 2009. 130 p.
- BRAINS, J. S.; SHAW, C. A. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. **Brain Res.**, v. 25, p. 335-358, 1997.

BRIGÉLIUS-FLOHÉ, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. **Free Rad Biol Med.**, v. 27, n. 9/10, p. 951-965, 1999.

BURK, R. F.; HILL, K. E. Selenoprotein P: An extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. **Annu. Rev. Nutr.** v. 25, p. 215-235. 2005.

CARDOSO, B. R. et al. Nutritional status of selenium in Alzheimer's disease patients. **British Journal of Nutrition**, v. 103, p. 803-806, 2010.

CARDOSO, B. R. et al. Glutathione peroxidase 1 Pro198Leu polymorphism in Brazilian Alzheimer's disease patients: relations to the enzyme activity and to selenium status. **J Nutrigenet Nutrigenomics**. v. 5, n. 2, p. 72-80, 2012.

CEBALLOS-PICOT I. et al. Peripheral antioxidant enzyme activities and selenium in elderly subjects and in dementia of Alzheimer's type-place of the extracellular glutathione peroxidase. **Free Rad Biol Med.**, v. 20, p. 579-587, 1996.

CHAUHAN, V.; CHAUHAN A. Oxidative stress in alzheimer's disease. **Pathophysiology**, v.13, p.195-208, 2006.

COMINETTI, C. et al. Considerations about oxidative stress, selenium and nutrigenetics. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 36, n. 3, p. 131-153, 2011a.

COMINETTI, C. et al. Associations between glutathione peroxidase-1 Pro198Leu polymorphism, selenium status, and DNA damage levels in obese women after consumption of Brazil nuts. **Nutrition**, v. 9, p.891-896, 2011b.

CROUCH, P. J. et al. Mechanisms of A β mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 40, p.181-198, 2008.

CUI, K. et al. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.**, v. 28, p. 771-799, 2004.

DAMIER, P. et al. Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 52, p. 1-6, 1993.

DA SILVA, E. G. et al. Speciation analysis of selenium in plankton, Brazil nut and human urine samples by HPLC-ICP-MS. **Talanta**, v. 110, p. 53-57, 2013.

ETGEN T. et al. Metabolic and endocrine factors in mild cognitive impairment. **Ageing Research Reviews**, v. 9, p. 280-288, 2010.

- FAIRWEATHER-TAIT, S. J. et al. Selenium in Human Health and Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14, n. 7, 2011.
- FERGUSON, L. R.; KARUNASINGHE, N. Nutrigenetics, nutrigenomics, and selenium. **Front Genet.**, v. 2, p. 1-1, 2011.
- FERGUSON, L. R, et al. Selenium and its' role in the maintenance of genomic stability. **Mutation Research**, v. 733, p. 100-110, 2012.
- FERREIRA, K. S. et al. Concentrações de selênio em alimentos consumidos no Brasil. **Rev Panam Salud Publica**, v. 11, n. 3, p. 172-177, 2002.
- FERRI, C. P. et al. Alzheimer's Disease International: Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. **Lancet**, v. 366, p. 2112-2117, 2005.
- FLOHÉ, L. et al. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. **FEBS Lett.**, v. 32, p. 132-134, 1973.
- FLORIAN, S. et al. Cellular and subcellular localization of gastrointestinal glutathione peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue. **Free Radic Res.**, v. 35, p. 655-663, 2001.
- FORSBERG, L. et al. 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.
- GAO, S. et al. Selenium Level and Cognitive Function in Rural Elderly Chinese. **Am J Epidemiol.**, v. 165, n.8, p. 955-965, 2007.
- GARCIA, T. et al. Oxidative stress status and RNA expression in hippocampus of an animal model of Alzheimer's disease after chronic exposure to aluminum. **Hippocampus**, v. 20, p. 218-225, 2009.
- GONZAGA, I. B. et al. Selênio. In: COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 2 ed. Barueri: Manole, 2005. p. 539-577.
- HAO, D. et al. Determination of serum selenium by hydride generation flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 43, p. 595-600, 1996.
- HATFIELD, D. L. et al. Selenium and selenocysteine: roles in cancer, health, and development. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 3, March, 2014.
- HERBETTE, S. et al. Seleno-independent glutathione peroxidases: More than simple antioxidant scavengers. **FEBS Journal**, v. 274, p. 2163-2180, 2007.
- HESKETH, J. Nutrigenomics and selenium: gene expression patterns, physiological targets, and genetics. **Annu Rev Nutr.**, v. 28, p.157-177, 2008.

HESKETH, J., MÉPLAN, C. Transcriptomics and functional genetic polymorphisms as biomarkers of micronutrient function: focus on selenium as an exemplar. **Proc Nutr Soc.**, v. 3, p. 1-9, 2011.

HOFFMANN, P. R. et al. The selenoproteome exhibits widely varying, tissue-specific dependence on selenoprotein P for selenium supply. **Nucleic Acids Res.** v. 35, p. 3963-3973, 2007.

HOLBEN, D.; SMITH, A. The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. **J Am Diet Assoc.**, v. 99, p. 836-843, 1999.

HONG, Y. L. et al. Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. **Clin. Biochem.**, v. 33, pp. 619-625, 2000.

HUGHES, T. F. et al. Should mild cognitive impairment be subtyped? **Current Opinion in Psychiatry**, v. 24, p. 237-242, 2011.

ISAACS, B.; KENNIE, A. T. The set test as an aid to the detection of dementia in old people. **Brit J Psych.** v. 123, p. 467-470, 1973.

JABLONSKA, E. et al. Association between GPx1 Pro198Leu polymorphism, GPx1 activity and plasma selenium concentration in humans. **Eur J Clin Nutr.**, v. 48, p. 383-6, 2009.

KADUSZKIEWICZ, H. et al. Prognosis of Mild Cognitive Impairment in General Practice: Results of the German AgeCoDe Study. **Ann Fam Med.**, p.158-165, 2014.

KAPLAN, E. F. et al. **The Boston Naming Test**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1983.

KARUNASINGHE, N. et al. Serum selenium and single-nucleotide polymorphisms in genes for selenoproteins: relationship to markers of oxidative stress in men from Auckland, New Zealand. **Genes Nutr.**, v. 7, p. 179-190, 2012.

KEENEY, J. T. R. et al. Cell Cycle Proteins in Brain in Mild Cognitive Impairment: Insights into Progression to Alzheimer Disease. **Neurotox Res**, 2011. [Epub ahead of print].

KESSE-GUYOT, E. et al. French adults' cognitive performance after daily supplementation with antioxidant vitamins and minerals at nutritional doses: a post hoc analysis of the Supplementation in Vitamins and Mineral Antioxidants (SU.VI.MAX) trial. **Am J Clin Nutr.**, v. 94, p. 892-899 2011.

KÖHRLE, J. et al. Selenium in Biology: Facts and Medical Perspectives. **Biol Chem.**, v. 381, p. 849-864, 2000.

LEI, X. G, et al. Metabolic Regulation and Function of Glutathione Peroxidase-1. **Annu Rev Nutr.**, v. 27, p. 41-61, 2007.

LESZEK, J. et al. Colostrinin®: a proline-rich polypeptide (PRP) complex isolated from ovine colostrum for treatment of Alzheimer's disease. A double-blind, placebo-controlled study. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 47, p. 377-384, 1999.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, December, p. 402-8, 2001.

LU, T. et al. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. **Nature**, v. 429, p. 883-891, 2004.

LUCK, T. et al. Incidence of mild cognitive impairment: a systematic review. **Dement Geriatr Cogn Disord**, v. 29, p. 164-175, 2010.

MANGIALASCHE, F. et al. Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Ageing Research Reviews**, v. 8, p. 285-305, 2009.

MARIANI, E. et al. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 827, p. 65-75, 2005.

McKHANN, G. et al. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of department of health and human services task force on Alzheimer's disease. **Neurology**, v. 34, p. 939-944, 1984.

MÉPLAN, C. et al. Advances in Selenoprotein Expression: Patterns and Individual Variations. In: BRIGÉLIUS-FLOHÉ R, JOOST HG. **Nutritional Genomics: Impact in Health and Disease**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 132-158, 2006.

MÉPLAN, C. et al. Relative Abundance of Selenoprotein P Isoforms in Human Plasma Depends on Genotype, Se Intake, and Cancer Status. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 11, 2009.

_____. et al. Genetic polymorphisms in the human selenoprotein P gene determine the response of selenoprotein markers to selenium supplementation in a gender - specific manner (the SELGEN study). **The FASEB Journal**, v. 21, n. 12, p. 3063-74, 2007.

MILLER, J. A. et al. A systems level analysis of transcriptional changes in Alzheimer's disease and normal aging. **J Neurosci**, v. 28, p. 1410-1420, 2008.

MITCHELL, A. J.; SHIRI-FESHKI, M. Rate of progression of mild cognitive impairment to dementia- meta-analysis of 41 robust inception cohort studies. **Acta Psychiatr Scand**, v. 119, n. 4, April, p. 252-65, 2009.

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

OLDFIELDS, J. E. Selenium World Atlas. **Selenium-Tellurium Development Association**, p. 7, 2002.

PACHECO, A. M.; SCUSSEL, V. M. Selenium and Aflatoxin Levels in Raw Brazil Nuts from the Amazon Basin. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 11087-92, 2007.

PADUDARIU, M. et al. Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 469, p. 6-10, 2010.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase **J. Lab. Clin. Med.**, v. 70, p. 158-169, 1967.

PAZ-Y-MIÑO, C. et al. Genetic Polymorphisms in Apolipoprotein E and Glutathione Peroxidase 1 Genes in the Ecuadorian Population Affected With Alzheimer Disease. **Am J Med Sci.**, v. 340, n. 5, p. 373-377, 2010.

PETERSEN C, et al. Mild cognitive impairment: a concept in evolution. **J Intern Med.**, p. 214-228, 2014.

PETERSEN, R. C. et al. Mild cognitive impairment: ten years later. **Arch Neurol.**, v. 66, n.12, p. 1447-55, 2009.

PETERSEN, R. C. et al. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. **Arch Neurol.**, v. 56, p. 303-308, 1999.

PIRES, L. V. **Efeito da suplementação com castanha do brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) na expressão gênica de citocinas inflamatórias e sua relação com o estresse oxidativo em pacientes com Diabetes *Mellitus* tipo 1**. Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP. 2012. 131 p.

PRATICÒ, D. Disease Brain and Antioxidant Therapy Lights and Shadows. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1147, p. 70-78, 2008.

PRIOR, R. L. et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3273-3279, 2003.

RAVN-HAREN, G. et al. 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.

RAYMAN, M. P. Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. **Br J Nutr.**, v. 100, n. 2, p. 1-15, 2008.

REISBERG, B. et al. Stage-specific behavioral, cognitive, and in vivo changes in community residing subjects with age-associated memory impairment and primary degenerative dementia of the Alzheimer type. **Drug Dev Res.**, v.15, n.2-3, p. 101-114, 1988.

ROCHA, A. V. et al. Selenium Status and Hair Mercury Levels in riverine children from Rondonia – Amazonia. **Nutrition**, 2014 (No prelo).

ROSEN, W. G. et al. A new rating scale for Alzheimer's disease. **Am J Psych.** v. 141, p. 23-24, 1984.

SAREWKO MM, POPA C, DAHLER AL et al. Alterations in gene expression and activity during squamous cell carcinoma development. **Cancer Res.**, v. 62, p. 3759-3765, 2002.

SCHELTENS, P. et al. Efficacy of a medical food in mild Alzheimer's disease: a randomized, controlled trial. **Alzheimers Dement**, v. 6, p. 1-10, 2010.

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

SCHUESSEL, K. et al. Impact of gender on upregulation of antioxidant defence mechanisms in Alzheimer's disease brain. **J Neural Transm.**, v. 111, p. 1167-1182, 2004.

SCHWARZ, K.; FOLTZ, C. Selenium as an integral part of factor 3 against necrotic dietary liver degeneration. **J Am Chem Soc.**, v. 79, p. 3292-3293, 1957.

SCHWEIZER, U. et al. Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. **Brain Research Reviews**, v. 45, p. 164-178, 2004.

SEKLER, A. et al. Cognitive impairment and Alzheimer's disease: links with oxidative stress and cholesterol metabolism. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v.4, p. 715-722, 2008.

SHINKAI, T. et al. Genetic association analysis of the glutathione peroxidase (GPX1) gene polymorphism (Pro197Leu) with tardive dyskinesia. **Psychiatry Res.**, v. 141, p. 123-128, 2006.

SMITH, M. A. et al. Increased Iron and Free Radical Generation in Preclinical Alzheimer Disease and Mild Cognitive Impairment. **J Alzheimers Dis.**, v. 19, n. 1, p. 363-372, 2010.

SMORGON, C. et al. Trace elements and cognitive impairment: an elderly cohort study. **Arch. Gerontol. Geriatr. Suppl.**, v. 9, p. 393-402, 2004.

STEINBRENNER, H.; SIES, H. Selenium homeostasis and antioxidant selenoproteins in brain: Implications for disorders in the central nervous system. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 536, p. 152-157, p. 2013.

STEINBRENNER, H. et al. Involvement of selenoprotein P in protection of human astrocytes from oxidative damage. **Free Radic. Biol. Med.** v. 40, p. 1513-1523, 2006.

STEPHAN, B. C. et al. Dementia risk prediction in the population: are screening models accurate? **Nat. Rev. Neurol.**, v. 6, n. 6, p. 318-26, 2010.

STEPHAN, B. C. M. et al. The neuropathological profile of mild cognitive impairment (MCI): a systematic review. **Molecular Psychiatry**, v. 17. n. 11, p. 1056-76. 2012.

STOCKLER-PINTO, M. B. et al. Effect of Brazil nut supplementation on the blood levels of selenium and glutathione peroxidase in hemodialysis patients. **Nutrition**, v. 26, p. 1065-1069, 2010.

TAKEMOTO, A. S. et al. Role of Selenoprotein P in Alzheimer's Disease. **Ethn Dis.**, v. 20, Suppl 1, p. 192-5, 2010.

TAPIERO, H. et al. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. **Biomed Pharmacoth.**, v. 57, p. 134-144, 2003.

THOMSON, C. D. Selenium and iodine intakes and status in New Zealand and Australia. **Br J Nutr.**, v. 91, p. 661-672, 2004.

_____. et al. Brazil nuts: an effective way to improve selenium status. **Am J Clin Nutr.**, v. 87, p. 379-84, 2008.

TORRES, L. L. et al. Peripheral Oxidative Stress Biomarkers in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease** v. 26, p. 59-68, 2011.

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

VURAL, H. et al. Alterations of plasma magnesium, copper, zinc, iron and selenium concentrations and some related erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with Alzheimer's disease. **J Trace Elem Med Biol.**, v. 24, n.3, p. 169-73, 2010.

WILLET, W. C. **Nutritional Epidemiology**. 2 ed. New York: Oxford University Press, 1998.

WINBLAD, B. et al. Mild cognitive impairment – beyond controversies, towards a consensus: report of the International Working Group on Mild Cognitive Impairment. **J Intern Med.** v. 256, n. 3, September, p. 240-6, 2004.

ZHANG, S. et al. Selenoproteins and the aging brain. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 131, p. 253-260, 2010.

ZHANG, Y. et al. Comparative analysis of selenocysteine machinery and selenoproteome gene expression in mouse brain identifies neurons as key functional sites of selenium in mammals. **J. Biol. Chem.** v. 283, p. 2427-2438, 2008.

ZHU, X. et al. Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: An update. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1772, p. 494-502, 2007.

ARTIGO 1: Efeitos do consumo de castanha-do-brasil no estado nutricional relativo ao selênio e desempenho cognitivo em idosos com comprometimento cognitivo leve: ensaio clínico piloto

Introdução

O comprometimento cognitivo leve (CCL) é usualmente definido como um declínio da cognição além do esperado para a idade, mas não preenche os critérios para diagnóstico de demência (PETERSEN et al., 1999; AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). A prevalência de CCL aumenta com o envelhecimento, e assim percebe-se um aumento na prevalência de 19% entre indivíduos com idade abaixo de 75 anos para 29% entre aqueles com idade superior a 85 anos (LOPEZ et al., 2003). Embora o CCL não esteja relacionado com comprometimento da independência para a realização das atividades da vida diária, está associado com aumento do risco para demência, em particular a Doença de Alzheimer. Em meta-análise que incluiu 13 estudos clínicos envolvendo um total de 4301 indivíduos, a taxa de conversão anual de CCL para demência foi de 9,6% e, durante todo o período de acompanhamento, 39,2% converteram para demência (MITCHELL; SHIRI-FESHKI, 2009). Desse modo, idosos com CCL são alvo em potencial para estudos experimentais que objetivam reduzir o risco ou postergar o desenvolvimento de demência.

A literatura é consistente em mostrar o envolvimento do estresse oxidativo nas doenças neurodegenerativas (ZHU; LEE, 2007; MARIANI; POLIDORI, 2005; GREENOUGH et al., 2013). O cérebro é particularmente vulnerável aos danos causados pelos radicais livres porque apresenta alta taxa de consumo de oxigênio e grande concentração de ácidos graxos polinsaturados que servem de substrato para peroxidação (CUI et al., 2004; CHAUHAN e CHAUHAN, 2006). Dentre as estratégias do sistema antioxidante, que neutraliza os radicais livres, encontram-se as selenoproteínas, dentre as quais a glutathiona peroxidase (GPx), reconhecida pela capacidade de neutralizar hidroperóxidos.

A biossíntese de selenoproteínas depende da disponibilidade de selênio e, assim, o consumo desse mineral em quantidade adequada é particularmente importante para a manutenção das funções cerebrais (STEINBRENNER; SIES, 2013). A quantidade de selênio nos alimentos é altamente variável, e deficiência subclínica é comum em alguns subgrupos, como os

idosos (CARDOSO et al., 2010). A castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) é a fonte alimentar mais rica nesse mineral e seu consumo se apresenta como uma maneira eficiente para melhorar o estado nutricional dos indivíduos (THOMSON et al., 2008; COMINETTI et al., 2012).

Alguns estudos reportam que o estado nutricional dos indivíduos quanto ao selênio está associado com a função cognitiva (BERR et al., 2000; GAO et al., 2007; CARDOSO et al., 2010), entretanto apenas poucos trabalhos investigaram se a suplementação com selênio pode gerar efeitos positivos sobre a cognição e a maioria deles realiza suplementação conjunta do selênio com outros compostos (LESZEK et al., 1999; SCHELTENS et al., 2010; KESSE-GUYOT et al., 2011). Ademais, nenhum dos trabalhos presentes na literatura avaliou o consumo de alimentos-fonte de selênio em relação à função cognitiva. Assim, este trabalho objetiva investigar se o consumo de castanha-do-brasil gera benefícios sobre a função cognitiva. Hipotetizou-se que o consumo diário desta noz beneficiaria o *status* de selênio, aumentaria a capacidade antioxidante e melhoraria a cognição de idosos com CCL.

Métodos

Participantes

Foram incluídos pacientes com CCL frequentadores do Ambulatório de Memória do Idoso (AMI) do Serviço de Geriatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todos os participantes preencheram os critérios propostos pelo *Working Group on Mild Cognitive Impairment* (WINBLAD et al., 2004), que incluem: a) alteração cognitiva, porém sem demência; b) evidência de perda cognitiva verificada por entrevista subjetiva e por avaliação objetiva; c) preservação das atividades da vida diária.

O diagnóstico de CCL foi baseado em avaliação neuropsicológica que inclui a bateria de testes propostos pelo *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease* (CERAD) e alguns testes adicionais para avaliação da atenção, da memória, da linguagem, das habilidades visuoespaciais e executivas. Perda cognitiva em determinado domínio foi considerada quando a pontuação era $\geq 1,5$ desvios padrões abaixo dos valores médios e normalizados para a idade e a escolaridade ou ≥ 1 desvio padrão em pelo menos dois testes. Além disso, realizou-se a entrevista do *Clinical Dementia Rating* (CDR) com um informante, e todos os participantes incluídos no estudo apresentavam CDR de 0,5 (MORRIS, 1993).

O recrutamento de participantes ocorreu entre maio de 2011 e agosto de 2012. Indivíduos elegíveis apresentavam idade igual ou superior a 60 anos, eram fluentes em Português e livres de qualquer outra doença neurológica ou psiquiátrica. Nenhum dos participantes apresentava depressão maior ou psicose, consumia castanha-do-brasil regularmente, usava suplementos com selênio ou tinha alergia a oleaginosas.

No momento da entrevista, todos os participantes da pesquisa foram esclarecidos sobre os procedimentos aos quais seriam submetidos e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O protocolo da pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e registrado no ClinicalTrials.gov com o número NCT02121457.

Protocolo

Após a avaliação clínica e cognitiva inicial, os participantes foram aleatoriamente distribuídos entre os grupos Castanha e Controle. Para isso, realizou-se randomização simples, preparada com alocação 1:1 em envelopes opacos e lacrados, enumerados sequencialmente. No momento da primeira coleta de sangue, cada participante abria um envelope contendo a palavra “castanha” ou “controle”, e assim passava a constituir o respectivo grupo.

Os participantes do grupo Castanha foram instruídos para consumir uma castanha-do-brasil diariamente durante seis meses. As castanhas eram fornecidas a cada dois meses juntamente com orientações por escrito e um calendário para monitorar a adesão ao tratamento. A adesão, considerada satisfatória com o consumo mínimo de 85%, foi avaliada a cada dois meses pela verificação do calendário e pela contagem de castanhas que eram retornadas. Todos os participantes foram instruídos a manter a dieta usual e a evitar o consumo de outras castanhas-do-brasil durante o período do estudo.

Avaliação da composição química das castanhas

Uma análise laboratorial em triplicata, de acordo com a AOAC (1990), foi realizada em amostra aleatória de castanhas antes do início da intervenção, uma vez que a concentração de selênio nessas oleaginosas pode variar consideravelmente. Para tanto, as castanhas foram trituradas e liofilizadas, e a determinação de umidade foi realizada pela diferença de peso antes e

depois da liofilização, enquanto que as cinzas foram analisadas pela perda de peso após aquecimento a 550°C. Proteínas totais foram determinadas pelo método de micro-Kjeldahl, enquanto que o teor lipídico foi avaliado pelo método de Soxhlet. O valor de carboidrato foi obtido pela diferença entre o teor lipídico e proteico da massa seca total.

A concentração de selênio foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica por geração de hidretos acoplados a cela de quartzo (HGQTAAS) (HAO, 1996). *Wheat Flour Standard Reference Material* (National Institute of Standards & Technology – Gaithersburg, MD, USA) foi utilizado como material de referência.

Coleta de sangue

Os participantes foram submetidos a uma coleta de sangue no início do estudo e após seis meses. Uma amostra de 20 mL de sangue foi coletada de todos os participantes pela manhã, após 12 horas de jejum. Foram utilizadas seringas plásticas descartáveis e agulhas de aço inoxidável, estéreis e descartáveis. O sangue foi colocado em tubos com EDTA para coleta a vácuo e mantido sob baixa temperatura com auxílio de gelo para ser transportado. O plasma foi separado do sangue total por centrifugação a 3.000 x g durante 15 minutos a 4°C. A massa eritrocitária que foi obtida do sangue total, também por centrifugação, foi lavada três vezes com 5 mL de solução salina a 0,9%, homogeneizada lentamente por inversão e centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos (SORVALL[®] RC5C) a 4°C, sendo o sobrenadante descartado. Tanto o plasma como a massa eritrocitária foram acondicionados a -80°C em microtubos previamente desmineralizados. Alíquotas de soro também foram acondicionadas a -80°C para posterior determinação do perfil lipídico.

Determinação do perfil lipídico

Kits comerciais da marca Labtest (Minas Gerais, Brasil) foram utilizados para determinar triglicerídeos (Cat. No. 87), colesterol total (Cat. No. 76), lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) (Cat. No. 111) e lipoproteína de alta densidade (HDL-c) (Cat. No. 98). A fração de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-c) foi calculada conforme a equação de Friedewald (1972): $VLDL-c = \text{triglicerídeos}/5$.

Avaliação do estado nutricional relativo ao selênio

A concentração de selênio foi determinada em amostras duplicadas de plasma e de eritrócito por HGQTAAS (HAO, 1996). Para controle do método de análise de selênio, foi adotado como padrão de referência o material certificado SERONORM® (Sero AS, Billingstad, Norway), cujo conteúdo foi preparado conforme as instruções do fabricante e processado da mesma maneira como as demais amostras. Em todas as análises, aceitou-se uma recuperação mínima de 85% do valor de referência para esse material.

Avaliação da atividade da GPx eritrocitária

A atividade da GPx foi avaliada em lisado de eritrócito conforme o método de Paglia e Valentine (1967) com a utilização de *kit* comercial (Ransel 505 – RANDOX Laboratories, Crumlin, UK) adaptado para utilização em analisador bioquímico (Liasys® MAS, Rome, Italy). O resultado foi expresso em unidades por grama de hemoglobina (U/gHb) level.

Determinação do ORAC

O ensaio do ORAC avalia a inibição do radical peroxil, mostrando resistência aos danos oxidativos. A oxidação da fluoresceína é medida após ser misturada com AAPH. Para evitar interferências de proteínas no ensaio, o plasma foi previamente desproteínizado com ácido perclórico. O resultado foi expresso em μmol equivalentes de trolox/mL plasma ($\mu\text{mol TE/mL}$) (PRIOR et al., 2003).

Determinação do MDA

A concentração de MDA, um produto genotóxico naturalmente gerado pela peroxidação lipídica, foi avaliada por HPLC, de acordo com o método de Hong et al. (2000). Essa análise foi conduzida em HPLC da marca Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com coluna Phenomenex Reverse-phase C18 de 150 mm x 4,6 mm com partículas de 5 μm (Phenomenex, Torrance, CA). Preparou-se uma curva padrão com concentrações conhecidas de MDA.

Avaliação da função cognitiva

As funções cognitivas foram avaliadas no início do estudo e após seis meses por profissionais treinados e que eram cegos quanto à composição dos grupos de estudo. Seis subtestes da bateria CERAD foram utilizados para examinar habilidades cognitivas fundamentais. O teste de fluência verbal solicita que o entrevistado fale quantos nomes de animais for possível em 60 segundos. O subteste de nomeação de Boston é uma tarefa de confrontação visual no qual os participantes devem nomear, espontaneamente, 15 desenhos. No subteste de aprendizado da lista de palavras, os indivíduos são apresentados, por meio de leitura em voz alta, a uma lista com dez palavras não relacionadas. O procedimento é repetido mais duas vezes e o escore é obtido pela soma das palavras recordadas em três tentativas. O teste de praxia construtiva apresenta quatro desenhos (círculo, diamante, retângulos sobrepostos e cubo), um por um, com um tempo máximo de dois minutos para realização de cópia de cada item. A evocação livre de palavras é solicitada imediatamente após o teste de praxia. Finalmente, o reconhecimento é testado para as dez palavras originais que são misturadas com dez novas palavras.

O escore CERAD total, descrito por Chandler et al. (2005), foi calculado para fornecer um resumo da função cognitiva global, variando de 0 a 100, com maiores escores indicando melhor desempenho. Mudanças no escore CERAD total foram definidas como resultado primário e as mudanças em cada um dos subtestes foram avaliadas como resultados secundários.

Análise estatística

Realizou-se análise descritiva das variáveis do *baseline* e do pós-tratamento. Todos os dados foram expostos como média \pm desvio padrão (dp), e as mudanças médias do *baseline* e pós-tratamento foram descritas como média e 95% de intervalo de confiança.

Características do *baseline* foram comparadas entre os grupos com teste t para amostras independentes quando os dados eram contínuos. Dados categóricos foram comparados usando-se teste de Fisher. As diferenças de dados entre os grupos ao longo do tempo também foram analisadas por teste t independente ou por Mann-Whitney quando apropriado. A correlação de

Pearson ou Spearman foi calculada de acordo com a presença ou ausência de distribuição normal das variáveis.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS para *Windows*, versão 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Todos os testes foram fixados com valores de confiança em 95% ($p < 0,05$), sendo considerados significativos.

Resultados

No total, 31 idosos com CCL foram incluídos neste estudo, dentre os quais 20 completaram o ensaio clínico. As razões para não completar o estudo foram: mudança de endereço, o que impediu o contato do pesquisador para a segunda fase (6 participantes); adesão insuficiente ao tratamento (3 participantes); infarto durante o estudo (1 participante); e consumo de polivitamínico que continha selênio (1 participante). Assim, o grupo Castanha foi composto por 11 indivíduos e o grupo Controle por 9 participantes.

A idade média dos participantes foi $78,0 \pm 5,3$ anos, e os grupos não diferiram em relação à idade, escolaridade e gênero. O perfil lipídico, avaliado no *baseline*, também não foi distinto entre os grupos (Tabela 1).

Tabela 1: Características dos participantes no início do estudo

Parâmetro	Todos	Grupo Castanha	Grupo Controle	Valor de P para comparação entre os grupos
Idade (anos), média±dp ^a	77,7±5,3	77,7±4,3	77,6±6,6	0,945
Escolaridade (anos), média±dp ^a	5,4±4,3	5,5±4,0	5,4±4,9	0,996
Gênero, % masculino ^b	30,0	27,3	33,3	1,000
Colesterol total (mg/dL), média±dp ^a	209,5±37,7	213,3±42,9	204,7±32,3	0,636
HDL-c (mg/dL), média±dp ^a	54,8±9,4	57,6±9,3	51,2±8,9	0,161
LDL-c (mg/dL), média±dp ^a	104,8±29,1	105,1±32,8	104,4±26,1	0,959
VLDL-c (mg/dL), média±dp ^a	23,6±10,0	23,26±8,18	24,4±12,4	0,830
Triglicerídeos (mg/dL), média±dp ^a	118,8±49,8	116,3±40,9	121,9±62,0	0,830

^a: Teste t

^b: Teste exato de Fisher

dp: desvio padrão

HDL-c: lipoproteína de alta densidade

LDL-c: lipoproteína de baixa densidade

VLDL-c: lipoproteína de muito baixa densidade

Dados relacionados à composição centesimal e à concentração de selênio da castanha-do-brasil utilizados neste estudo estão apresentados na Tabela 2. O peso médio de cada castanha é de 5 g e, assim, cada unidade forneceu em torno de 288,75 μg de selênio.

Tabela 2: Composição centesimal e concentração de selênio das castanhas-do-brasil utilizadas no estudo

Nutriente	Média \pm dp
Energia (kcal)	714,79 \pm 31,56
Carboidratos (g)	10,89 \pm 5,54
Proteínas (g)	16,27 \pm 0,07
Lipídios (g)	67,35 \pm 5,88
Umidade (%)	2,42 \pm 0,05
Cinzas (%)	3,07 \pm 1,07
Selênio ($\mu\text{g/g}$)	57,75 \pm 5,96

dp: desvio padrão

Mudanças nas concentrações de selênio no plasma e no eritrócito ao longo do tratamento foram significativamente positivas no grupo Castanha. No início do estudo, apenas um participante apresentou níveis plasmáticos adequados, conforme a referência mais aceita ($> 84\text{-}100 \mu\text{g/L}$) (THOMSON, 2004); e após os seis meses nenhum indivíduo do grupo tratado apresentou deficiência do mineral, enquanto no grupo controle todos os participantes apresentaram níveis inferiores ao desejado. Dentre os parâmetros relacionados ao sistema antioxidante, observou-se que apenas a mudança na atividade da GPx foi diferente entre os grupos. Houve correlação significativa entre o selênio eritrocitário e a atividade eritrocitária da GPx no início do estudo ($r = 0,59$; $p = 0,006$), porém, após o tratamento, o grupo Castanha não manteve correlação significativa ($r = -0,32$; $p = 0,355$), enquanto entre os indivíduos do grupo Controle a correlação permaneceu positiva ($r = 0,77$; $p = 0,015$) (Tabela 3).

Tabela 3: Selênio plasmático e eritrocitário, atividade de GPx, ORAC e MDA dos grupos Castanha e Controle, no início do estudo e após seis meses

Parâmetro	Grupo Castanha			Grupo Controle			Valor de P para comparação entre os grupos
	Início \pm dp	6 meses \pm dp	Mudança (95% IC)	Início \pm dp	6 meses \pm dp	Mudança (95% IC)	

Selênio plasma ^a (µg/L)	56,2 ±18,3	290,6 ±74,6	234,3 (190,8; 277,9)	50,0 ±15,5	47,8 ±11,7	-2,2 (-12,8; 8,3)	0,000
Selênio eritrócito ^a (µg/L)	59,5 ±20,6	574,6 ±181,4	515,00 (401,02; 629,0)	50,8 ±21,0	33,5 ±16,1	-17,3 (-27,4; -7,2)	0,000
Atividade de GPx ^b (U/g Hb)	40,73 ±15,20	59,55 ±20,79	18,80 (0,955; 36,68)	44,01 ±17,24	42,54 ±13,05	-1,46 (-12,84; 9,91)	0,006
ORAC ^a (µmol TE/mL)	0,95 ±0,45	1,09 ±0,26	0,15 (-0,21; 0,51)	0,92 ±0,39	1,06 ±0,14	0,14 (-0,15; 0,43)	0,967
MDA ^a (µmol/L)	0,42 ±0,05	0,52 ±0,12	0,10 (0,00; 0,19)	0,50 ±0,06	0,51 ±0,20	0,01 (-0,19; 0,21)	0,343

^a : Teste t

^b : Teste de Mann-Whitney U

dp: desvio padrão

GPx: glutathione peroxidase

MDA: malondialdeído

ORAC: *oxygen radical absorbance capacity*

O desempenho nos testes cognitivos não foi diferente entre os grupos no início do estudo. Mudanças no escore total CERAD, definido como o primeiro resultado para o desempenho cognitivo, não foram distintas entre os grupos. Entretanto, as mudanças observadas na fluência verbal e na praxia construtiva ao longo do acompanhamento foram mais favoráveis no grupo Castanha quando comparadas ao grupo Controle (Tabela 4).

Tabela 4: Avaliação cognitiva dos grupos Castanha e Controle, no início do estudo e após seis meses

Parâmetro	Grupo Castanha			Grupo Controle			Valor de P para comparação entre os grupos
	Início ±dp	6 meses ±dp	Mudança (95% IC)	Início ±dp	6 meses ±dp	Mudança (95% IC)	
Escore total CERAD ^a	59,2±8,1	60,3±10,3	1,1 (-4,0; 6,2)	66,71±8,2	63,57±8,0	-3,1 (-5,9; -0,3)	0,138
Fluência verbal ^a	12,8±3,3	14,1±3,9	1,3 (0,6 - 2,6)	16,29±3,7	14,14±3,9	-2,1 (-4,3; 0,2)	0,007
Nomeação de Boston ^a	11,7±2,3	11,9±1,2	0,2 (-1,5; 1,5)	11,2±2,5	11,9±1,7	0,7 (-0,3; 1,7)	0,511
Praxia construtiva ^a	7,7±2,3	9,2±2,2	1,5 (0,0; 3,1)	8,7±2,6	8,3±2,4	-0,4 (-1,6; 0,7)	0,031
Aprendizado da lista de palavras ^a	15,3±3,5	14,2±4,4	-1,1 (-4,6; 2,4)	15,4±3,2	14,9±3,8	-0,6 (-3,8; 2,6)	0,792

Evocação livre da lista de palavras ^a	3,7±2,2	3,6±2,1	-0,1 (-1,2; 1,0)	5,4±1,6	5,1±1,3	-0,3 (-1,7; 1,1)	0,818
---	---------	---------	---------------------	---------	---------	---------------------	-------

^a : Teste t

dp: desvio padrão

CERAD: *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*

Conforme apresentado na Tabela 5, mudanças no escore total CERAD foram correlacionadas com os parâmetros de selênio, porém não se correlacionaram com as mudanças nos parâmetros de estresse oxidativo.

Tabela 5: Análises de correlação entre mudanças no escore total CERAD e mudanças nos parâmetros de selênio, de atividade da GPx, de ORAC e de MDA

	Correlações (r)				
	Selênio eritrócito ^a	Selênio plasma ^a	Atividade da GPx ^b	ORAC ^a	MDA ^a
Escore total CERAD ^a	0,55*	0,51*	0,29	0,10	0,50
Selênio eritrócito ^a		0,97**	0,51*	0,07	0,21
Selênio plasma ^a			0,44	0,83	0,28
Atividade da GPx				0,16	0,43
ORAC ^a					-0,37

^a : Pearson

^b : Spearman

*: p<0,05, **: p<0,001

CERAD: *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*

GPx: glutathione peroxidase

ORAC: *oxygen radical absorbance capacity*

Discussão

Os idosos são mais vulneráveis à deficiência de selênio, pois: têm as necessidades nutricionais aumentadas; tendem a fazer alterações na dieta; e apresentam alterações metabólicas decorrentes do envelhecimento e que reduzem a biodisponibilidade de nutrientes (PLANAS et al., 2004; ARNAUD et al., 2007; LETSIUO et al., 2009). Como resultado, esse grupo é mais suscetível aos danos resultantes do estresse oxidativo no sistema nervoso central, uma vez que os radicais livres estão relacionados à neuroinflamação, a alterações da função mitocondrial, da transmissão sináptica e do transporte axonal, que por consequência contribuem para a morte neuronal em um processo conhecido na Doença de Alzheimer e em outras doenças

neurodegenerativas (DE LA MONTE et al., 2006; SWERDLOW et al., 2013). Alguns estudos correlacionam o estado nutricional dos indivíduos quanto ao selênio e o desempenho cognitivo, sugerindo que a deficiência desse mineral pode se apresentar como um risco para demências (CEBALLOS-PICOT et al., 1996; BERR et al., 2000; GAO et al., 2007). Estudos *in vitro* mostram que o selênio influencia de maneira positiva o metabolismo de neurotransmissores (KNORPP et al., 2006; CASTAÑO et al., 1997), embora pareça que o papel mais importante desse mineral no cérebro se relacione a sua capacidade antioxidante. As selenoproteínas encontradas mais abundantemente no sistema nervoso central são a SePP e a GPx. A primeira foi identificada em placas senis e em emaranhados neurofibrilares, ambos marcadores da Doença de Alzheimer, gerando indícios de que apresenta importante papel ao proteger neurônios do estresse oxidativo (BELLINGER et al., 2008; TAKEMOTO et al., 2010). Já a GPx, que neutraliza peróxidos, é amplamente expressa por neurônios e, principalmente, por células da glia (GARCIA et al., 2009; ZHANG et al., 2010).

Neste estudo, o consumo diário de uma castanha-do-brasil durante seis meses foi suficiente para recuperar a deficiência de selênio, confirmando outros trabalhos (STOCKLER-PINTO et al., 2010; COMINETTI et al., 2012). Apenas uma unidade dessa principal fonte alimentar de selênio contribuiu com 288,75 µg de selênio ao dia, aumentando o consumo de selênio para além da recomendação (55µg/dia), porém sem exceder o nível de consumo máximo tolerável (400 µg/d) (IOM, 2000). O selênio da castanha-do-brasil encontra-se nas formas de selenometionina e selenocisteína, e estudos mostram que a concentração de selenometionina varia de 75 a 90% (BODÓ et al., 2003; DA SILVA et al., 2013). Apesar da alta concentração de selênio na castanha, nenhum participante referiu sintomas associados à selenose, que incluem fragilidade e perda de unhas e de cabelos, alterações gastrintestinais, erupções cutâneas, odor de alho na respiração, fadiga, irritabilidade e anormalidades do sistema nervoso central, corroborando as observações de Lemire et al. (2012). Tal fato ocorre porque a selenometionina, apesar de apresentar alta biodisponibilidade, pode tanto ser reduzida a selenito de hidrogênio para a síntese de selenoproteínas, como também substituir a metionina inespecificamente em proteínas séricas, e assim não causa intoxicação (IOM, 2000; NAVARRO-ALARCOM; CABRERA-VIQUE, 2008).

Embora em análise primária as mudanças no desempenho cognitivo avaliado pelo score total CERAD não foram significativamente diferentes entre os dois grupos ($p=0,138$), a praxia

construtiva e a fluência verbal apresentaram melhora significativa ($p=0,031$ e $p=0,007$, respectivamente) entre os participantes do grupo Castanha. O subteste de fluência verbal avalia uma variedade de funções cognitivas, incluindo velocidade de processamento, linguagem e funções executivas. Tarefas cronometradas, que colocam demandas simultâneas em várias funções cognitivas são consideradas particularmente sensíveis a mudanças sutis no desempenho cognitivo, especialmente aquelas mediadas por sistemas frontais-subcorticais (DODGE et al., 2011). De maneira interessante, testes que avaliam a fluência verbal foram úteis para a identificação de demência pré-clínica em alguns estudos (COOPER et al., 2004; HODGES et al., 2006).

O estresse oxidativo está envolvido no declínio cognitivo, e alguns estudos mostram que pacientes com CCL ou Doença de Alzheimer apresentam maiores níveis de estresse oxidativo (RINALDI, 2003; CARDOSO, 2010). Assim, este estudo hipotetizou que o consumo de castanha-do-brasil poderia melhorar a resposta antioxidante e assim atenuar o declínio cognitivo, visto que a castanha é fonte não somente de selênio, mas também de compostos fenólicos que lhe conferem alta capacidade antioxidante por inibir peroxidação lipídica e neutralizar o radical DPPH (PIRES et al., 2010).

A maioria dos participantes de ambos os grupos apresentaram atividade de GPx adequada no início do estudo, conforme o valor de referência estabelecido pelo *kit* (27.5-73.6 U/gHb). Entretanto, no grupo Castanha, a atividade dessa enzima aumentou significativamente após os seis meses de tratamento, confirmando outros estudos (STOCKLER-PINTO et al., 2010; COMINETTI et al., 2012), embora a capacidade antioxidante total, avaliada pelo ORAC, não tenha sido afetada. A avaliação apropriada de mudanças da resposta antioxidante diante de intervenções alimentares necessita de parâmetros variados, pois diferentes antioxidantes podem interagir e gerar diferentes respostas (PRIOR; CAO, 1999; SERAFINI et al., 2003). Alguns estudos mostram que alimentos ricos em antioxidantes são capazes de aumentar a capacidade antioxidante total imediatamente após o consumo, mas intervenções por períodos prolongados mostram resultados inconsistentes. McKay et al. (2010) observaram que o consumo de nozes não mudou significativamente a capacidade antioxidante do plasma, e Haddad et al. (2014) observaram que uma refeição com 90 g de nozes resultou em aumento de ORAC e redução de MDA após 5 horas, entretanto, após 24 horas não foram observadas diferenças em relação ao *baseline*. Esses dados sugerem que os benefícios antioxidantes do consumo de castanhas podem

apresentar efeito fugaz. Serafini e Del Rio (2004) também apontaram que os componentes da dieta podem interagir de modo a refletir diferentes respostas à intervenção alimentar no que diz respeito à modulação da resposta antioxidante. Nesse sentido, estudos mostram que a dieta mediterrânea (KOLOMVOTSOU et al., 2013) e a inclusão de frutas e verduras na dieta (ROOT et al., 2012) contribuem para o aumento da resposta antioxidante, enfatizando a importância da inclusão de castanha-do-brasil em uma dieta saudável. Também é importante mencionar que o sistema antioxidante trabalha de acordo com os níveis de radicais livres presentes; ou seja, em um ambiente com baixa concentração de radicais livres, os antioxidantes podem ser protetores mesmo com baixo consumo, e em caso de aumento no consumo, o resultado pode não ser elevado (SERAFINI; DEL RIO, 2004). Nesse sentido, pode-se hipotetizar que o aumento da atividade da GPx não afetou a capacidade antioxidante total mensurada pelo ORAC, reforçando a ideia de que esse parâmetro reflete a interação entre diversos componentes em um sistema dinâmico.

Alguns estudos sugerem que a peroxidação lipídica está aumentada em pacientes com CCL e Doença de Alzheimer (BALDEIRAS et al., 2008; PADURARIU et al., 2010; TORRES et al., 2011). Esse parâmetro está intimamente associado ao estresse oxidativo, e pode ser associado à progressão do declínio cognitivo. Esperava-se que o aumento da atividade da GPx reduzisse a produção de H_2O_2 , que por sua vez diminuiria o estímulo para peroxidação lipídica e para oxidação proteica, conforme sugerido por Padurariu et al. (2010). Entretanto, destaca-se que a castanha-do-brasil tem alto teor de lipídios, especialmente ácidos graxos polinsaturados como o ácido linoleico (RYAN et al., 2004). Esses ácidos graxos são muito vulneráveis à peroxidação (ESTERBAUER et al., 1990; LU et al., 2002), porém questiona-se se o teor lipídico de apenas uma unidade de castanha-do-brasil seria suficiente para aumentar os níveis de MDA, e se esse aumento seria tempo-dependente.

Os biomarcadores avaliados em nosso estudo estão dentre os mais utilizados para avaliar estresse oxidativo, mas eles podem não ser considerados indicadores fidedignos do estado redox principalmente porque através deles não é possível conhecer os alvos exatos onde os antioxidantes desempenham seus papéis (NAEINI et al., 2013); como exemplo, reconhece-se o MDA como marcador de peroxidação lipídica, porém este é apenas um dos vários compostos aldeídos produzidos pela peroxidação de lipídios (CHARNIOT et al., 2011).

Este trabalho apresenta algumas limitações, como o número pequeno de participantes e o fato de que não se utilizou placebo. Devido ao número reduzido de participantes, o estudo apresentou um desenho exploratório, e análise *per protocol*. Porém, deve-se salientar que o protocolo foi bem controlado. Nesse sentido, a avaliação neuropsicológica foi realizada por profissionais cegos quanto aos grupos e, a fim de minimizar o viés, todas as avaliações bioquímicas foram conduzidas com amostras dos dois grupos ao mesmo tempo. Assim, embora os resultados deste trabalho sugiram que o consumo de castanha-do-brasil pode trazer benefícios à cognição, outros estudos, com mais participantes, podem consolidar esses dados. Além disso, estudos com animais são necessários para explorar os mecanismos associados ao papel do selênio na cognição, uma vez que os dados aqui apresentados sugerem que a redução do estresse oxidativo pode não ser a única via relacionada.

Conclusões

Os dados deste trabalho sugerem que o consumo de uma castanha-do-brasil por dia pode recuperar a deficiência de selênio. Observaram-se indícios de que o consumo desta castanha por idosos com CCL pode ter efeitos positivos sobre as funções cognitivas, particularmente na fluência verbal e na praxia construtiva.

Referências

- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association, 2013.
- AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15. ed. Washington: AOAC, 1990.
- ARNAUD, J. et al. Factors associated with longitudinal plasma selenium decline in the elderly: The EVA Study. **J Nutr Biochem.**, v. 18, p. 482-487, 2007.
- BALDEIRAS, I. et al. Peripheral oxidative damage in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease, **J. Alzheimer's Dis.**, v. 15, p. 117-128, 2008.
- 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.
- BELLINGER, F. P. et al. Association of Selenoprotein P with Alzheimer's Pathology in Human Cortex. **J Alzheimers Dis.**, v. 15, n. 3, p. 465-472, 2008.
- BERTOLUCCI, P. H. F. et al. Applicability of the CERAD neuropsychological battery to brazilian elderly. **Arq Neuropsiquiatr.**, v. 59, n. 3-A, p. 532-536, 2001.
- BODÓ, E. T. et al. Preparation, homogeneity and stability studies of a candidate LRM for Se speciation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 377, n. 1, p. 32-38. 2003.
- CARDOSO, B. R. et al. Glutathione peroxidase 1 Pro198Leu polymorphism in Brazilian Alzheimer's disease patients: relations to the enzyme activity and to selenium status. **J Nutrigenet Nutrigenomics**. v. 5, n. 2, p. 72-80, 2012.
- CARDOSO, B. R. et al. Nutritional status of selenium in Alzheimer's disease patients. **British Journal of Nutrition**, v. 103, p. 803-806, 2010.
- CASTAÑO, A. et al. Low selenium diet increases the dopamine turnover in prefrontal cortex of the rat. **Neurochem Int.**, v. 30, p. 549-55, 1997.
- CEBALLOS-PICOT, I. et al. Peripheral antioxidant enzyme activities and selenium in elderly subjects and in dementia of Alzheimer's type-place of the extracellular glutathione peroxidase. **Free Radic. Bio. Med.**, v. 20, p. 579-587, 1996.
- CHANDLER, M. J. A total score for the CERAD neuropsychological battery. **Neurology**, v. 65, n. 1, p. 102-6, 2005.

CHARNIOT, J. C. et al. Manganese superoxide dismutase dimorphism relationship with severity and prognosis in cardiogenic shock due to dilated cardiomyopathy. **Free Radical Research**, v. 45, n. 4, April, p. 379-388, 2011.

CHAUHAN, V.; CHAUHAN, A. Oxidative stress in alzheimer's disease. **Pathophysiology**, v.13, p.195-208, 2006.

COMINETTI, C. et al. Brazilian nut consumption improves selenium status and glutathione peroxidase activity and reduces atherogenic risk in obese women. **Nutrition Research**, v. 32, p. 403-407, 2012.

COOPER, D. B. et al. Category fluency in mild cognitive impairment: reduced effect of practice in test-retest conditions. **Alzheimer Dis Assoc Disord.**, v. 18, p. 120-122, 2004.

CUI, K. et al. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.**, v. 28, p. 771-799, 2004.

DA SILVA, E. G. et al. Speciation analysis of selenium in plankton, Brazil nut and human urine samples by HPLC–ICP-MS. **Talanta**, v. 110, p. 53-57, 2013.

DE LA MONTE, S. M. et al. Therapeutic rescue of neurodegeneration in experimental type 3 diabetes: relevance to Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis.**, v. 10, p. 89-109, 2006.

DODGE, H. H. et al. Terminal decline and practice effects in older adults without dementia: the MoVIES project. **Neurology**, v. 77, n. 8, p. 722-30, 2011.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 407-13, 1990.

FRIEDEWALD, W. T. et al. 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.

GAO, S. et al. Selenium Level and Cognitive Function in Rural Elderly Chinese. **Am J Epidemiol.**, v. 165, n.8, p. 955-965, 2007.

GARCIA, T. et al. Oxidative stress status and RNA expression in hippocampus of an animal model of Alzheimer's disease after chronic exposure to aluminum. **Hippocampus**, v. 20, p. 218-225, 2009.

GREENOUGH, M. A. et al. Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease. **Neurochem Int.**, v. 62, n. 5. p. 540-555, 2013.

HADDAD, E. H. et al. Effect of a walnut meal on postprandial oxidative stress and antioxidants in healthy individuals. **Nutrition Journal**, v. 13, n. 4, p. 1-9, 2014.

HAO, D. et al. Determination of serum selenium by hydride generation flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 43, p. 595-600, 1996.

HODGES, J. R. et al. Evolution of cognitive deficits and conversion to dementia in patients with mild cognitive impairment: a very-long-term follow-up study. **Dement Geriatr Cogn Disord.**, v. 21, p. 380-391, 2006.

HONG, Y. L. et al. Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. **Clin. Biochem.**, v. 33, pp. 619-625, 2000.

IOM – Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Washington, DC: The National Academy Press, 2002.

KESSE-GUYOT, E. et al. French adults' cognitive performance after daily supplementation with antioxidant vitamins and minerals at nutritional doses: a post hoc analysis of the Supplementation in Vitamins and Mineral Antioxidants (SU.VI.MAX) trial. **Am J Clin Nutr.**, v. 94, p. 892-899 2011.

KNORPP, T. et al. Glutathione peroxidase-1 contributes to the protection of glutamine synthetase in astrocytes during oxidative stress. **J Neural Transm.**, v. 113, p. 1145-1155, 2006.

KOLOMVOTSOU, A. I. et al. Adherence to Mediterranean diet and close dietetic supervision increase total dietary antioxidant intake and plasma antioxidant capacity in subjects with abdominal obesity. **Eur J Nutr.**, v. 52, p. 37-48, 2013.

LEMIRE, M. et al. No evidence of selenosis from a selenium-rich diet in the Brazilian Amazon. **Environment International**, v. 40, p. 28-136, 2012.

LESZEK, J. et al. Colostrinin®: a proline-rich polypeptide (PRP) complex isolated from ovine colostrum for treatment of Alzheimer's disease. A double-blind, placebo-controlled study. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)** v. 47, p. 377-384, 1999.

LETSIOU, S. et al. Serum Total Selenium Status in Greek Adults and Its Relation to Age. The ATTICA Study Cohort. **Biol Trace Elem Res.**, v. 128, p. 8-17, 2009.

LOPEZ, O. L. et al. Prevalence and classification of mild cognitive impairment in the Cardiovascular Health Study Cognition Study: part 1. **Arch Neurol.**, v. 60, n. 10, p. 1385-9, 2003.

LU, Y. F.; LU, S. Influence of dietary fat saturation on lipid peroxidation of serum and low density lipoprotein in rats. **Nutr Res.**, v. 22, p. 463-472, 2002.

LUCK, T. et al. Incidence of mild cognitive impairment: a systematic review. **Dement Geriatr Cogn Disord.**, v. 29, p. 164-175, 2010.

- MANGIALASCHE, F. et al. Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Ageing Research Reviews**, v. 8, p. 285-305, 2009.
- MARIANI, E. et al. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.**, v. 827, p. 65-75, 2005.
- McKAY, D. L. et al. Chronic and acute effects of walnuts on antioxidant capacity and nutritional status in humans: a randomized, cross-over pilot study. **Nutrition Journal**, p. 9:21, 2010.
- MITCHELL, A. J.; SHIRI-FESHKI, M. Rate of progression of mild cognitive impairment to dementia- meta-analysis of 41 robust inception cohort studies. **Acta Psychiatr Scand.**, v. 119, n. 4, April, p. 252-65, 2009.
- MORRIS, J. C. The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. **Neurology**, v. 43, p. 2412-2414, 1993.
- NAEINI, Alavi M., et al. The effect of antioxidant vitamins E and C on cognitive performance of the elderly with mild cognitive impairment in Isfahan, Iran: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **Eur J Nutr.**, 2013 [Epub ahead print]
- NAVARRO-ALARCON, M.; CABRERA-VIQUE, C. Selenium in food and the human body: A review. **Science of the Total Environment**, n. 1-3, p. 115-141, 2008.
- PADUDARIU, M. et al. Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 469, p. 6-10, 2010.
- PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase **J. Lab. Clin. Med.**, v. 70, p. 158-169, 1967.
- PETERSEN, R. C. et al. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. **Arch Neurol.**, v. 56, p. 303-308, 1999.
- PIRES, L. V. et al. Investigação da concentração de selênio e dos compostos fenólicos presentes na castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) e sua atividade antioxidante in vitro. **Nutrire – Journal of Brazilian Society of Food and Nutrition**, 36s:7s, 2011.
- PLANAS, M. et al. Micronutrient supplementation in mild Alzheimer disease patients. **Clin Nutr.**, v. 23, p. 265-272, 2004.
- PRIOR, R. L.; CAO, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, n. 11/12, p. 1173-1181, 1999.

- PRIOR, R. L. et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3273-3279, 2003.
- RINALDI, P. et al. Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 24, p. 915-919, 2003.
- ROOT, M. M. et al. Combined fruit and vegetable intake is correlated with improved inflammatory and oxidant status from a cross-sectional study in a community setting. **Nutrients**, v. 4, 29-41, 2012.
- RYAN E, et al. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of brazil, pecan, pine, pistachio and cashew nuts. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**,; v. 57, n. 3/4, May/June, p. 219-228, 2006.
- SCHULTZ, P. et al. Efficacy of a medical food in mild Alzheimer's disease: a randomized, controlled trial. **Alzheimers Dement**, v. 6, p. 1-10, 2010.
- SERAFINI, M. et al. Plasma antioxidants from chocolate. **Nature**, v. 424, p. 1013, 2003.
- SERAFINI, M.; DEL RIO, D. D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the Total Antioxidant Capacity the right tool? **Redox Report**, v. 9, n.3, p. 145-152, 2004.
- STEINBRENNER, H.; SIES, H. Selenium homeostasis and antioxidant selenoproteins in brain: Implications for disorders in the central nervous system. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 536, p. 152-157, p. 2013.
- STEPHAN, B. C. et al. Dementia risk prediction in the population: are screening models accurate? **Nat. Rev. Neurol.**, v. 6, n. 6, p. 318-26, 2010.
- STOCKLER-PINTO, M. B. et al. Effect of Brazil nut supplementation on the blood levels of selenium and glutathione peroxidase in hemodialysis patients. **Nutrition**, v. 26, p. 1065-1069, 2010.
- SWERDLOW, R. et al. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: Progress and perspectives. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2013 [Epub ahead print].
- TAKEMOTO, A. S. et al. Role of Selenoprotein P in Alzheimer's Disease. **Ethn Dis.**, v. 20, Suppl 1, p. 192-5, 2010.
- THOMSON, C. D. et al. Brazil nuts: an effective way to improve selenium status. **Am J Clin Nutr.**, v. 87, p. 379-84, 2008.
- 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.

TORRES, L. L. et al. Peripheral Oxidative Stress Biomarkers in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease** v. 26, p. 59-68, 2011.

WELSH, K. A. et al. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part V. A normative study of the neuropsychological battery. **Neurology**. v. 44, n. 4, p. 609-14, 1994.

WINBLAD, B. et al. Mild cognitive impairment – beyond controversies, towards a consensus: report of the International Working Group on Mild Cognitive Impairment. **J Intern Med.** v. 256, n. 3, September, p. 240-6, 2004.

ZHANG, S. et al. Selenoproteins and the aging brain. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 131, p. 253-260, 2010.

ZHU, X. et al. Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: An update. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1772, p. 494-502, 2007.

ARTIGO 2: Associações entre polimorfismos em genes de selenoproteínas e o estado nutricional relativo ao selênio e estresse oxidativo em pacientes com comprometimento cognitivo leve

Introdução

A Doença de Alzheimer (DA) é o tipo mais comum de demência, caracterizado por perda de memória e de outros domínios cognitivos. Comprometimento cognitivo leve (CCL) representa o estado entre as alterações cognitivas normais decorrentes da idade e o estágio inicial de demência (PETERSEN, 1999; AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013), e está associado com aumento de risco para DA, como mostrado por Mitchell e Shiri-Feshki (2009) em meta-análise na qual a taxa de conversão anual de CCL para demência foi de 9,6%.

DA é multifatorial, mas o envelhecimento é apontado como principal fator devido a sua relação com as mudanças no cérebro que contribuem para perda neuronal, deposição da proteína beta-amiloide e precipitação da proteína tau hiperfosforilada (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2011). Essas alterações são potencializadas pelo estresse oxidativo, cujo aumento também se associa ao avançar da idade, visto que o envelhecimento reduz a capacidade de produção de energia e aumenta a síntese de espécies reativas de oxigênio (MARIANI et al., 2005; ZHU et al., 2007).

Uma vez que o estresse oxidativo desempenha papel central na neurodegeneração, alguns estudos reportam que alguns nutrientes antioxidantes têm potencial preventivo (HU et al., 2013; CARDOSO et al., 2013). Nesse contexto, o selênio atua como antioxidante porque é essencial para a síntese de selenoproteínas, como a glutathione peroxidase (GPx) e a selenoproteína P (SePP), que se encontram abundantemente no cérebro. Dentre as enzimas da família GPx, a GPx citosólica (GPx1) é ubíqua, tendo expressão mais relevante em tecidos com alta taxa de estresse oxidativo como o cérebro, onde é expressa principalmente nas células da glia (DRUKARCH et al., 1997; CHEN; BERRY, 2003). Essa enzima utiliza a glutathione (GSH) para catalisar a redução de espécies reativas de H₂O₂ e também modula o estado redox por modular a função mitocondrial, protegendo direta e indiretamente as células (HAWKES; ALKAN, 2010). A SePP é o maior transportador de selênio, pois contém até dez resíduos de selenocisteína, e assim se associa com a resistência do cérebro a flutuações no estado nutricional quanto ao selênio durante

depleção dietética deste mineral, sugerindo sua essencialidade para o funcionamento cerebral (BENTON, 2002; NAKAYAMA et al., 2007; FAIRWEATHER-TAIT et al., 2011).

Fatores genéticos podem explicar cerca de 58 a 79% da hereditariedade da DA (GATZ et al., 2006). Nesse sentido, mutações nos genes das presenilinas 1 e 2 e da proteína precursora da beta-amiloide têm grande impacto na predisposição à DA familiar de início precoce (TANDON et al., 2002; DE STROOPER et al., 1998; CITRON et al., 1997; KWOK et al., 2000), enquanto polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, do inglês *single nucleotid polymorphism*) em genes que codificam apolipoproteína E e α_2 -macroglobulina estão associados com a DA de início tardio (CHRISTEN et al., 2000; BERTRAN; TANZI, 2004).

SNPs em genes que codificam selenoproteínas podem alterar as necessidades individuais para selênio (FERGUSON; KARUNASINGHE, 2011; HESKETH, 2008; HESKETH; MÉPLAN, 2011). O polimorfismo rs1050450 no gene da GPx1 é caracterizado por uma mutação C/T na posição 593 que causa uma troca de prolina (Pro) por leucina (Leu) no códon 198 (Pro198Leu). Este está associado com redução da atividade da GPx (RAVN-HAREN et al. 2006) e de níveis séricos de selênio (JABLONSKA et al. 2009; COMINETTI et al., 2011). Ademais, Paz-Y-Miño et al. (2010) observaram uma associação entre o alelo variante de Pro198Leu e aumento de risco para DA. SePP gene apresenta pelo menos dois SNPs funcionais: o rs7579, que causa uma mutação G/A na região 3' não traduzida no RNAm, e o rs3877899 que também se caracteriza por uma troca G/A na posição 247331, promovendo uma mudança do aminoácido alanina (Ala) por uma treonina (Thr). Os dois polimorfismos relacionam-se com mudanças nos níveis de selenoproteínas (MÉPLAN, 2007; MÉPLAN, 2009).

Conhecer os efeitos desses SNPs no metabolismo de selênio e no estresse oxidativo é de grande relevância para elucidar o papel desse nutriente nas demências. Por isso, este estudo foi conduzido para avaliar a associação entre os SNPs rs1050450 no gene da GPx1, e rs7579 e rs3877899 no gene da SePP e o estado nutricional relativo ao selênio e parâmetros de estresse oxidativo em indivíduos com CCL.

Métodos

Participantes

Foram avaliados 20 idosos com CCL que frequentavam o Ambulatório de Memória do Idoso (AMI) do Serviço de Geriatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todos os participantes preencheram os critérios propostos pelo *Working Group on Mild Cognitive Impairment* (WINBLAD et al., 2004), que incluem: a) alteração cognitiva, porém sem demência; b) evidência de perda cognitiva verificada por entrevista subjetiva e por avaliação objetiva; c) preservação das atividades da vida diária. A seleção de participantes foi realizada de acordo com os seguintes critérios de inclusão: idade igual ou superior a 60 anos; fluência em Português; ausência de qualquer outra doença neurológica ou psiquiátrica como psicose e depressão; não apresentar consumo regular de castanha-do-brasil; ausência de consumo de suplementos alimentares com selênio; ausência de alergia a oleaginosas.

Este trabalho foi conduzido de acordo com os princípios da Declaração de Helsinki, e todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Coleta de sangue

Uma amostra de sangue foi coletada após 12 horas de jejum em tubos de EDTA desmineralizados. Uma alíquota de 1 mL do sangue total foi usada para a extração do DNA e subsequente genotipagem. O plasma foi separado do sangue total por centrifugação a 3.000 x g durante 15 minutos a 4°C. A massa eritrocitária obtida do sangue total, também por centrifugação, foi lavada três vezes com 5 mL de solução salina a 0,9%, homogeneizada lentamente por inversão e centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos (SORVALL[®] RC5C) a 4°C, sendo o sobrenadante descartado.

Extração de DNA e genotipagem

O DNA genômico foi extraído do sangue total com o *kit* Purelink Genomic DNA kit (Invitrogen, Life Technologiemensurada em Nanos Inc., Carlsbad, CA, USA), e a concentração final foi quantificada em espectrofotômetro Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

O polimorfismo Pro198Leu no gene da GPx1 e os polimorfismos rs7579 e rs3877899 no gene da SePP foram determinados por real-time PCR com o sistema TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As reações finais foram realizadas em volume de 20 µL contendo: 12.5 µL de 2x TaqMan Genotyping Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 1.25 µL de 20x SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA), 20 ng de DNA genômico e água ultrapura para completar o volume final. As reações de PCR foram analisadas no equipamento StepOne Real-Time PCR System como segue: 10 minutos a 95°C para ativação enzimática seguida por 40 ciclos a 92°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto para anelamento e extensão.

Avaliações bioquímicas

A concentração de selênio no plasma e no eritrócito foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica por geração de hidretos acoplados à cela de quartzo (HAO et al., 1996). Amostras de plasma e de eritrócitos foram preparadas para a análise pela digestão com ácido nítrico 68% (Merck, Darmstadt, Germany) e aquecidas a 150°C. Após a volatilização do material orgânico, as soluções foram reduzidas de Se VI para Se IV com a adição de ácido clorídrico 1,2 N e aquecimento a 100°C por 2 h. Posteriormente, as amostras foram diluídas em água ultrapura para um volume final de 25 mL. As amostras foram analisadas em duplicata com leitura em triplicata. A confiabilidade do método foi confirmada utilizando-se os materiais de referência padrão Seronorm® Trace Elements Serum and Whole Blood (Sero AS, Billingstad, Norway).

A atividade da GPx foi determinada com a utilização de *kit* comercial (Ransel 505 – RANDOX Laboratories, Crumlin, UK), adaptado para o uso em analisador bioquímico automático (Liasys® MAS, Rome, Italy), em lisado de eritrócitos de acordo com o método de Paglia e Valentine (1967). Aliquotas de eritrócitos foram misturadas à solução de diluente, seguida por 5 minutos de incubação e adição de solução de Drabkin (2x). A atividade da enzima foi avaliada em comprimento de onda de 340 nm a 37° C. A concentração de hemoglobina foi também determinada a fim de se expressar o valor da atividade da GPx em U/g Hb.

ORAC foi avaliado com base no método de Prior et al. (2003). As amostras de plasma foram desproteinizadas com ácido perclórico e posteriormente diluídas em tampão fosfato 10x

(pH 7,4). 25 μL de amostra foram adicionados à microplaca para análise, e 150 μL de solução de fluoresceína foram adicionados automaticamente por injetores do leitor de microplaca (Biotech Synergy H1), seguido por 25 μL of AAPH. Realizou-se uma curva padrão de Trolox com as seguintes concentrações: 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12,5 μM e 6,25 μM . Os resultados foram expressos em μmol de Trolox por litro de plasma ($\mu\text{mol TE/mL}$).

MDA plasmático foi determinado por HPLC de acordo com o método de Hong et al. (2000). 36 μL de BHT, 12,5 μL de NaOH (10 N) e 250 μL de plasma foram aquecidos durante 30 minutos e 500 μL de ácido tricloroacético e iodeto de potássio (1%) foram adicionados para precipitar as proteínas. Após aquecimento, 1000 μL do sobrenadante foram misturados a 250 μL de ácido tiobarbitúrico e a mistura foi aquecida durante 45 minutos. Para extração do MDA, foram adicionados 250 μL de n-butanol à solução anterior, agitando-a no vórtex antes da centrifugação final (3000 rpm por 10 minutos). Essa análise foi realizada em equipamento Shimadzu system (Kyoto, Japan), e a concentração de MDA foi avaliada pela média da curva de calibração.

Avaliação do consumo de selênio

A avaliação do consumo alimentar foi realizada pelo método de registro alimentar de três dias não consecutivos. Todos os registros preenchidos pelos participantes foram conferidos por uma nutricionista treinada para evitar dúvidas, erros e omissões. Os dados dos registros foram calculados com o *software* NutWin, versão 1.5.1.11, do Departamento de Informática da Escola Paulista de Medicina/UNIFESP. No banco de dados desse *software* foram inseridos dados de quantidades de selênio provenientes do trabalho de Ferreira et al. (2002).

Análise estatística

A descrição dos dados foi realizada, e todas as variáveis contínuas foram expressas como média \pm desvio padrão (dp). As variáveis categóricas foram expressas como número absoluto e porcentagem. A distribuição das variáveis foi analisada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As frequências alélicas foram estimadas pelo método de contagem de genes, e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado para todos os genótipos usando-se o teste do Qui-quadrado. Para todas as análises estatísticas, os genótipos homocigoto recessivo e heterocigoto foram agrupados.

As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste t para amostras independentes. Para explorar a associação entre os parâmetros de selênio e os genótipos de Pro198Leu, rs7579 e rs3877899, controlando-se para confundidores, realizou-se regressão linear múltipla hierárquica. Nos modelos, os parâmetros de selênio no plasma e no eritrócito foram usados como variáveis dependentes e os genótipos foram incluídos como variáveis independentes primárias. As covariáveis foram inseridas em três passos sequenciais para examinar sua relevância: no primeiro passo, o genótipo foi inserido sem covariáveis; no segundo passo, idade e gênero foram incluídos; no último passo, o consumo de selênio foi avaliado. Também elaboraram-se modelos de regressão hierárquica para avaliar a associação entre os genótipos e os parâmetros de estresse oxidativo. Nesse caso, os valores de ORAC, MDA e GPx foram alternadamente usados como dependentes variáveis, e os genótipos novamente como variáveis independentes primárias. As covariáveis foram inseridas como seguem: 1) genótipos sem covariáveis; 2) selênio no eritrócito; 3) variáveis sociodemográficas (idade e gênero). O coeficiente da correção de Pearson foi utilizado para correlacionar a atividade da GPx e a concentração de selênio no eritrócito.

Os valores de selênio resultantes do cálculo dos registros alimentares foram ajustados pela energia através do método residual de Willett (WILLETT, 1998), calculado por meio de regressão linear (regressão linear do consumo do nutriente sobre o consumo calórico total) e de adição de uma constante (consumo energético médio do grupo).

Todas as análises foram realizadas no *software Statistical Package for the Social Sciences*, versão 20.0, para *Windows* (SPSS, Chicago, IL, USA). O valor de p de 0,005 foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

A idade média dos participantes foi $78,0 \pm 5,3$ anos, e 30% eram homens. A distribuição dos genótipos e a frequência dos alelos para Pro198Leu, rs7579 e rs3877899 são apresentados na Tabela 6. A distribuição de todos os genótipos estava de acordo com o equilíbrio de Hardy–Weinberg ($p < 0,05$).

Tabela 6: Frequência dos genótipos e dos alelos para os polimorfismos Pro198Leu, rs7579 e rs3877899

Polimorfismos	Homozigoto de referência	Heterozigoto	Homozigoto variante	Heterozigoto + homozigoto variante	Alelo variante
GPx1					
Pro198Leu (C>T)	8 (40,0%)	7 (35,0%)	5 (25,0%)	12 (60,0%)	0,425
SePP					
rs7579 (G>A)	11 (55,0%)	6 (30,0%)	3 (15,0%)	9 (45,0%)	0,300
rs3877899 (G>A)	12 (60,0%)	8 (40,0%)	0 (0,0%)	8 (40,0%)	0,200

A: adenina

C: citosina

G: guanina

T: timina

GPx1: glutationa peroxidase 1

SePP: selenoproteína P

Os valores para selênio plasmático e eritrocitário, atividade da GPx, ORAC e MDA para todos os genótipos são apresentados na Tabela 7. Não foram observadas diferenças significativas em relação aos parâmetros bioquímicos entre os diferentes genótipos, e percebe-se que o grupo polimórfico do Pro198Leu apresentou o maior consumo de selênio.

Tabela 7: Níveis de selênio plasmático e eritrocitário, consumo de selênio, atividade da GPx, ORAC e MDA dos participantes de acordo com o genótipo para Pro198Leu, rs7579 e rs3877899

Genótipos	Selênio plasma ($\mu\text{g/L}$) média \pm dp	Selênio eritrócito ($\mu\text{g/L}$) média \pm dp	Selênio consumo ($\mu\text{g/d}$) média \pm dp	Atividade de GPx (U/gHb) média \pm dp	ORAC ($\mu\text{molTE/mL}$) média \pm dp	MDA ($\mu\text{mol/L}$) média \pm dp
GPx1						
Pro198Leu						
CC	47,36 \pm 9,60	51,48 \pm 23,22	26,77 \pm 6,83	47,45 \pm 20,16	1,00 \pm 0,55	0,44 \pm 0,88
CT+TT	57,51 \pm 19,86	58,40 \pm 19,46	36,01 \pm 7,33	38,71 \pm 11,79	0,89 \pm 0,31	0,46 \pm 0,07
	P=0,147	P=0,499	P=0,030	P=0,294	P=0,602	P=0,599
SePP						
rs7579						
GG	55,65 \pm 19,76	53,76 \pm 19,91	32,51 \pm 10,06	41,33 \pm 17,69	0,94 \pm 0,49	0,44 \pm 0,80
GA+AA	50,76 \pm 13,47	57,91 \pm 22,69	33,92 \pm 5,77	43,24 \pm 14,12	0,93 \pm 0,32	0,46 \pm 0,081
	P=0,520	P=0,673	P=0,731	P=0,789	P=0,924	P=0,617
rs3877899						

GG	53,88±11,41	57,53±17,33	33,83±8,69	43,79±17,17	0,89±0,35	0,46±0,09
GA	52,80±24,02	52,77±26,07	31,02±7,40	39,83±14,27	1,00±0,52	0,43±0,06
	P=0,909	P=0,659	P=0,574	P=0,583	P=0,610	P=0,343

A: adenina
C: citosina
G: guanina
T: timina
dp: desvio padrão
GPx: glutathione peroxidase
GPx1: glutathione peroxidase 1
MDA: malondialdeído
ORAC: *oxygen radical absorbance capacity*
SePP: selenoproteína P

Nos modelos de regressão linear, os genótipos CT+TT do Pro198Leu foram associados com maiores níveis plasmáticos de selênio. No modelo ajustado, a presença do alelo variante foi relacionada com um aumento de 0,613 dp na concentração de selênio no plasma. Não foram observadas associações entre os outros genótipos e o estado nutricional quanto ao selênio, bem como não houve associação entre os genótipos de estudo e os parâmetros de estresse oxidativo. Entretanto, o avanço da idade foi associado à redução da atividade da GPx quando ajustado pelos genótipos, gênero e selênio eritrocitário. Ressalta-se ainda que embora o grupo variante para Pro198Leu tenha apresentado maior consumo de selênio, esse dado não foi associado com parâmetros bioquímicos nos modelos de regressão linear (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8: Associação entre os parâmetros de selênio e os polimorfismos Pro198Leu, rs7679 e rs3877899 em modelos de regressão linear ajustados

Variáveis dependentes	Variáveis independentes	Coeficientes β padronizados		
		Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3
Selênio plasma	Polimorfismo Pro198Leu	0,613*		
	Polimorfismo rs7579		-0,202	
	Polimorfismo rs3877899			0,306
	Idade	0,120	0,225	0,213
	Gênero	-0,369	-0,442	-0,407
	Selênio consumo	-0,556	-0,199	-0,180
Selênio eritrócito	Polimorfismo Pro198Leu	0,394		
	Polimorfismo rs7579		0,280	
	Polimorfismo rs3877899			0,103

Idade	-0,139	0,066	-0,054
Gênero	-0,515	-0,375	-0,522
Selênio consumo	-0,200	-0,087	0,018

O parâmetro de regressão estima o coeficiente β padronizado, e os valores de p são para variáveis independentes dentro de cada modelo.

*: $P < 0,05$

Tabela 9: Associação entre ORAC, MDA e atividade da GPx e os polimorfismos Pro198Leu, rs7679 e rs3877899 em modelos de regressão linear ajustados

Variáveis dependentes	Variáveis independentes	Coeficientes β padronizados		
		Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3
ORAC	Polimorfismo Pro198Leu	-0,192		
	Polimorfismo rs7579		0,119	
	Polimorfismo rs3877899			0,225
	Selênio eritrócito	-0,151	-0,233	-0,218
	Idade	-0,326	-0,378	-0,415
	Gênero	0,291	0,252	0,235
MDA	Polimorfismo Pro198Leu	0,174		
	Polimorfismo rs7579		0,171	
	Polimorfismo rs3877899			-0,192
	Selênio eritrócito	-0,139	-0,073	-0,077
	Idade	-0,192	-0,172	-0,113
	Gênero	-0,039	0,101	0,014
Atividade de GPx	Polimorfismo Pro198Leu	-0,254		
	Polimorfismo rs7579		-0,070	
	Polimorfismo rs3877899			-0,020
	Selênio eritrócito	0,369	0,267	0,264
	Idade	-0,403*	-0,449*	-0,452*
	Gênero	-0,221	-0,356	-0,332

O parâmetro de regressão estima o coeficiente β padronizado, e os valores de p são para variáveis independentes dentro de cada modelo.

*: $P < 0,05$

GPx: glutathiona peroxidase

MDA: malondialdeído

ORAC: *oxygen radical absorbance capacity*

A associação entre atividade da GPx e concentração de selênio eritrocitário foi diferente entre os genótipos. Dentre os genótipos do Pro198Leu, o grupo CC apresentou correlação

significativa ($r=0,803$; $p=0,017$), diferente entre os genótipos variantes ($r=0,531$, $p=0,076$). O genótipo homozigoto de referência para rs3877899 também apresentou correlação significativa ($r=0,645$, $p=0,024$), contrária aos outros genótipos ($r=0,568$; $p=0,142$). Quando a correlação entre atividade da GPx e selênio eritrocitário foram analisados separadamente de acordo com os genótipos para rs7579, observou-se que essa associação foi significativa apenas entre os genótipos variantes ($r=0,350$; $p=0,291$; $r=0,939$; $p=0,000$, genótipos de referência e variantes, respectivamente).

Discussão

Este estudo é o primeiro a analisar as associações entre estado nutricional relativo ao selênio e o estresse oxidativo em pacientes com CCL em relação a polimorfismos em selenoproteínas. Hipotetizou-se que os polimorfismos Pro198Leu no gene da GPx1, e os rs7579 e rs3877899 no gene da SePP influenciariam os parâmetros de selênio e de estresse oxidativo nesses indivíduos.

A SePP desempenha um papel-chave no transporte de selênio porque apresenta dez resíduos de selenocisteína, um dos quais na região N-terminal e nove no domínio C-terminal. A região N-terminal atua como uma enzima, enquanto o menor domínio apresenta mecanismos para garantir proteção às moléculas de selênio durante o transporte (FERGUSON et al., 2012). Assim é possível observar que a SePP é essencial para o suprimento de selênio para a síntese de outras selenoproteínas, incluindo aquelas com atividade antioxidante, em diferentes tecidos. SePP também apresenta papel antioxidante, visto que inibe oxidação de LDL e é capaz de reduzir hidróperóxidos pela doação de elétrons provenientes da glutatona ou da tioredoxina (BURK; HILL, 2005; STEINBRENNER et al., 2006; FAIRWEATHER-TAIT et al., 2011). O polimorfismo rs3877899 está presente na região 3' não traduzida do gene (MÉPLAN et al., 2007), onde se localiza o códon UGA que se liga à selenocisteína durante a síntese de selenoproteínas (HATFIELD et al., 2014), e assim este SNP pode alterar a eficiência da incorporação da selenocisteína (MÉPLAN et al., 2009). O polimorfismo rs7579 está localizado em uma região codificadora do gene da SePP, e assim pode regular a estabilidade da proteína e a captação de selênio pelas células (Méplan et al., 2009). Neste trabalho, rs7579 e rs3877899 não influenciaram o estado nutricional dos participantes quanto ao selênio, embora os dois SNPs

estejam associados à alteração na proporção das isoformas 50kDa e 60kDa de selenoproteína P no plasma, o que pode causar alteração no suprimento de selênio para a síntese de diferentes selenoproteínas (MÉPLAN et al., 2007).

A família de enzimas GPx tem papel antioxidante essencial devido ao seu envolvimento na redução de hidroperóxidos e peróxidos orgânicos. Esses antioxidantes também desempenham função no sistema nervoso central, uma vez que essas enzimas são expressas pelas células da glia e pelos neurônios, e assim protegem essas células contra os danos provocados pelo estresse oxidativo (GARCIA et al., 2009; ZHANG et al., 2010). O polimorfismo rs1050450, também denominado Pro198Leu, caracterizado por uma troca de uma Pro por uma Leu no códon 198, foi associado com aumento do risco para Doença de Alzheimer (PAZ-Y-MIÑO, 2010), mas os mecanismos relacionados ainda não foram elucidados. Na primeira análise deste trabalho, observou-se que os genótipos de Pro198Leu não apresentaram diferença para as concentrações de selênio no plasma e no eritrócito. Entretanto, nos modelos de regressão logística, a presença do alelo variante T foi associada com aumento de selênio no plasma, diferente de outros estudos que não observaram diferença no *status* de selênio quanto a esse SNP (COMINETTI et al., 2011; CARDOSO et al., 2012). Desse modo, os resultados deste trabalho sugerem que esse SNP pode modular a disponibilidade de selênio, alterando as necessidades individuais desse mineral.

Elevada taxa de estresse oxidativo foi observada em pacientes com Doença de Alzheimer e também naqueles com CCL. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas a partir do metabolismo e podem iniciar uma cascata de formação de radicais livres, resultando em oxidação de proteínas e de lipídios, além de mudanças no DNA. No cérebro, as EROs são associadas com morte neural e declínio da função cognitiva (BERR et al., 2000; TORRES et al., 2011; STEPHAN et al., 2011). Conhecer a associação entre SNPs e estresse oxidativo permite administrar essa condição da melhor maneira, por exemplo, aumentando os componentes antioxidantes da dieta. Porém, neste trabalho, a atividade da GPx e os níveis de ORAC e MDA não foram diferentes entre os genótipos. Os estudos não são conclusivos quanto à associação do Pro198Leu e à atividade da GPx. Nesse sentido, alguns trabalhos observaram redução da atividade enzimática para cada alelo variante (RAVN-HAREN, 2006; XIONG et al., 2010), enquanto outros não verificaram diferenças entre os genótipos (FOSBERG et al., 2000; JABLONSKA et al., 2009; CHARNIOT et al., 2011; CARDOSO et al., 2012). Fosberg et al (2000) sugeriram que a GPx apresenta alta estabilidade e que sua atividade pode ser estimulada

na presença de EROs, o que compensaria a redução causada pela presença do alelo variante. Pro198Leu e os SNPs da SePP estudados também não se associaram com parâmetros de estresse oxidativo em outros trabalhos (CHARNIOT et al., 2011; TANG et al., 2012; AL-ALEM et al., 2012; TAKATA et al., 2012), sugerindo que esses polimorfismos não influenciam o sistema antioxidante de maneira significativa.

A correlação entre a atividade da GPx e selênio eritrocitário foi diferente entre os genótipos de Pro198Leu, assim como reportado por outros trabalhos que observaram correlação significativa entre os indivíduos com genótipo CC (JABLONSKA, 2009; COMINETTI et al., 2011; CARDOSO et al., 2012; KARUNASINGHE et al., 2012), sugerindo que os genótipos podem alterar a distribuição de selênio para a síntese de selenoproteínas.

No modelo de regressão ajustado, a idade foi a variável que de maneira mais forte se associou com a atividade da GPx. Essa associação negativa entre idade e atividade da GPx não é consenso na literatura, mas alguns estudos mostram que a atividade de enzimas antioxidantes está reduzida em seres humanos e animais com idade avançada (HO et al., 2005; MAURYA et al., 2010; ALABARSE et al., 2011). A redução da atividade da GPx se associa com a diminuição da capacidade antioxidante, deixando o cérebro ainda mais vulnerável aos danos do estresse oxidativo (COYLE; PUTTFARCKEN, 1993; BOURDEL-MARCHASSON et al. 2001). A produção de EROs aumenta com a idade, e estes afetam dendritos e sinapses, reduzindo a capacidade de memória e de aprendizado e associando-se à redução da capacidade cognitiva e à instalação de demências como a Doença de Alzheimer (MARIANI et al., 2005; ZHU et al., 2007).

Este estudo apresenta algumas limitações, em especial pelo número reduzido de participantes, o que impossibilitou a estratificação dos dados por idade e por gênero. Também é importante mencionar que múltiplos polimorfismos em genes de selenoproteínas e de outras enzimas antioxidantes podem cooperar para gerar diferentes respostas fenotípicas, e assim os efeitos dos SNPs podem ser alterados pela presença de outros SNPs (HESKETH; MÉPLAN, 2011). Nesse contexto, estudos que associam polimorfismos em genes de selenoproteínas e outros SNPs, relacionados a diferentes condições ambientais e fatores dietéticos, são de grande valor.

Por fim, este trabalho sugere que o polimorfismo Pro198Leu pode ter influência sobre o estado nutricional relativo ao selênio e sobre a síntese de GPx em pacientes com CCL. Diferente

do esperado, os polimorfismos rs7579 e rs3877899 não refletiram mudanças no metabolismo de selênio e no estresse oxidativo. Também se destaca a relação do envelhecimento com a atividade da GPx e, assim, estratégias para otimizar a atividade desta enzima em idosos são importantes para amenizar o estresse oxidativo.

Referências

- ALABARSE, P. V. G. et al. Oxidative stress in the kidney of reproductive male rats during aging. **Experimental Gerontology**, v. 46, p. 773-780, 2011.
- AL-ALEM, U. et al. Associations between functional polymorphisms in antioxidant defense genes and urinary oxidative stress biomarkers in healthy, premenopausal women. **Genes Nutr.**, v. 7, p. 191-195, 2012.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. Alzheimer's Association Report 2011 – Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's and Dementia**, p. 208-244, 2011.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. 5th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association, 2013.
- DRUKARCH, E. B. et al. Astrocyte-mediated enhancement of neuronal survival is abolished by glutathione deficiency. **Brain Res.** v. 770, p. 123-130, 1997.
- BENTON, D. Selenium Intake, Mood and Other Aspects of Psychological Functioning. **Nutritional Neuroscience**, v. 5, n. 6, p. 363–374, 2002.
- BERR, C. et al. Cognitive decline is associated with systemic oxidative stress: the EVA study. Etude du Vieillissement Artériel. **J Am Geriatr Soc.**, v. 48, n. 10, p. 1285-1291, 2000.
- BERTRAN, L.; TANZI, R. E. The current status of Alzheimer's disease genetics: what do we tell the patients? **Pharmacological Research**, v. 50, p. 385-396, 2004.
- BOURDEL-MARCHASSON, I. et al. Antioxidant defences and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients. **Age Ageing**, v. 30, p. 235-241, 2001.
- BURK, R. F.; HILL, K. E. Selenoprotein P: An extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. **Annu. Rev. Nutr.** v. 25, p. 215-235, 2005.
- CARDOSO, B. R. et al. Glutathione peroxidase 1 Pro198Leu polymorphism in Brazilian Alzheimer's disease patients: relations to the enzyme activity and to selenium status. **J Nutrigenet Nutrigenomics**. v. 5, n. 2, p. 72-80, 2012.
- CARDOSO, B. R. et al. Importance and management of micronutrient deficiencies in patients with Alzheimer's disease. **Clin Interv Aging**. v. 8, p. 531-42, 2013.
- CHARNIOT, J. C. et al. Manganese superoxide dismutase dimorphism relationship with severity and prognosis in cardiogenic shock due to dilated cardiomyopathy. **Free Radical Research**, v. 45, n. 4, April, p. 379-388, 2011.

- CHEN, J.; BERRY, M. J. Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. **Neurochem.** v. 86, p. 1-12, 2003.
- CHRISTEN, Y. Oxidative stress and Alzheimer's disease. **Am J Clin Nutr.**, v. 71, p. 621S-629S, 2000.
- CITRON, M. et al. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. **NatMed**; v. 3, n. 1, p. 67-72, 1997.
- COMINETTI, C. et al. Associations between glutathione peroxidase-1 Pro198Leu polymorphism, selenium status, and DNA damage levels in obese women after consumption of Brazil nuts. **Nutrition**, v. 9, p.891-896, 2011.
- COYLE, J.T.; PUTTFARCKEN, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. **Science**, v. 262, p. 689-695, 1993.
- DE STROOPER, B. et al. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. **Nature**, v. 391, n. 6665, p. 387-390, 1998.
- FAIRWEATHER-TAIT, S. J. et al. Selenium in Human Health and Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14, n. 7, 2011.
- FERGUSON, L. R.; KARUNASINGHE, N. Nutrigenetics, nutrigenomics, and selenium. **Front Genet.**, v. 2, p. 1-1, 2011.
- FERGUSON, L. R, et al. Selenium and its' role in the maintenance of genomic stability. **Mutation Research**, v. 733, p. 100-110, 2012.
- FERREIRA, K. S. et al. Concentrações de selênio em alimentos consumidos no Brasil. **Pan Am J Public Health.**, v. 11, p. 172-7, 2002.
- FORSBERG, L. et al. Phenotype determination of a common Pro-Leu polymorphism in human glutathione peroxidase 1. **Blood Cells Mol Dis.**, v. 26:423-6, 2000.
- GARCIA, T. et al. Oxidative stress status and RNA expression in hippocampus of an animal model of Alzheimer's disease after chronic exposure to aluminum. **Hippocampus**, v. 20, p. 218-225, 2009.
- HAO, D. et al. Determination of serum selenium by hydride generation flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 43, p. 595-600, 1996.
- HATFIELD, D. L. et al. Selenium and selenocysteine: roles in cancer, health, and development. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 3, March, 2014.

HAWKES, W. C.; ALKAN Z. Regulation of Redox Signaling by Selenoproteins. **Biol Trace Elem Res.**, v. 134, p. 235-251, 2010.

HESKETH, J. Nutrigenomics and selenium: gene expression patterns, physiological targets, and genetics. **Annu Rev Nutr.**, v. 28, p.157-177, 2008.

HESKETH, J., MÉPLAN, C. Transcriptomics and functional genetic polymorphisms as biomarkers of micronutrient function: focus on selenium as an exemplar. **Proc Nutr Soc.**, v. 3, p. 1-9, 2011.

HO, S.P. et al. Antioxidant enzyme activities in healthy Chinese adults: influence of age, gender and smoking. **Respirology**, v. 10, p. 305-309, 2005.

HONG, Y. L. et al. Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. **Clin. Biochem.**, v. 33, pp. 619-625, 2000.

Hu, N. et al. Nutrition and the Risk of Alzheimer's Disease. **Biomed Res Int.** v. 2013;2013:524820.

JABLONSKA, E. et al. Association between GPx1 Pro198Leu polymorphism, GPx1 activity and plasma selenium concentration in humans. **Eur J Clin Nutr**, v. 48, p. 383-6, 2009.

KARUNASINGHE, N. et al. Serum selenium and single-nucleotide polymorphisms in genes for selenoproteins: relationship to markers of oxidative stress in men from Auckland, New Zealand. **Genes Nutr.**, v. 7, p. 179-190, 2012.

KWOK, J. B. et al. Novel Leu723Pro amyloid precursor protein mutation increases amyloid beta42(43) peptide levels and induces apoptosis. **Ann Neurol.**, v. 47, n. 2. p. 249-253, 2000.

GATZ, C. A. M. et al. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. **Archives of General Psychiatry**, v. 63, p. 168-174, 2006.

MARIANI, E. et al. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.**, v. 827, p. 65-75, 2005.

MAURYA, P. K. et al. Age-associated changes in erythrocyte glutathione peroxidase activity: correlation with total antioxidant potential. **Indian J Biochem Biophys.**, v. 47, n. 5, p. 319-21, 2010.

MÉPLAN, C. et al. Genetic polymorphisms in the human selenoprotein P gene determine the response of selenoprotein markers to selenium supplementation in a gender - specific manner (the SELGEN study). **The FASEB Journal**, v. 21, n. 12, p. 3063-74, 2007.

- MÉPLAN, C. et al. Relative Abundance of Selenoprotein P Isoforms in Human Plasma Depends on Genotype, Se Intake, and Cancer Status. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 11, 2009.
- MITCHELL, A. J.; SHIRI-FESHKI, M. Rate of progression of mild cognitive impairment to dementia- meta-analysis of 41 robust inception cohort studies. **Acta Psychiatr Scand.**, v. 119, n. 4, April, p. 252-65, 2009.
- NAKAYAMA, A. et al. All regions of mouse brain are dependent on selenoprotein P for maintenance of selenium. **J Nutr.**, v. 137, n. 3, p. 690-693, 2007.
- PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase **J. Lab. Clin. Med.**, v. 70, p. 158-169, 1967.
- PAZ-Y-MIÑO. C. et al. Genetic Polymorphisms in Apolipoprotein E and Glutathione Peroxidase 1 Genes in the Ecuadorian Population Affected With Alzheimer Disease. **Am J Med Sci**, v. 340, n. 5, p. 373-377, 2010.
- PETERSEN, R. C. et al. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. **Arch Neurol.**, v. 56, p. 303-308, 1999.
- PRIOR, R. L. et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3273-3279, 2003.
- RAVN-HAREN, G. et al. 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.
- STEINBRENNER, H. et al. Involvement of selenoprotein P in protection of human astrocytes from oxidative damage. **Free Radic. Biol. Med.** v. 40, p. 1513-1523, 2006.
- STEPHAN, B. C. M. et al. The neuropathological profile of mild cognitive impairment (MCI): a systematic review. **Molecular Psychiatry**, 2011.
- TAKATA, Y. et al. Genetic Variation inGPX1Is Associated with GPX1 Activity in a Comprehensive Analysis of Genetic Variations in Selenoenzyme Genes and Their Activity and Oxidative Stress in Humans. **J. Nutr.** v. 142, p. 419-426, 2012.
- TANDON, A.; Fraser P. The presenilins. **Genome Biol.**, v. 3, n. 11, p. 3014-3019, 2002.
- TANG, T. S. et al. Association between thers1050450glutathione peroxidase-1 (C>T) gene variant and peripheral neuropathy in two independent samples of subjects with diabetes mellitus. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases** (2012)22, 417e425.

TORRES, L. L. et al. Peripheral Oxidative Stress Biomarkers in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease** v. 26, p. 59-68, 2011.

WILLET, W. C. **Nutritional Epidemiology**. 2 ed. New York: Oxford University Press, 1998.

WINBLAD, B. et al. Mild cognitive impairment – beyond controversies, towards a consensus: report of the International Working Group on Mild Cognitive Impairment. **J Intern Med.** v. 256, n. 3, September, p. 240-6, 2004.

XIONG, Y. M. Association study between polymorphisms in selenoprotein genes and susceptibility to Kashin-Beck disease. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, p. 817-824, 2010.

ZHANG, S. et al. Selenoproteins and the aging brain. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 131, p. 253-260, 2010.

ZHU, X. et al. Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: An update. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1772, p. 494-502, 2007.

ARTIGO 3: Efeitos de polimorfismos nos genes da glutathiona peroxidase 1 da selenoproteína P em resposta ao consumo de castanha-do-brasil em idosos com comprometimento cognitivo leve

Introdução

Estratégias para postergar a progressão do declínio cognitivo e evitar a demência são desafios para a ciência. Estima-se que até o ano de 2050 dois terços da população dos países em desenvolvimento apresentarão Doença de Alzheimer, a forma mais comum de demência (ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL, 2009). Embora alguns idosos não apresentem demência, eles podem apresentar um déficit cognitivo além do esperado para a idade. Essa condição é denominada comprometimento cognitivo leve (CCL) e está associada com aumento do risco para Doença de Alzheimer, visto que em muitos casos já há alterações fisiopatológicas no cérebro comuns à demência (LOPEZ et al., 2003). Uma vez que o estresse oxidativo tem papel central na neurodegeneração e no declínio cognitivo, os antioxidantes se apresentam como importantes estratégias terapêuticas (MANGIALASCHE et al., 2009; PADURARIU et al., 2010).

O selênio é um micronutriente essencial que desempenha papel antioxidante mediado por selenoproteínas (CUI et al., 2004; BRENNEISEN et al., 2005; ZHANG et al., 2010). Alguns estudos mostram que esse mineral é essencial para o sistema nervoso central, e que sua deficiência está associada ao declínio cognitivo (BERR et al., 2000; GAO et al., 2007; CARDOSO et al., 2010).

A associação entre consumo inadequado de selênio e polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes que codificam selenoproteínas pode negativamente influenciar os mecanismos protetores contra o estresse oxidativo (MÉPLAN et al., 2006; SHINKAI et al., 2006). Jablonska et al. (2009) e Cominetti et al. (2011) sugeriram que o polimorfismo Pro198Leu (rs1050450) no gene da glutathiona peroxidase 1 (GPx1) pode afetar a atividade dessa enzima, e Cardoso et al. (2012) observaram diferenças nos níveis séricos de selênio entre idosos com genótipo homocigoto dominante com Alzheimer e saudáveis, além de mudanças na correlação entre atividade da GPx e selênio eritrocitário entre os indivíduos com diferentes genótipos. Ademais, Paz-Y-Miño et al. (2010) observaram associação entre o alelo variante e aumento de risco para

Doença de Alzheimer. No que diz respeito a polimorfismos no gene da selenoproteína P (SePP), dentre os cinco conhecidos, rs7579 (r25191g/a) e rs3877899 (Ala234Thr) apresentam consequências funcionais conhecidas nos níveis da proteína ou na sua função (AL-TAIE et al., 2004; MÉPLAN et al., 2007; KARUNASINGHE et al., 2012).

A castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) é a fonte alimentar mais rica em selênio, e a sua inclusão na dieta pode ser uma estratégia interessante para melhorar o estado nutricional do mineral, e assim reduzir o estresse oxidativo em pacientes com CCL. Entretanto, SNPs em genes que codificam selenoproteínas podem influenciar a resposta a intervenções dietéticas, e por isso justifica-se a importância de se entender a interação entre consumo de selênio e eventos de nível genético e celular. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar se o polimorfismo Pro198Leu, no gene da GPx1, e os polimorfismos rs7579 e rs3877899 no gene da SePP afetam a resposta frente ao consumo diário de castanha-do-brasil, no que diz respeito aos níveis séricos de selênio, estresse oxidativo e expressão desses genes, em idosos com CCL.

Materiais e Métodos

Participantes do estudo

O estudo incluiu 11 pacientes com CCL que frequentavam o Ambulatório de Memória do Idoso (AMI) do Serviço de Geriatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todos os participantes preencheram os critérios propostos pelo *Working Group on Mild Cognitive Impairment* (WINBLAD et al., 2004), que incluem: a) alteração cognitiva, porém sem demência; b) evidência de perda cognitiva verificada por entrevista subjetiva e por avaliação objetiva; c) preservação das atividades da vida diária.

Todos os participantes tinham idade igual ou superior a 60 anos, eram fluentes em Português, não apresentavam quaisquer outras alterações psiquiátricas ou neurológicas, não tinham consumo regular de castanha-do-brasil, não faziam uso de suplementos alimentares contendo selênio e não tinham intolerância conhecida a oleaginosas.

O estudo foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Protocolo de estudo

Os participantes receberam uma castanha-do-brasil diariamente durante seis meses. As castanhas foram oferecidas a cada dois meses em embalagens contendo sessenta unidades. As castanhas usadas neste estudo apresentavam 57,75 µg/g de selênio, 10,89g/100g de carboidratos, 16,27g/100g de proteínas e 67,35g/100g de lipídios. Como o peso médio de cada castanha era de 5 g, cada unidade fornecia cerca de 288,75 µg de selênio.

A adesão ao tratamento foi monitorada pela contagem das castanhas devolvidas ao final do estudo, e a adesão mínima aceitável foi de 85%. Todos os indivíduos foram instruídos para manter a rotina alimentar e para evitar o consumo de outras castanhas-do-brasil durante o estudo.

Coleta de sangue

Uma amostra de sangue de todos os participantes foi coletada após 12 horas de jejum em tubos de EDTA desmineralizados no início do estudo e após os seis meses de intervenção. O plasma foi separado do sangue total por centrifugação a 3.000 x g durante 15 minutos a 4°C. A massa eritrocitária que foi obtida do sangue total, também por centrifugação, foi lavada três vezes com 5 mL de solução salina a 0,9%, homogeneizada lentamente por inversão e centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos (SORVALL® RC5C) a 4°C, sendo o sobrenadante descartado.

Uma alíquota de 1 mL do sangue total foi usada para a extração do DNA e subsequente genotipagem dos polimorfismos rs1050450, rs7579 e rs3877899. Para análise da expressão gênica, 300 µL de sangue total foram armazenados com 1,5 mL de RNA-later (Qiagen, Valencia, CA, USA) a -80°C até o momento da análise.

Extração do DNA e genotipagem

O DNA genômico foi extraído do sangue total com o *kit* Purelink Genomic DNA kit (Invitrogen, Life Technologiemensurada em Nanos Inc., Carlsbad, CA, USA), e a concentração final foi quantificada em espectrofotômetro Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

Os polimorfismos no gene da GPx1 (Pro198Leu) e no gene da SePP (rs7579 e rs3877899) foram determinados por real-time PCR com o sistema TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As reações finais continham: 12.5 µL de 2x TaqMan Genotyping Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 1.25 µL de 20x SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA), 20 ng de DNA genômico e água ultrapura para completar o volume final de 20 µL.

As reações de PCR foram analisadas no equipamento StepOne Real-Time PCR System como segue: 10 minutos a 95°C para ativação enzimática seguida por 40 ciclos a 92°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto para anelamento e extensão.

Determinação da expressão gênica da GPx1 e da SePP

O RNAm foi extraído com o *kit* RiboPure™ – Blood Kit (Applied Biosystems). Após essa etapa, o RNA foi tratado com DNase I, a fim de remover qualquer contaminação com DNA genômico. Na sequência, quantificou-se o RNA por meio de leitura no espectrofotômetro Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) nos comprimentos de onda (λ) de 260nm (RNA) e 280 nm (proteína). O grau de pureza da amostra foi avaliado através da relação das leituras 260 e 280 nm, sendo considerados ideais os valores entre 1,8 e 2,0.

Para transcrição reversa do RNA total para cDNA, utilizou-se Super-script III™ Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carllsbad, CA, USA), e o cDNA foi ajustado para a concentração de 20 ng/µL e volume final de 20 µL.

Real-time PCR quantitativo (qRT-PCR) dos genes GPx1 e SePP foi realizado em duplicata para cada amostra no equipamento StepOne Real-Time PCR System utilizando-se Taqman® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) específicos para cada gene. Cada reação continha 4 µL de cDNA, 10 µL de Taqman® Universal Master Mix II (Applied Biosystems, Foster City, CA), 1 µL de 20x Taqman® Gene Expression Assay e 5 µL de água RNase-free em um volume final de 20 µL.

A especificidade da reação qRT-PCR foi demonstrada pela análise da curva de desnaturação (*melting curve*) que mostrou a presença de apenas um pico para todos os produtos da reação de GPx1 e de SePP. O gene de referência utilizado foi a β -actina e para cada placa de análise, incluiu-se uma amostra sem c-DNA que serviu de controle negativo.

A expressão de RNA foi calculada com o método Delta-Delta C_T ($\Delta\Delta C_T$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para tanto, calculou-se o valor de ΔC_T de cada amostra pela subtração dos valores de *threshold cycle* (C_T) do gene controle (β -actina) dos valores de C_T do gene alvo. Após determinação do ΔC_T , a média do ΔC_T das amostras do *baseline* dos genótipos de referência para cada polimorfismo avaliado foi utilizada como normatizadora para cálculo do $\Delta\Delta C_T$, que tem a seguinte fórmula: ΔC_T amostra - ΔC_T (média das amostras do gene de referência). Na sequência, aplicou-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$ que resultou no valor da expressão gênica relativa (*fold change*).

Análises bioquímicas

A atividade da GPx foi avaliada em eritrócitos de acordo com o método de Paglia e Valentine (1967) com o *kit* Ransel 505 (RANDOX Laboratories, Crumlin, UK) adaptado para o uso em analisador bioquímico automático (Liasys® MAS, Rome, Italy).

O malondialdeído (MDA) foi determinado por HPLC de acordo com o método de Hong et al. (2000) em plasma previamente desproteínizado. Para tanto, utilizou-se espectrofotômetro Shimadzu (Kyoto, Japão).

A concentração de selênio no plasma e no eritrócito foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica por geração de hidretos acoplados à cela de quartzo (HAO et al., 1996). Amostras de plasma e de eritrócitos foram preparadas para a análise pela digestão com ácido nítrico 68% (Merck, Darmstadt, Germany) e aquecidas a 150 °C. Após a volatilização do material orgânico, as soluções foram reduzidas de SeVI para SeIV com a adição de ácido clorídrico 1,2 N e aquecimento a 100°C por 2 h. Posteriormente, as amostras foram diluídas em água ultrapura para um volume final de 25 mL. A confiabilidade do método foi confirmada utilizando-se os materiais de referência padrão Seronorm® Trace Elements Serum and Whole Blood (Sero AS, Billingstad, Norway). Todos os reagentes utilizados eram de grau de pureza analítica (Merck).

Análise estatística

Estatística descritiva foi realizada para todos os dados do início do estudo e do pós-tratamento. Os resultados foram expressos com média \pm desvio padrão (dp), e a média das

mudanças do pré e pós-intervenção é apresentada como 95% de intervalo de confiança para cada genótipo.

A distribuição das variáveis foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados do pós-tratamento foram comparados com os dados do início do tratamento com teste t pareado ou teste de Wilcoxon, como mais apropriado. As diferenças dos resultados ao longo do tempo entre os genótipos foram analisadas pelo teste t independente quando os dados eram contínuos, ou alternativamente pelo teste Mann-Whitney U quando as variáveis eram não paramétricas.

As frequências alélicas foram estimadas pelo método de contagem de genes, e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado para todos os genótipos usando-se o teste do Qui-quadrado. Para todas as análises estatísticas, os genótipos homocigoto recessivo e heterocigoto foram agrupados.

Para realização da análise estatística dos dados, utilizou-se o programa SPSS para *Windows*, versão 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). O nível de significância de 95% foi adotado como padrão.

Resultados

Os participantes do estudo tinham idade média de $77,3 \pm 4,27$ anos e 72,2% eram do sexo feminino. A frequência dos genótipos para o polimorfismo Pro198Leu foi de 0,25, 0,50, e 0,25 para Pro/Pro (CC), Pro/Leu (CT), e Leu/Leu (CT), respectivamente, e a frequência do alelo T foi de 0,5 neste grupo. Para o polimorfismo rs7579, a frequência genotípica foi de 0,59, 0,35 e 0,05 para GG, GA e GG, respectivamente, e a frequência do alelo variante foi de 0,77. Em relação à frequência dos genótipos para rs3877899, Ala/Ala (GG) foi de 0,669 e Ala/Thr (GA) foi de 0,297, e não foram encontrados homocigotos variantes. A frequência do alelo A foi de 0,182. Essas frequências encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Na Tabela 10, é possível observar que o selênio no plasma e no eritrócito aumentou significativamente depois da intervenção em todos os genótipos. A atividade da enzima GPx aumentou em todos os genótipos da GPx1 e também nos homocigotos dominantes do rs7579 e nos genótipos variantes de rs3877899. O aumento não significativo no MDA foi observado em todos os genótipos, e as diferenças nos parâmetros avaliados entre os dois períodos de avaliação não distinguiram entre os genótipos.

Tabela 10: Selênio no plasma e no eritrócito, atividade da GPx e MDA no início do estudo e após seis meses de intervenção de acordo com os genótipos para os polimorfismos Pro198Leu, rs7579 e rs3877899

		Início±dp	6 meses±dp	Mudança (95% IC)	Valor de P para comparação entre os grupos ^a
Selênio plasma (µg/L)					
Pro198Leu	CC	49,90±10,31	246,19±53,99	196,29* (110,40; 282,18)	0,140
	CT+TT	59,86±21,56	315,92±75,80	256,06* (197,37; 314,75)	
rs7579	GG	59,62±21,32	277,79±62,09	218,16* (174,44; 261,87)	0,405
	GA+AA	50,32±11,73	312,93±98,88	262,60* (121,58; 406,62)	
rs3877899	GG	52,77±11,97	299,91±68,68	247,13* (186,35; 307,92)	0,423
	GA+AA	62,31±27,51	274,21±92,40	211,91*(107,48; 316,33)	
Selênio eritrócito (µg/L)					
Pro198Leu	CC	65,11±13,62	519,23±239,80	454,12* (84,03; 824,22)	0,290
	CT+TT	56,37±24,20	606,18±151,23	549,81* (429,04; 670,57)	
rs7579	GG	58,17±22,53	536,64±116,86	478,47* (379,64; 577,30)	0,372
	GA+AA	61,96±19,83	640,93±270,41	578,97* (174,67; 983,27)	
rs3877899	GG	57,14±16,96	607,44±177,57	550,29* (397,63; 702,96)	0,416
	GA+AA	63,75±28,43	517,02±199,14	453,27* (162,11; 744,43)	
Atividade de GPx (U/g Hb)					
Pro198Leu	CC	54,00±10,29	67,67±8,93	13,66* (4,67; 22,65)	0,555
	CT+TT	33,15±12,15	54,91±24,73	21,76* (-9,38; 52,91)	
rs7579	GG	36,39±15,08	64,92±20,30	28,53* (6,03; 51,03)	0,122
	GA+AA	48,33±13,94	50,15±20,79	1,81 (-36,08; 39,72)	
rs3877899	GG	39,64±16,26	62,33±24,76	22,68 (-8,15; 53,52)	0,440
	GA+AA	42,64±15,28	54,68±12,88	12,04* (2,45; 21,64)	
MDA (µmol/L)					
Pro198Leu	CC	0,38±0,04	0,47±0,14	0,09 (-0,09; 0,28)	0,926
	CT+TT	0,44±0,05	0,54±0,12	0,10 (-0,06; 0,26)	
rs7579	GG	0,42±0,03	0,51±0,13	0,09 (-0,39; 0,21)	0,746
	GA+AA	0,41±0,08	0,53±0,13	0,12 (-0,15; 0,39)	
rs3877899	GG	0,412±0,06	0,50±0,14	0,09 (-0,05; 0,22)	0,597
	GA+AA	0,423±0,02	0,55±0,07	0,13 (-0,09; 0,35)	

^a: Teste t

*: Significativamente diferente do *baseline*; P< 0,05 (Teste t).

A: adenina

C: citosina

G: guanina
 T: timina
 dp: desvio padrão
 GPx: glutathiona peroxidase
 GPx1: glutathiona peroxidase 1
 MDA: malondialdeído

A expressão da GPx1 reduziu após a intervenção com castanha-do-brasil em todos os genótipos, exceto dentre o grupo CC do Pro198Leu. Do mesmo modo, a expressão de SePP também reduziu após os seis meses de tratamento, e tal queda foi mais relevante dentre os genótipos variantes do Pro198Leu e do rs7579, e nos homozigotos dominantes do polimorfismo rs3877899 (Figura 2).

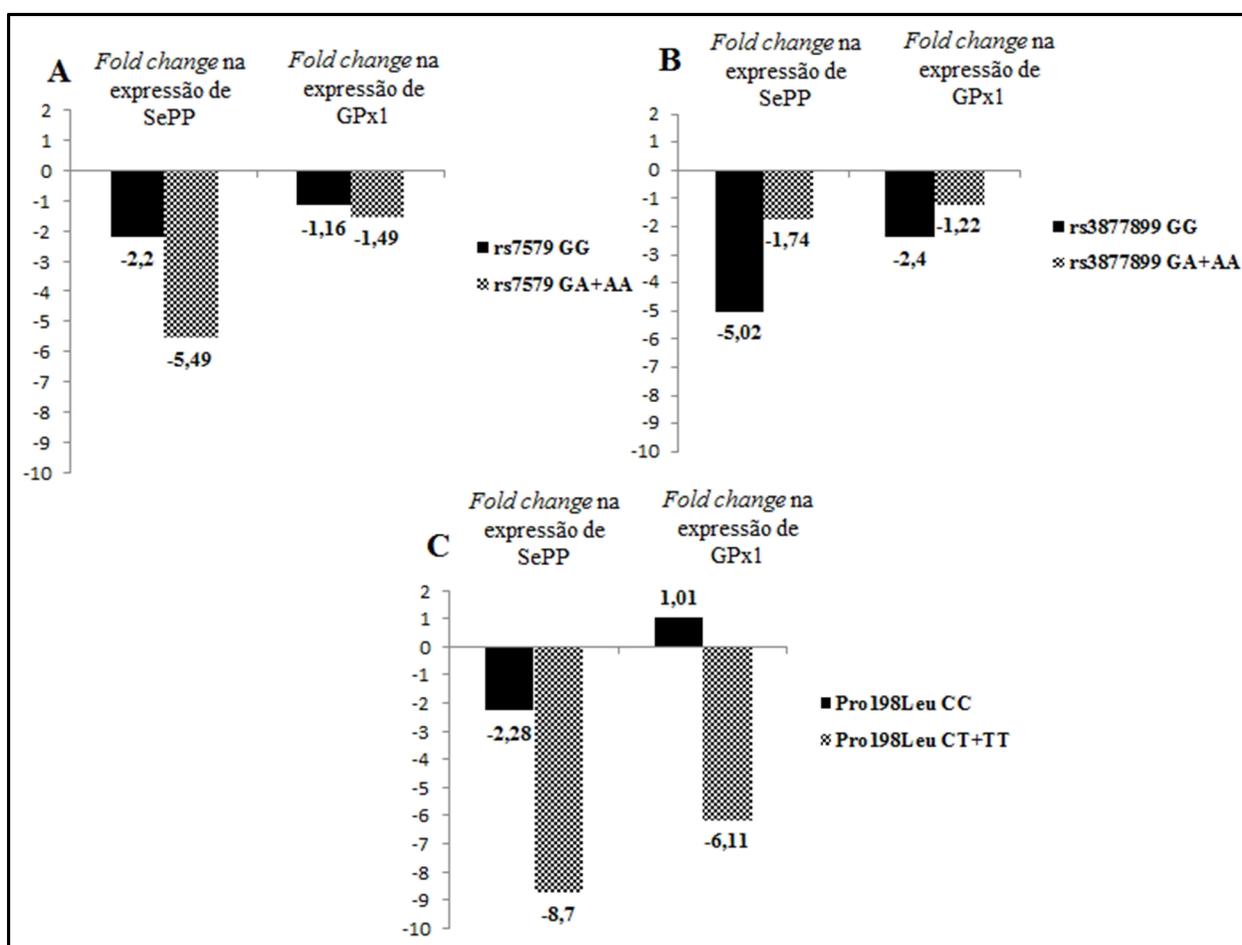


Figura 2: Efeitos com consumo de castanha-do-brasil durante seis meses na expressão de SePP e GPx1 de acordo com A) genótipos de rs7579, B) genótipos de rs3877899, C) genótipos de Pro198Leu

O cálculo de *fold change* para as expressões de SePP e GPx1 foi relativo ao valor do *baseline* apresentado pelos genótipos de referência.

Discussão

O estresse oxidativo desempenha papel central no declínio cognitivo e está associado ao aumento do risco para demência. Desse modo, o aumento do consumo de alimentos ricos em antioxidantes se apresenta como uma estratégia para melhorar a resposta antioxidante. Assim, este trabalho mostrou que o consumo de apenas uma castanha-do-brasil por dia, durante seis meses, foi suficiente para recuperar o estado nutricional de selênio, corroborando outros trabalhos (STOCKLER-PINTO et al., 2010; COMINETTI et al., 2012). Essa oleaginosa é a maior fonte alimentar de selênio, e apresenta o mineral principalmente na forma de selenometionina, que tem alta biodisponibilidade (KROBEL et al., 2003; BODÓ et al., 2003; DA SILVA et al., 2013).

Aumentar o consumo de selênio é essencial para síntese de selenoproteínas porque esse sistema segue uma hierarquia em algumas selenoproteínas que respondem rapidamente à deficiência de selênio com diminuição da sua síntese, enquanto outras se mantêm estáveis sob deficiência moderada e apenas têm síntese reduzida diante de prolongada e notável depleção. Porém, SNPs em genes de selenoproteínas podem alterar seu metabolismo e a resposta frente à mudança do consumo de selênio (HESKETH; MÉPLAN, 2011). De acordo com essas circunstâncias, observou-se neste trabalho que os polimorfismos Pro198Leu, rs7579 e rs3877899 não tiveram impacto na resposta ao consumo de selênio em relação aos níveis plasmáticos e eritrocitários de selênio, corroborando os resultados de Cominetti et al. (2012). Os resultados deste trabalho contrastam daqueles observados no estudo SELGEN (MÉPLAN et al., 2007), em que o índice de massa corporal (IMC) interagiu com o genótipo de rs3877899 após a suplementação com 100 µg de selenito de sódio, visto que os indivíduos obesos (IMC>30) com genótipo homozigoto dominante apresentaram maiores níveis de selênio no plasma após a intervenção. Na população aqui estudada, apenas um indivíduo apresentou IMC>30, o que impediu a análise da associação entre os genótipos e o IMC. Em relação ao polimorfismo rs7579, Méplan et al. (2007) reportaram que a presença do alelo variante se associou com maiores níveis de selênio antes e após suplementação, diferindo dos resultados encontrados neste estudo.

Acerca dos parâmetros antioxidantes, verificou-se que, embora todos os genótipos tenham apresentado aumento da atividade de GPx após a intervenção, isso não foi significativo para o genótipo dominante do rs7579 e para o variante do rs3877899. Méplan et al. (2007)

observaram dados diferentes, visto que o genótipo GG para dois polimorfismos respondeu à suplementação de maneira mais significativa quando comparado aos genótipos com alelo variante. O MDA não mudou após o consumo da castanha em nenhum dos genótipos, confirmando achados de outros trabalhos que reportaram que os polimorfismos Pro198Leu, rs7579 e rs3877899 não estão associados com parâmetros de estresse oxidativo como 8-isoprostano F2a, 8-oxo-7,8-diidro-2-deoxiguanosina (AL-ALEM et al., 2011) MDA (CHARNIOT et al., 2011; TANAKA et al., 2012), LDL oxidada e proteínas carboniladas (CHARNIOT et al., 2011). Assim, os dados deste estudo reforçam a hipótese de que esses SNPs não influenciam o sistema antioxidante a ponto de mudar parâmetros de estresse oxidativo como o MDA.

A mudança na expressão de GPx1 e SePP após a intervenção não foi a mesma entre os genótipos. Indivíduos com alelo variante para Pro198Leu apresentaram redução da expressão da GPx1, enquanto carreadores do genótipo CC tiveram um aumento. Além disso, percebeu-se uma redução na expressão de SePP após os seis meses em todos os genótipos, porém de maneira mais importante nos genótipos variantes para Pro198Leu e rs7579 e no genótipo GG para rs3877899.

Os dados aqui apresentados são diferentes daqueles mostrados em outros trabalhos em que a suplementação com selênio resultou em aumento da expressão de GPx1 (HU et al., 2011; JEROME-MORAES et al., 2013; ZHAO et al., 2013; JOTTY et al., 2013; MASEKO et al., 2014) e de SePP (MÉPLAN, 2009; HU et al., 2011; JOTTY et al., 2013; MASEKO et al., 2014). Porém, salienta-se que grande parte desses estudos avaliaram a expressão gênica em células como hepatócitos e enterócitos, sendo realizados predominantemente em animais e em culturas de células. Estudos com seres humanos ainda não são conclusivos ao estabelecer relação entre expressão gênica de selenoproteínas mensurada pelo RNAm em leucócitos ou no sangue total e a concentração sérica de selênio e de selenoproteínas (RESZKA et al., 2012), sugerindo que mecanismos ainda desconhecidos interagem no processo de síntese dessas proteínas dependentes de selênio. Tal processo compõe um sistema abrangente e interligado e, desse modo, polimorfismos genéticos podem gerar mudança no funcionamento não somente da própria proteína, como também em outras selenoproteínas por alterar os mecanismos associados à síntese dessas proteínas (HESKETH; MÉPLAN, 2011).

A SePP é uma proteína com 381 aminoácidos dos quais dez são resíduos de selenocisteína onde o selênio é incorporado. Existem diversas isoformas de SePP e, embora a

literatura ainda não seja conclusiva quanto à variedade e aos tamanhos (Méplan et al., 2009;), Ballihaut et al. (2012) reportam a existência de 3 isoformas, das quais apenas uma apresenta selênio incorporado. Méplan et al. (2009) sugerem que os polimorfismos rs7579 e rs3877899 modulam a proporção entre as isoformas de SePP no plasma, e isso poderia então causar uma alteração no fornecimento de selênio para a síntese de outras selenoproteínas. Além disso, como a SePP é o maior transportador de selênio, a redução da sua expressão pode acarretar em menor disponibilidade de selênio para outras selenoproteínas, como a GPx1 (HILL et al., 2012).

Entretanto, estudos mostram que o polimorfismo Pro198Leu pode afetar a expressão e a atividade da GPx1 em resposta ao selênio, sendo o alelo Leu menos responsivo que o alelo Pro à presença do mineral (JABLONSKA et al., 2009; , COMINETTI et al., 2011; RAVN-HAREN et al., 2006; HU e DIAMOND, 2003). A GPx1 é alvo de regulação transcricional, pós-transcricional, traducional e também pós-traducional, que modulam, em alguns casos de maneira independente, sua expressão e a atividade. Nesse contexto, o suprimento de selênio é fator primordial para modular a tradução e a atividade da enzima, já o estresse oxidativo parece aumentar a transcrição de GPx1, embora estudos *in vitro* sugiram que a presença de peróxidos de hidrogênio pode oxidar e inativar a selenocisteína presente no seu sítio ativo. A nucleolína, proteína ligadora de ácidos nucleicos, se relaciona com aumento da estabilidade do RNA por se ligar à região 3'UTR no gene da GPx, enquanto que a homocisteína parece reduzir sua expressão (LUBOS et al., 2011).

Embora o trabalho tenha sido feito de maneira bem controlada, a presença de uma amostra pequena impede que mais análises sejam feitas, pois não permite a estratificação por gênero nem a avaliação conjunta entre os genótipos dos três polimorfismos avaliados. O fato de não ter-se dosado a concentração sérica de SePP também se apresenta como uma limitação do estudo.

Conclusões

A deficiência de selênio está associada à redução da capacidade cognitiva e à demência. Assim, o consumo de castanha-do-brasil é uma importante estratégia para melhorar o estado nutricional relativo ao selênio e também para aumentar a atividade da GPx. A partir dos resultados deste trabalho, observa-se que os genótipos para Pro198Leu, rs7579 e rs3877899 não

interferem na resposta frente ao consumo de castanha-do-brasil quanto às concentrações de selênio no plasma e no eritrócito, bem como nos níveis plasmáticos de MDA. Entretanto, observa-se que a expressão da GPx parece sofrer influência do polimorfismo Pro198Leu, embora isso não tenha repercutido em diferença na atividade da enzima entre os genótipos. Do mesmo modo, verifica-se que os polimorfismos rs7579 e rs3877899 modulam a expressão gênica da SePP, e por isso sugere-se que mais estudos sejam realizados a fim de se avaliar se o aumento do aporte de selênio por meio do consumo de castanha-do-brasil altera a proporção entre as isoformas de SePP e se isso é dependente do genótipo.

Referências

- AL-ALEM, U. et al. Associations between functional polymorphisms in antioxidant defense genes and urinary oxidative stress biomarkers in healthy, premenopausal women. **Genes Nutr.**, v. 7, p. 191-195, 2012.
- AL-TAIE, O. H. et al. Expression profiling and genetic alterations of the selenoproteins GI-GPx and SePP in colorectal carcinogenesis. **Nutr. Cancer**, v. 48, p. 6-14, 2004.
- ALZHEIMER'S DISEASE INTERNATIONAL: *World Alzheimer Report 2009*. London: Alzheimer's Disease International,; 2009.
- BALLIHAUT, G, et al. Multiple forms of selenoprotein P in a candidate human plasma standard reference material. *Metallomics*, v. 4, p.533-538, 2012.
- BENTON, D. Selenium Intake, Mood and Other Aspects of Psychological Functioning. **Nutritional Neuroscience**, v. 5, n. 6, p. 363–374, 2002.
- BERR. C. et al. Cognitive decline is associated with systemic oxidative stress: the EVA study. Etude du Vieillissement Artériel. **J Am Geriatr Soc.**, v. 48, n. 10, p. 1285-1291, 2000.
- BODÓ, E. T. et al. Preparation, homogeneity and stability studies of a candidate LRM for Se speciation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 377, n. 1, p. 32-38. 2003.
- BRENNEISEN, P. et al. Selenium, oxidative stress, and health aspects. **Mol Aspects Med.**, v. 26, p. 256-267, 2005.
- CARDOSO, B. R. et al. Nutritional status of selenium in Alzheimer's disease patients. **British Journal of Nutrition**, v. 103, p. 803-806, 2010.
- CARDOSO, B. R. et al. Glutathione peroxidase 1 Pro198Leu polymorphism in Brazilian Alzheimer's disease patients: relations to the enzyme activity and to selenium status. **J Nutrigenet Nutrigenomics**. v. 5, n. 2, p. 72-80, 2012.
- CHARNIOT, J. C. et al. Manganese superoxide dismutase dimorphism relationship with severity and prognosis in cardiogenic shock due to dilated cardiomyopathy. **Free Radical Research**, v. 45, n. 4, April, p. 379-388, 2011.
- CHEN, J.; BERRY, M. J. Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. **Neurochem**. v. 86, p. 1-12, 2003.
- COMINETTI, C. et al. Associations between glutathione peroxidase-1 Pro198Leu polymorphism, selenium status, and DNA damage levels in obese women after consumption of Brazil nuts. **Nutrition**, v. 9, p.891-896, 2011.

COMINETTI, C. et al. Brazilian nut consumption improves selenium status and glutathione peroxidase activity and reduces atherogenic risk in obese women. **Nutrition Research**, v. 32, p. 403-407, 2012.

CUI, K. et al. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 28, p. 771-799, 2004.

DA SILVA, E. G. et al. Speciation analysis of selenium in plankton, Brazil nut and human urine samples by HPLC–ICP-MS. **Talanta**, v. 110, p. 53-57, 2013.

DRUKARCH, E. B. et al. Astrocyte-mediated enhancement of neuronal survival is abolished by glutathione deficiency. **Brain Res**. v. 770, p. 123-130, 1997.

FAIRWEATHER-TAIT, S. J. et al. Selenium in Human Health and Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14, n. 7, 2011.

GAO, S. et al. Selenium Level and Cognitive Function in Rural Elderly Chinese. **Am J Epidemiol.**, v. 165, n.8, p. 955-965, 2007.

HAO, D. et al. Determination of serum selenium by hydride generation flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 43, p. 595-600, 1996.

HAWKES, W. C.; ALKAN Z. Regulation of Redox Signaling by Selenoproteins. **Biol Trace Elem Res.**, v. 134, p. 235-251, 2010.

HESKETH, J., MÉPLAN, C. Transcriptomics and functional genetic polymorphisms as biomarkers of micronutrient function: focus on selenium as an exemplar. **Proc Nutr Soc.**, v. 3, p. 1-9, 2011.

HILL, K. E. et al. Production of Selenoprotein P (Sepp1) by Hepatocytes Is Central to Selenium Homeostasis. **J Biol Chem.**, v. 287, n. 48. p. 40414–40424, 2012.

HONG, Y. L. et al. Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. **Clin. Biochem.**, v. 33, pp. 619-625, 2000.

HU, Y, et al. The influence of selenium-enriched milk proteins and selenium yeast on plasma selenium levels and rectal selenoprotein gene expression in human subjects. **British Journal of Nutrition**, v. 106, p. 572-582, 2011.

HU, Y. J.; DIAMOND, A. M. Role of glutathione peroxidase 1 in breast cancer: loss of heterozygosity and allelic differences in the response to selenium. **Cancer Res.**, v. 63, p. 3347-3351, 2003.

JABLONSKA, E. et al. Association between GPx1 Pro198Leu polymorphism, GPx1 activity and plasma selenium concentration in humans. **Eur J Clin Nutr**, v. 48, p. 383-6, 2009.

JEROME-MORAES, A, et al. The effects of selenium and the GPx-1 selenoprotein on the phosphorylation of H2AX. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1830, p. 3399-3406, p. 2013.

JOTTY, K. et al. Selenium dietary supplementation as a mechanism to restore hepatic selenoprotein regulation in rat pups exposed to alcohol. **Alcohol**, v. 47, p. 545-552, 2013.

KARUNASINGHE, N. et al. Serum selenium and single-nucleotide polymorphisms in genes for selenoproteins: relationship to markers of oxidative stress in men from Auckland, New Zealand. **Genes Nutr.**, v. 7, p. 179-190, 2012.

LOPEZ, O. L. et al. Prevalence and classification of mild cognitive impairment in the Cardiovascular Health Study Cognition Study: part 1. **Arch Neurol.**, v. 60, n. 10, p. 1385-9, 2003.

LUBOS, E, et al. Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. **Antioxidants & Redox signaling**, v. 15, n. 7, 2011.

MANGIALASCHE, F. et al. Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Ageing Research Reviews**, v. 8, p. 285-305, 2009.

MASEKO T, et al. Selenium-enriched *Agaricus bisporus* increases expression and activity of glutathione peroxidase-1 and expression of glutathione peroxidase-2 in rat colon. **Food Chemistry**, v. 146, p. 327-333, 2014.

MÉPLAN, C. et al. Genetic polymorphisms in the human selenoprotein P gene determine the response of selenoprotein markers to selenium supplementation in a gender - specific manner (the SELGEN study). **The FASEB Journal**, v. 21, n. 12, p. 3063-74, 2007.

MÉPLAN, C. et al. Relative Abundance of Selenoprotein P Isoforms in Human Plasma Depends on Genotype, Se Intake, and Cancer Status. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 11, 2009.

MÉPLAN C, PAGMANTIDIS V, HESKETH JE. Advances in Selenoprotein Expression: Patterns and Individual Variations. In: BRIGÉLIUS-FLOHÉ R, JOOST HG. Nutritional Genomics: Impact in Health and Disease. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 132-158, 2006.

NAKAYAMA, A. et al. All regions of mouse brain are dependent on selenoprotein P for maintenance of selenium. **J Nutr.**, v. 137, n. 3, p. 690-693, 2007.

PADUDARIU, M. et al. Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 469, p. 6-10, 2010.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase **J. Lab. Clin. Med.**, v. 70, p. 158-169, 1967.

PAZ-Y-MIÑO, C. et al. Genetic Polymorphisms in Apolipoprotein E and Glutathione Peroxidase 1 Genes in the Ecuadorian Population Affected With Alzheimer Disease. **Am J Med Sci**, v. 340, n. 5, p. 373-377, 2010.

RAVN-HAREN, G. et al. 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.

RESZKA, E. et al. Relevance of selenoprotein transcripts for selenium status in humans. **Genes Nutr.**, v. 7, p. 127-137, 2012.

SHINKAI, T. et al. Genetic association analysis of the glutathione peroxidase (GPX1) gene polymorphism (Pro197Leu) with tardive dyskinesia. **Psychiatry Res.**, v. 141, p. 123-128, 2006.

STOCKLER-PINTO, M. B. et al. Effect of Brazil nut supplementation on the blood levels of selenium and glutathione peroxidase in hemodialysis patients. **Nutrition**, v. 26, p. 1065-1069, 2010.

TAKATA, Y. et al. Genetic Variation in GPX1s Associated with GPX1 Activity in a Comprehensive Analysis of Genetic Variations in Selenoenzyme Genes and Their Activity and Oxidative Stress in Humans. **J. Nutr.** v. 142, p. 419-426, 2012.

WINBLAD, B. et al. Mild cognitive impairment – beyond controversies, towards a consensus: report of the International Working Group on Mild Cognitive Impairment. **J Intern Med.** v. 256, n. 3, September, p. 240-6, 2004.

ZHANG, S. et al. Selenoproteins and the aging brain. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 131, p. 253-260, 2010.

ZHAO, X. et al. Protective effects of selenium on oxidative damage and oxidative stress related gene expression in rat liver under chronic poisoning of arsenic. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 1-7, 2013.

APÊNDICE I

QUESTIONÁRIO DE SELEÇÃO DA AMOSTRA **CÓDIGO:**

Identificação do paciente:

Nome completo do paciente: _____

Nome completo do responsável: _____

Data de Nascimento: ___/___/_____ Idade: _____ anos

Sexo: () M () F

Escolaridade: _____

Profissão: _____

Data de diagnóstico de Declínio Cognitivo Leve: _____

História clínica:

I. Antecedentes familiares:

Diabetes () Hipertensão () Câncer () Alzheimer ()

II. Antecedentes clínicos:

Tabagista () Alcoolista () Depressão ()

Doenças cardiovasculares () Infarto () Traumatismo craniano ()

III. Presença de doenças: Sim () Não ()

Diabetes () Hipertensão () Câncer () Artrite reumatóide ()

Inflamações () Infecções () Febre () Diarréia ()

Outros: _____

IV. Uso de medicamentos: Sim () Não ()

Quais: _____

V. Uso de suplemento vitamínico-mineral: Sim () Não ()

Qual? _____

Observações:

APÊNDICE II



Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

1. Informações do Sujeito da Pesquisa

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

2. Informações do Responsável Legal

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

3. Título do Projeto de Pesquisa: Efeitos da suplementação com castanha-do-brasil (<i>Bertholetia excelsa</i> H.B.K.) sobre o estresse oxidativo em pacientes com declínio cognitivo leve e a relação com variações genéticas em genes de selenoproteínas	
4. Duração da Pesquisa: 21 meses	
5. Nome do pesquisador responsável: Sílvia Maria Franciscato Cozzolino	
Cargo/ Função: Prof. Titular do Programa PG Ciência dos Alimentos	Nº do Registro do Conselho Regional: CRN3-0631
Instituição: Universidade de São Paulo	

6.

Caro (a) Senhor(a), gostaríamos de convidá-lo para participar como voluntário(a) de uma pesquisa, cujo título é "Efeitos da suplementação com castanha-do-brasil (*Bertholetia excelsa* H.B.K.) sobre o estresse oxidativo e em pacientes com declínio cognitivo leve e a relação com variações genéticas em genes de selenoproteínas". Este estudo está sendo conduzido pela Prof. e pesquisadora Sílvia Maria Franciscato Cozzolino, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP). Participarão como colaboradores deste projeto a aluna de doutorado em Ciência dos Alimentos - USP, Bárbara Rita Cardoso e o Prof e Chefe do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina – USP, Wilson Jacob Filho.

Os pacientes com declínio cognitivo apresentam muitas alterações no organismo que afetam seu equilíbrio e o bem-estar. O selênio é um nutriente que pode contribuir para melhorar as condições desta doença. Alguns estudos mostram que certas alterações no código genético,

chamadas de polimorfismos, também podem levar ao aumento de risco para o declínio cognitivo. Assim, este estudo se propõe a avaliar o selênio, e também um polimorfismo no gene da enzima chamada glutathione peroxidase 1, que combate os radicais livres, e dois polimorfismos no gene da selenoproteína P, que ajuda no transporte de selênio, com a intenção de estabelecer algum possível risco para esta doença.

Este estudo contará com a participação de 80 pacientes com declínio cognitivo leve. Esses participantes serão divididos em 2 grupos, e um deles receberá 1 castanha-do-brasil por dia, durante 12 meses. Ambos os grupos serão acompanhados pelos pesquisadores durante os 12 meses, e serão submetidos aos mesmos testes e avaliações. Serão coletadas 3 amostras de sangue com 15mL cada, sendo uma no início do estudo, outra na metade do acompanhamento, ou seja, após 6 meses de estudo e, por fim, a terceira coleta será após a finalização do estudo, ou seja, após os 12 meses de acompanhamento. Esse sangue será utilizado para avaliar o selênio, os polimorfismos e também o estresse oxidativo. Além disso, através de um registro alimentar de 3 dias, realizado nas 3 fases do estudo, será avaliado o consumo alimentar dos pacientes. Nas 3 etapas do estudo, os pacientes também terão a cognição avaliada por meio de testes. As castanhas serão fornecidas pelos pesquisadores, e todos participantes receberão todas as orientações necessárias para a realização da pesquisa. Este estudo tem risco mínimo. A coleta de sangue será realizada no Hospital das Clínicas (HCFMUSP) por um técnico habilitado e, durante este procedimento, poderá ocorrer desconforto, devido à dor da picada da agulha, que logo passa, e também o aparecimento de mancha roxa (serão utilizadas seringas e agulhas descartáveis e esterilizadas). Todos os participantes terão acesso aos resultados das análises que serão feitas, bem como informações sobre o andamento da pesquisa, procedimentos utilizados, riscos e benefícios relacionados a esta pesquisa, em qualquer fase do estudo, a fim de esclarecer eventuais dúvidas.

Os participantes têm a liberdade para deixar de participar da pesquisa em qualquer momento que lhes seja conveniente, sem sofrer qualquer ônus, constrangimento ou prejuízo à continuidade da assistência.

Os resultados obtidos na pesquisa serão publicados em revistas científicas e congressos, mas os nomes e a privacidade de cada participante serão preservados.

Não haverá ressarcimento das despesas decorrentes da participação na pesquisa, nem recompensa financeira relacionada à participação do estudo.

As amostras de sangue serão armazenadas em banco de materiais biológicos no Laboratório de Nutrição-Minerais, da FCF/USP, sob a responsabilidade da Profa Silvia Maria Franciscato Cozzolino. Desta maneira, as amostras poderão ser utilizadas para pesquisa futura. Caso isto ocorra, o(a) senhor(a) será consultado e o novo projeto de pesquisa será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa.

Você autoriza o armazenamento do seu sangue para utilização em pesquisas futuras?

() Sim () Não

7. Nomes, endereços e telefones dos responsáveis pelo acompanhamento da pesquisa para contato em caso de intercorrências clínicas e reações adversas.

Bárbara Rita Cardoso

(Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos – Nutrição Experimental – FCF/ USP)

Dra. Silvia Maria Franciscato Cozzolino

(Professora Titular do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental FCF/USP)

Dr. Wilson Jacob Filho

(Chefe do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina – USP)

Faculdade de Ciências Farmacêuticas/FCF

Av. Lineu Prestes, 580 – Bloco 14

Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira”

CEP 05508-000 – São Paulo – SP

Telefones:

(11) 3091-3625 (Laboratório de Nutrição-Minerais)

(11) 8353 8223 (Bárbara)

8. Observações complementares:

9. Consentimento Pós-Esclarecido:

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

São Paulo, de de .

Assinatura do sujeito de pesquisa

Ou responsável legal

Assinatura do pesquisador responsável

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

APÊNDICE III

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

Efeitos da suplementação com castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) sobre o estresse oxidativo em pacientes com declínio cognitivo leve e a relação com variações genéticas em genes de selenoproteínas

Nome do participante: _____

Nome do responsável: _____

Telefone do responsável: _____

REGISTRO ALIMENTAR

Solicitamos que neste bloco você anote tudo o que comer e beber durante três dias (SENDO DOIS DIAS DE SEMANA E UM DIA DE FINAL DE SEMANA), procurando seguir as seguintes instruções:

1. Registre o dia da semana, horário e local para cada momento em que o paciente for comer;
2. Anote **TODOS OS ALIMENTOS** e **TODAS AS BEBIDAS** que consumir;
3. Procure fazer o registro logo após o consumo do alimento, para que não haja esquecimento;
4. Coloque todos os ingredientes das preparações consumidas, bem como aquilo que for adicionado após o preparo (ex.: molho de mostarda, óleo para salada);
5. Registre as formas de preparo (ex.: assado, frito, ensopado), e as medidas caseiras (ex.: 2 colheres de sopa de arroz branco cozido);
6. Lembre-se, a pesquisa é anônima e tudo o que for registrado permanecerá sob sigilo.
7. Caso você tenha alguma dúvida, entre em contato pelos telefones: 3564 3468/ 8353 8223 (Bárbara).

ANEXO I



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer CEP/FCF/54/2011

Protocolo CEP/FCF/568

CAAE: 0004.0.018.015-11

I – Identificação:

Projeto de Pesquisa:	Efeitos da suplementação com castanha-do-brasil (<i>Bertholetia excelsa</i> h.b.k.) sobre o estresse oxidativo e o desenvolvimento de doença de alzheimer em pacientes com declínio cognitivo leve e a relação com variações genéticas em genes de selenoproteínas
Pesquisador Responsável:	Profa. Dra. Sílvia Maria Franciscato Cozzolino
Aluna de pós-graduação	Bárbara Rita Cardoso
Instituição:	FCF-USP
Área Temática Especial:	Genética Humana

II - Sumário Geral do Protocolo:

O envelhecimento da população é um fenômeno mundial que resulta em uma transformação no perfil de saúde da população, com aumento na prevalência das doenças demenciais. A oxidação celular, proveniente do desequilíbrio da homeostase, parece ser o primeiro passo que antecede o declínio cognitivo leve. Visto que o estresse oxidativo está intimamente relacionado com a progressão da demência, este se apresenta como um possível alvo terapêutico a fim de reduzir a conversão do declínio cognitivo leve para Doença de Alzheimer. No mesmo sentido, estudos mostram o papel antioxidante do selênio, mineral que atua por meio das selenoproteínas, com destaque para a família de enzimas antioxidantes glutatona peroxidase e a selenoproteína responsável pelo transporte de selênio, a selenoproteína P. Entretanto, diferentes genótipos dos genes que codificam essas selenoproteínas podem refletir em diferentes respostas frente a intervenções alimentares. Assim, este trabalho tem como objetivo verificar os efeitos da suplementação com castanha-do-brasil sobre o estresse oxidativo em pacientes com declínio cognitivo leve e verificar sua relação com os polimorfismos rs1050450 (Pro198Leu) no gene da glutatona peroxidase 1 (GPx1), rs3877899 (Ala234Thr) e rs7579 (r25191G/A) no gene da selenoproteína P.

Objetivo geral do projeto:

Avaliar os efeitos da suplementação com castanha-do-brasil sobre o estresse oxidativo em indivíduos com declínio cognitivo leve e verificar sua influência sobre o risco para a conversão à Doença de Alzheimer, bem como sua relação com polimorfismos em genes que codificam a selenoproteína P e a glutatona peroxidase 1.

Objetivos específicos:

- Avaliar os níveis de estresse oxidativo dos participantes com declínio cognitivo leve;
- Suplementar um grupo de indivíduos com declínio cognitivo leve com castanha-do-brasil;
- Avaliar o estado nutricional relativo ao selênio dos participantes do estudo, incluindo sua concentração no plasma e nos eritrócitos, a concentração plasmática de selenoproteína P, e a atividade eritrocitária da glutatona peroxidase;



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
 FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS
 Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

- Avaliar o consumo alimentar dos participantes quanto à energia, macronutrientes e selênio;
- Avaliar a composição centesimal, bem como o teor de selênio, das castanhas utilizadas para suplementação;
- Genotipar os participantes quanto à presença do polimorfismo rs1050450 no gene da glutathiona peroxidase 1, bem como dos polimorfismos rs3877899 e rs7579 no gene da selenoproteína P;
- Verificar se o polimorfismo rs1050450 no gene da glutathiona peroxidase 1, e os polimorfismos rs3877899 e rs7579 no gene da selenoproteína P influenciam as concentrações de selênio e de selenoproteína P, a atividade da glutathiona peroxidase e a resposta à suplementação nos participantes.

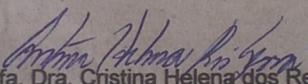
Tipo de estudo: caso controle

III – Situação do protocolo: APROVADO em reunião de 25/04/2011.

O pesquisador deverá:

- Comunicar ao CEP:
 - A ocorrência de efeitos colaterais e ou de reações não esperadas;
 - Eventuais modificações no projeto aguardando a apreciação e aprovação do CEP;
 - A interrupção do projeto;
- Apresentar relatório parcial em julho/2012 e relatório final em dezembro/2013.

São Paulo, 26 de abril de 2011.


 Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra
 Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
 CEP/FCF/USP