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

A suplementação de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 com castanha-do-brasil, pode alterar o estado nutricional relativo ao selênio, o grau de inflamação e a microbiota intestinal?

Luciane Luca de Alencar

Tese para obtenção do Título de DOUTOR
Orientadora: Profa. Tit. Silvia M. F. Cozzolino
Co-orientador: Prof. Dr Christian Hoffmann

SÃO PAULO
2019

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

A suplementação de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 com castanha-do-brasil, pode alterar o estado nutricional relativo ao selênio, o grau de inflamação e a microbiota intestinal?

Luciane Luca de Alencar

Versão Corrigida

Tese para obtenção do Título de DOUTOR
Orientadora: Profa. Tit. Silvia M. F. Cozzolino
Co-orientador: Prof. Dr Christian Hoffmann

SÃO PAULO
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

A368s

Alencar, Luciane Luca de
A suplementação de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 com castanha-do-brasil, pode alterar o estado nutricional relativo ao selênio, o grau de inflamação e a microbiota intestinal? / Luciane Luca de Alencar. - São Paulo, 2019.
129 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Cozzolino, Silvia Maria Franciscato
Coorientador: Hoffmann, Christian

1. castanha-do-brasil. 2. selênio. 3. microbiota . 4. diabetes mellitus tipo 2. 5. inflamação. I. T. II. Cozzolino, Silvia Maria Franciscato , orientador. III. Hoffmann, Christian, coorientador.

Luciane Luca de Alencar

A suplementação de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 com castanha-do-brasil, pode alterar o estado nutricional relativo ao selênio, o grau de inflamação e a microbiota intestinal?

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Profa Tit. Silvia Maria Franciscato Cozzolino
Orientadora / Presidente

_____
1º examinador

_____
2º examinador

_____
3º examinador

São Paulo, 10 de julho de 2019

À Deus, por Seu amor tão grande, tão forte, tão suave e sem fim
Por sua presença constante, por sempre me conduzir.

Ao meu maior tesouro:
Le, Rafa, Rique e Mali.
Vocês dão cor e sentido a minha vida e
fazem dela a mais maravilhosa aventura.
Obrigada por serem tão perfeitos
Amor sem fim ...

Ao meu amor, amigo, companheiro
Fernando, você torna tudo mais simples,
seguro e possível.
Amor sem fim ...

*Aos **participantes** deste estudo pela colaboração,*
dedicação e envolvimento com a pesquisa.

A minha orientadora, profa Silvia Maria Franciscato Cozzolino, pela oportunidade e pela confiança depositada em mim. Por todo carinho, por compartilhar seus conhecimentos e suas experiências, tão importantes para mim e para o meu aprimoramento. Gratidão sem fim!

Ao meu co-orientador Prof Christian Hoffmann, pela orientação tão oportuna, por compartilhar seus conhecimentos, pelas dicas, ideias, por todas e por cada uma das sabatinas. Muito obrigada, pela enorme contribuição que possibilitou o andamento e a realização desse trabalho. Gratidão sem fim!

Ao doutor Simão Augusto Lottenberg, pela parceria, por todo ensinamento, pela acolhida atenciosa e carinhosa no ambulatório de diabetes, por toda dedicação. Seu auxílio foi essencial para realização deste trabalho.

As professoras Carla Taddei e Dirce Maria Lobo Marchioni pelas contribuições no exame de qualificação.

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

Alegria e gratidão pelas pessoas que conheci nessa jornada e agora fazem parte da minha vida.

"Há pessoas que simplesmente aparecem em nossas vidas e nos marcam para sempre"
(Cecília Meireles)

A minha querida amiga ***Leila Leiko Hashimoto****. Mais que amiga, mais que irmã, mais que companheira. Sua alegria, maturidade, dedicação, sabedoria e coragem me encantam e me ensinam muito. Todos os mais nobres adjetivos são poucos para te descrever, e você os combina com perfeição. Minha gratidão infinita a você que foi essencial para desenvolvimento e conclusão deste trabalho. Obrigada por todos os dias e noites partilhados. E agora você é essencial em minha vida e na da minha família. Você merece tudo de mais lindo, minha grande florzinha! Gratidão sem fim!*

A minha querida amiga ***Liliane Viana Pires****. Distância é só um detalhe! Obrigada por cada ensinamento, por cada palavra, por cada conversa, por todo carinho e atenção. Por ser exemplo de pessoa, de profissional, de amiga. Você me inspira a ser cada dia melhor, em tudo. Gratidão sem fim!*

A minha querida amiga ***Verônica S Bandeira Marques.*** *Sua alegria contagia, não importa a distância. Por todos os momentos de partilha nesse caminho percorrido. Por toda sua atenção e carinho. Você é muito especial para todos nós! Gratidão sem fim!*

A minha querida amiga ***Giovanna Martucelli****. Sua chegada nos alegrou, animou e inspirou. Você foi essencial para desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por toda amizade, dedicação e cuidado! Gratidão sem fim!*

*A minha querida amiga, **Margarete Souza**. Obrigada por toda sua paciência, atenção, dedicação e ensinamentos oportunos. Pelas conversas alegres e inspiradoras. Eterna gratidão. Gratidão sem fim!*

*À minha querida amiga **Edna Nascimento** e família, obrigada pela amizade que me edifica! Obrigada por sempre me incentivar, apoiar e acolher como parte da família. Gratidão sem fim!*

*À minha querida amiga **Marlene Valença**, obrigada pela amizade, pela motivação, pelo carinho e doçura de sempre. Você é exemplo de pessoa e profissional que quero sempre seguir. Gratidão sem fim!*

Aos professores do Departamento de Alimentos e Nutrição experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

*Em especial ao professor **Thomas Prates Ong**, por toda atenção, dedicação e solicitude. Um exemplo a seguir!*

*A técnica **Fabiana Lima**, muito obrigada por todo auxílio, pela amizade e pelas conversas animadoras.*

*Aos **colegas do Laboratório Nutrição-Minerais** e Laboratório Nutrição Metabolismo e Microbiologia LNMM, aos novos e aos que por aqui passaram. Obrigada por todo ensinamento.*

*Em especial à querida **Débora**, obrigada pela motivação e pelo sorriso acolhedor de sempre.*

Aos que, apesar da distância, fizeram esse caminho ser mais leve e feliz:

*A minha querida amiga e madrinha **Jaqueline Oliveira** por toda conversa partilhada, por toda atenção e amor a mim dedicados. Por sempre me incentivar a ter novo olhar para as coisas. Sua paciência e atenção foram essenciais nesse tempo. Eterna gratidão.*

*Ao meu querido amigo **Padre Maurício,** obrigada por toda atenção e boas conversas que sempre me ensinam muito. Obrigada por toda confiança e encorajamento. Eterna gratidão.*

*Aos meus queridos amigos **Walter Perez** e **Matheus** obrigada pelos momentos de diversão, pela boa conversa, pela amizade eternizada.*

A Capes pela concessão da bolsa de estudos.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro para a execução deste trabalho.

A humildade é o primeiro degrau para o aprendizado

São Tomás de Aquino

ALENCAR, LL. A suplementação de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 com castanha-do-brasil pode alterar o estado nutricional relativo ao selênio, o grau de inflamação e a microbiota intestinal? 2019. 131f Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2019.

O diabetes *mellitus* tipo 2 está intimamente ligado a formação de espécies reativas de oxigênio, as quais aumentam os produtos de glicação avançada e consequentemente a inflamação e o desenvolvimento das complicações associadas a doença. Nesse contexto, destaca-se o papel do microbioma intestinal, visto que esta pode ser capaz de modificar fatores ligados ao sistema imune e sua modulação pode ser uma boa alternativa para melhora do quadro inflamatório e complicações da doença. A castanha-do-brasil, fonte de selênio, além de outros nutrientes, poderia atuar no sistema de defesa antioxidante e anti-inflamatório, além de influenciar a microbiota intestinal, resultando benefícios aos pacientes. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar estes efeitos da suplementação de indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2, com uma nóz de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) por dia, durante 60 dias. Para tanto, foi delineado um ensaio clínico, longitudinal, com 29 pacientes voluntários com diabetes *mellitus* tipo 2, atendidos no Ambulatório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os participantes foram avaliados antes e após a intervenção, e realizaram uma coleta de fezes (caracterização da microbiota intestinal e concentração de selênio) e uma coleta de sangue (análises de *status* de selênio, marcadores inflamatórios, glicêmicos e lipídicos, e da permeabilidade intestinal), a avaliação da ingestão alimentar foi por meio de Registro Alimentar de 3 dias Inicialmente, determinou-se a composição centesimal e a concentração de selênio da castanha-do-brasil utilizada. A análise bioinformática foi conduzida usando o *Quantitative Insight into Microbial Ecology* (QIIME, versão 1.9.0). A análise estatística foi realizada com os softwares Statistical Package for the Social Sciences, versão 23.0, e R versão 1.1.463. A concentração de selênio na castanha *in natura* foi de 79,8µg/g. A idade média dos participantes foi 54,9±3,6 anos. A ingestão de castanha-do-brasil foi capaz de melhorar significativamente os parâmetros: concentrações de selênio no plasma (Δ 95,82, $p<0,001$), nos eritrócitos (Δ 163,16, $p<0,001$) e nas fezes (Δ 166,31 $p<0,001$), assim como na selenoproteína P (Δ 5,36 $p<0,026$) e atividade da enzima glutationa peroxidase (Δ 30,61 $p<0,040$) e redução da hemoglobina glicada (Δ -0,8, $p=0,001$). No entanto, não houve alteração do perfil lipídico, inflamatório, ingestão alimentar e marcadores antropométricos. Apesar de não verificarmos mudança na composição global da microbiota intestinal, a diversidade interpessoal (β diversidade) variou conforme a concentração de selenoproteína P ($p=0,03$) e porcentagem de hemoglobina glicada ($p=0,04$). A suplementação com castanha-do-brasil melhorou o perfil glicêmico e o *status* de selênio. Apesar de não ser observada influência na composição global da microbiota, a segregação observada indica certa resistência da microbiota frente a intervenção com a castanha.
Palavras-chave: castanha-do-brasil, selênio, microbiota, diabetes *mellitus* tipo 2, inflamação.

ALENCAR, LL. Can supplementation of patients with type 2 diabetes mellitus with brazil nuts affect the nutritional status of selenium, the degree of inflammation and the intestinal microbiota? 2019. 131f Thesis (PhD) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo. São Paulo, 2019.

Type 2 diabetes mellitus is closely linked to the formation of reactive oxygen species, such as those that increase advanced glycation products (AGEs) and, consequently, inflammation and the development of complications associated with this disease. In this context, the study of the intestinal microbiome is of extreme importance, since it may be able to alter the factors related to the immune system and its modulation may be a good alternative for the improvement of the clinical and inflammatory status. Brazil nut is rich in selenium, in addition to other nutrients, which could act in the anti-inflammatory and antioxidant defense system and influence intestinal microbiota composition. Therefore, this study had the objective of determining the supplementation with type 2 diabetes mellitus. This longitudinal clinical trial was designed with 29 patients with type 2 diabetes mellitus, attended at the Endocrinology Outpatient Clinic of the Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina of the University of São Paulo. The intervention with Brazil nuts lasted 60 days and the participants were evaluated before and after by a collection of feces (intestinal microbiota characterization and selenium concentration) and blood collection (analyzes of selenium status, inflammatory markers, glycemic and lipid levels, and intestinal permeability), and dietary intake by means of a 3-day Food Registry. Initially, the centesimal composition and the selenium concentration of the nut were determined used. Bioinformatic analysis was conducted using the Quantitative Insight into Microbial Ecology (QIIME, version 1.9.0). Statistical analysis was performed with the software Statistical Package for the Social Sciences, version 23.0, and R version 1.1.463. The concentration of selenium in the nut in natura was 79.8 µg / g. The mean age of the participants was 54.9 ± 3.6 years, the mean time of diagnosis of the disease was 11.7 ± 6.9 years. The Brazil nut intake was able to significantly improve the parameters: plasma selenium concentrations (Δ 95,82, p<0,001), nem da circunferência da cintura (Δ-1 p=0,217) and GPX (Δ30.61 p <0.040) and reduction in HbA1c (Δ -0.8, p = 0.001). However, there were no changes in the lipid profile, inflammation, food intake and anthropometric markers. Although we did not verify a change in the global composition of the intestinal microbiota, the interpersonal diversity (β diversity) varied according to the concentration of SELENOP (p = 0.03) and HbA1c percentage (p = 0.04). We conclude that brazil nut supplementation improved the glycemic profile and the status of selenium. Although no influence was observed on the overall composition of the microbiota, the observed segregation indicates some resistance of the microbiota to the intervention with the chestnut

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Esquema representativo do mecanismo de liberação de insulina.	24
Figura 2.	Via metabólica de selênio em humanos	34
Figura 3.	Esquema representativo do processo de incorporação da selenocisteína.	36
Figura 4.	Biomarcadores de selênio em relação aos componentes de *status* de selênio.	41
Figura 5.	Distribuição de vias metabólicas conhecidas que utilizam selênio em bactérias	44
Figura 6.	Distribuição de SelD e características conhecidas de utilização de selênio pelas bactérias	46
Figura 7.	Fluxograma das atividades do estudo. São Paulo, 2019	52
Figura 8.	Distribuição percentual dos indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2, segundo a classificação do estado nutricional pelo IMC, proposto pela *World Health Organization* (2000), São Paulo, 2019.	63
Figura 9.	Distribuição percentual dos indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2, segundo a classificação da circunferência da cintura (ABESO, 2016). São Paulo, 2019.	64
Figura 10.	Fórmula do Índice de Conicidade.	65
Figura 11.	Distribuição dos participantes segundo Índice de Conicidade e Razão Cintura/Estatura. São Paulo, 2019.	66
Figura 12.	Distribuição percentual dos participantes segundo concentração de selênio nos eritrócitos. São Paulo, 2019	70
Figura 13.	Distribuição percentual dos participantes segundo concentração de selênio no plasma. São Paulo, 2019	71
Figura 14.	Atividade da enzima glutationa peroxidase nos eritrócitos dos individuos com diabetes *mellitus* tipo 2, em ambos os tempos avaliados. São Paulo, 2019.	72
Figura 15.	Distribuição percentual dos participantes segundo a atividade da GPX. São Paulo, 2019.	73
Figura 16.	Marcadores glicêmicos e lipídicos, segundo o tempo de avaliação, dos indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2. São Paulo, 2019	74
Figura 17.	Gêneros bacterianos mais abundantes identificados nas amostras. São Paulo, 2019.	82
Figura 18.	Enterótipos identificados nas amostras. São Paulo, 2019.	86
Figura 19.	Distribuição das amostras de acordo com o tempo, utilizando as matrizes de distância UniFrac *unweighted* (a) e *weighted* (b)	87

Figura 20.	Distribuição dos indivíduos segundo composição da microbiota intestinal e o percentual de $HbA_{1c.}$ São Paulo, 2019	90
Figura 21.	Distribuição dos indivíduos segundo composição da microbiota intestinal e SELENOP (ng/ml). São Paulo, 2019	91
Figura 22.	Histograma da distância UniFrac *Weighted* em relação ao delta. São Paulo, 2019.	92
Figura 23.	Correlação entre a variação (delta) da abundância de gêneros e biomarcadores avaliados entre os tempos. São Paulo, 2019.	95
Figura 24.	Regressão linear entre os parâmetros glicêmicos, de permeabilidade intestinal, *status* de selênio e OTU relacionadas. São Paulo, 2019.	98

LISTA DE QUADROS

		Página
Quadro 1.	Recomendações de ingestão relativas ao selênio em µg/dia, de acordo com a idade, proposto pelo *Institute of Medicine/Food and Nutrition Board*, 2000.	41
Quadro 2.	Valores de ingestão adequada (AI) de selênio em µg/dia, revisados de acordo com a idade, proposto pelas Sociedades de Nutrição da Alemanha, Áustria e Suíça, 2015.	42

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1.	Composição centesimal das castanhas-do-brasil (*Bertholletia excelsa* BHK) utilizadas neste estudo. São Paulo, 2019.	59
Tabela 2.	Perfil de ácidos graxos da castanha-do-brasil. São Paulo, 2019.	60
Tabela 3.	Características socioeconômicas dos participantes. São Paulo, 2019	61
Tabela 4.	Características antropométricas dos indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2. São Paulo, 2019	62
Tabela 5.	Valores de ingestão de energia, macronutrientes, ácidos graxos saturados, mono poli-insaturados e minerais dos pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2, nos dois tempos de avaliação. São Paulo, 2019.	67
Tabela 06.	Efeito da suplementação com castanha-do-brasil sobre o *status* de selênio de indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2. São Paulo, 2019.	70
Tabela 07.	Efeito da suplementação com castanha-do-brasil sobre os marcadores inflamatórios e permeabilidade intestinal de indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2. São Paulo, 2019.	77
Tabela 08.	Índices de Alfa diversidade. São Paulo, 2019	79
Tabela 09.	Abundância relativa da microbiota em diferentes níveis antes e após da suplementação de castanha-do-brasil. São Paulo, 2019.	81
Tabela 10.	Relação entre as variáveis bioquímicas mensuradas e a composição global da microbiota intestinal dos voluntários. São Paulo, 2019.	88
Tabela 11.	. Delta dos parâmetros avaliados segundo a distância *Weighted* (D1 x D2). São Paulo, 2019.	92
Tabela 12.	Correlação das variações das distâncias UniFrac e parâmetros bioquímicos. São Paulo, 2019.	93

LISTA DE ABREVIATURAS

$^1O_2$	Oxigênio *singlet*
ADA	Associação americana de diabetes
ADP	Adenosina difosfato
AGE	*Advanced glication endproducts* (produtos de glicação avançada)
ATF6	*Activating transcription factor 6*
ATP	Adenosina trifosfato
Ca^{2+}	Cálcio
CH_3Sec	Metilselenocisteína
CH_3SeH	Metilselenol
CT	Colesterol total
DCNT	Doença crônica não transmissível
DM	Diabetes *mellitus*
DRI	*Dietary reference intake*(Recomendação da ingestão de nutrientes)
EAR	*Estimated average requirement* (Necessidade média estimada)
EFSec	Fator de elongação específico da selenocisteína
ELISA	*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
Erk	Quinase regulada por sinal extracelular
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Ero1-α	Proteína retículo endoplasmático oxidase 1 – alfa
FFAR	*free fatty acids receptors*
FNB	*Food and Nutrition Board*
FOXO1 α	*Forkhead box protein O1*
GPX	Glutationa peroxidase
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HNO_2	Ácido nitroso
IL	Interleucina
IOM	*Institute of medicine*
IR	Receptor de insulina
IRE α	*Inositol-requiring transmembrane kinase/endoribonuclease 1α*
IRS-1	Substrato do receptor de insulina 1
K^+	Potássio
$L^\bullet$	Alquila
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
$LO^\bullet$	Radical alcoxila
$LOO^\bullet$	Radical peroxila
MAPK	*Mitogen Activated Protein Kinases*(Proteína quinase ativada por mitógeno)
MODY	*Maturity-onset diabetes of the young*
MsrB1	metionina-R-sulfóxido redutase 1
N_2O_3	Óxido nitroso
Na^+	Sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NES	*Nuclear export signal*
NFκB	*Nuclear fator kappa B*
$NO^\bullet$	Óxido nítrico
NO_2^-	Nitrito

NO_3^-	Nitrato
$O_2^{\bullet -}$	Anion superóxido
OH•	Hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
$ONOO^-$	Peroxinitrito
PDK	Quinase dependente de fosfatidilinositol
PERK	*Protein kinase-like eukaryotic initiation factor 2α kinase*
PGC-1a	*Peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator*
PI3k	Fosfatidilinositol-3-quinase
PKB	Proteína quinase B
PKC	Proteína quinase C
RDA	*Recommended Dietary Allowances*
RE	Retículo endoplasmático
SBP2	Proteína ligadora de Secis
Sec	Selenocisteína
SECIS	Sequência de inserção de selenocisteína
SelA	Selenocisteína sintase
SelB	Fator específico de alongação de selenocisteína
SelD	Selenofosfato sintetase
SELENOP	Selenoproteína P
SELENOS	Selenoproteína S
SeU	5-methylaminomethyl-2-selenouridine
SeMet	Selenometionina
SOS	*Son-of-sevenless*
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
Trx	Tiorredoxina
UL	*Tolerable Upper Intake Level*
UPR	*Unfolded protein response*

Sumário

1. INTRODUÇÃO **19**

2. REVISÃO DA LITERATURA **21**

2.1 Diabetes **21**

2.2 Estresse oxidativo e inflamação no diabetes **25**

2.3 Microbioma intestinal e diabetes **28**

2.4 O papel do selênio na microbiota e no diabetes **33**

3. HIPÓTESE EXPERIMENTAL **48**

4. OBJETIVOS **49**

5. CASUÍSTICA **50**

5.1 Protocolo Experimental **50**

5.2. Aspectos Éticos **50**

5.3. Seleção dos Participantes **51**

5.4 Critérios de inclusão **51**

5.5. Critérios de exclusão **51**

6.MATERIAL E MÉTODOS **53**

6.1 Caracterização da castanha-do-brasil **53**

6.2 . Avaliação Antropométrica **53**
6.2.1. Peso 53
6.2.2. Estatura 53
6.2.3. Índice de massa corpórea 54
6.2.4. Circunferência da cintura 54
6.2.5. Avaliação da ingestão alimentar 54

6.3 Coleta dos materiais biológicos **54**
6.3.1 Sangue 54
6.3.2. Fezes 55

6.4. Parâmetros bioquímicos de avaliação do selênio **55**
6.4.1. Determinação de selênio no plasma, eritrócitos e fezes 55

6.5. Determinação enzimática **56**
6.5.1.Glutationa peroxidase 56
6.5.2. Determinação da concentração plasmática de SELENOP 56

6.6. Determinações dos parâmetros glicêmicos e lipídicos **56**

6.7 Determinação dos marcadores inflamatórios e permeabilidade intestinal **56**

6.8. Sequenciamento e análise de dados **57**

6.9. Controle de contaminação **59**

6.10. Avaliação estatística **59**

7.RESULTADOS E DISCUSSÃO **60**

7.1 Caracterização da castanha-do-brasil **60**

7.2 Caracterização dos indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2. **61**

7.3 Avaliação antropométrica dos indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2 **63**

7.4. Avaliação da Ingestão alimentar dos indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2. **68**

7.5 Efeitos da suplementação sobre os parâmetros bioquímicos avaliados nos indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2. **70**
7.5.1. *Status* de Selênio 70
7.5.2. Perfil lipídico e glicêmico 74
7.5.3. Marcadores inflamatórios e de permeabilidade intestinal 77

7.6 Efeitos da suplementação sobre a microbiota intestinal **79**
7.6.1. Dados descritivos da microbiota intestinal 79
7.6.2 Alfa Diversidade 80
7.6.3 Enterótipos 86
7.6.4 Interação com os marcadores bioquímicos 87
7.6.5. Distribuição dos indivíduos segundo variação das distâncias 92
7.6.6. Associação entre a microbiota intestinal e os parâmetros de selênio, glicêmicos e LBP 95
7.6.7 Distribuição dos indivíduos segundo parâmetros de selênio, glicêmicos, LBP e a presença de OTU. **Erro! Indicador não definido.**

7. CONCLUSÃO **101**

8. REFERÊNCIAS **102**

1. INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* (DM) é uma desordem metabólica caracterizada por hiperglicemia e insuficiência da secreção e ação da insulina endógena. Considerada mundialmente como a doença endócrina mais prevalente e um problema de saúde pública, com aumento significativo do número de casos nos últimos anos, e uma tendência de permanecer em expansão. Estima que -se em 28 anos haja o aumento de 48% dos casos de DM (ZHAO *et al.,* 2015; IDF, 2017; QIN *et al.,* 2012).

A progressão da doença está diretamente associada com o aumento da produção de radicais livres, levando ao estresse oxidativo, associado ao sistema de defesa antioxidante insuficiente. O desenvolvimento das complicações do diabetes em relação ao tempo da doença, está relacionado com a ativação de fatores de transcrição, produção intracelular dos precursores dos produtos de glicação avançada (AGE) e ativação da proteína quinase C (PKC) (REHMAN *et al.,* 2017).

A ligação dos AGE com seus receptores, inativam as enzimas e modificam suas estruturas e funções, além de aumentar a produção de espécies reativas. O aumento intracelular de AGE, assim como citocinas inflamatórias, estimulam o fator de transcrição NF-κB (fator nuclear kappa B), aumentando a transcrição de óxido nítrico, o qual parece ser um mediador do dano da célula beta pancreática (TOBON-VELASCO, *et al*., 2014).

O aumento na expressão de enzimas antioxidantes, como a glutationa peroxidase (GPX) tem mostrado inibir a ativação do NF-κB. Esses resultados indicam que o *status* de selênio celular reduz a atividade do NF-κB em macrófagos, como foi observado em estudo conduzido em murinos (VUNTA *et al.,* 2007).

Por participar do sítio ativo das selenoenzimas antioxidantes, como a GPX, o selênio apresenta importante papel nos processos antioxidantes e anti-inflamatórios. Deste modo, a ação do selênio no diabetes, está relacionada a redução das injúrias provocadas pelo estresse oxidativo, reduzindo a formação de espécies reativas de oxigênio, e, assim melhorando o quadro inflamatório (LABUNSKYY *et al.,* 2014).

Outra vertente deve ser considerada, o papel que a microbiota intestinal desempenha, tanto na inflamação, como no metabolismo de nutrientes. A dinâmica ecológica da microbiota intestinal tende à estabilidade, para isso é necessária diversidade e abundância de seus componentes. Nesse contexto, qualquer perturbação ou intervenção sistêmica não é capaz de alterar sua estrutura, que logo retorna ao seu estado inicial, assim é considerado estado de resiliência. No entanto

há casos em que a intervenção pode alterar parcialmente a composição da microbiota, estabelecendo espécies bacterianas não existentes anteriormente. Ademais, há casos em que as mudanças são irreversíveis, estabelecendo desequilíbrio tanto na composição e função, esse caso reflete estado disbiótico (MOYA; FERRER, 2016).

Apesar da relação microbiota-hospedeiro não estar totalmente elucidada, sabe-se que a microbiota exerce um papel importante na homeostase intestinal, e em doenças crônicas não transmíssiveis, como diabetes, esse quadro pode ser agravado em decorrência de modificações induzidas no microbioma (WU *et al.* 2013). O papel da microbiota intestinal no diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), tem sido alvo de intensa investigação, uma vez que alterações em sua composição promovem inflamação sistêmica, uma característica marcante das doenças metabólicas (KARLSSON *et al.,* 2013).

A composição da microbiota intestinal também pode ser modulada por elementos traço, com alteração de populações de microrganismos sensíveis às mudanças nas concentrações de minerais, tais como o selênio, que poderiam influenciar o *status* do micronutriente do hospedeiro. No caso específico do selênio, sabe-se que cerca de um quarto de todas as bactérias expressam selenoproteínas, e, portanto, necessitam do mineral para seu crescimento ótimo. Dessa maneira, a microbiota intestinal pode sequestrar o selênio para a expressão de suas próprias selenoproteínas, reduzindo a disponibilidade do mineral para o hospedeiro (HRDINA *et al.,* 2009).

Estudos metagenômicos mostram que mesmo espécies próximas podem ter grandes diferenças genômicas, e respostas distintas à fatores ambientais. A compreensão da interação do microbioma, selênio e tecidos-alvo pode fornecer subsídios para propor estratégias para melhora do quadro inflamatório persistente no DM, assim como melhora da resposta a ação da insulina e até biomarcadores para avaliação do risco e progressão do DM (PAUN; DANSKA, 2016; KELLER *et al.,* 2014; LI *et al.,* 2014).

Nesse contexto, investigar o efeito do consumo da castanha-do-brasil, como fonte de selênio, sobre o *status* desse mineral, os benefícios na redução da inflamação e na alteração da microbiota com o propósito de reduzir complicações tardias, as quais podem promover melhor qualidade de vida dos indivíduos com DM2, foi nosso propósito.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Diabetes

O diabetes *mellitus* (DM) é uma das doenças crônicas mais importantes deste século, com aumento nos últimos anos, ocasionando piora da qualidade de vida dos indivíduos com DM. A prevalência desta doença crônica é um problema de saúde pública global. Estima-se que em 2045 haverá aumento de 35% dos casos de diabetes no mundo, ultrapassando 690 milhões de casos (CHAO *et al*., 2018; IDF, 2017; ZHAO *et al.,* 2015). O Brasil, 4º país com mais casos de indivíduos com diabetes na faixa de 20 a 79 anos, aproximadamente 12,5 milhões de indivíduos. A estimativa para 2045, é o aumento de 62% dos casos de diabetes na América do Sul e na América Central (IDF, 2017).

O diabetes é caracterizado como um conjunto de doenças metabólicas compostas por hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção e ação de insulina (CRAIG; HATTERLEY; DONAGHUE, 2009).

O diagnóstico do diabetes pode ser baseado nos critérios de glicemia plasmática, seja em jejum apresentando concentração ≥126ml/dL, ou pelo teste oral de tolerância a glicose (TOTG), que avalia a concentração de glicose plasmática após 2h da ingestão de 75g de glicose (2-h PG), neste caso a glicemia deve ser ≥ 200mg/dL (ADA, 2019).

Ainda é possível realizar diagnóstico por meio da análise do percentual de hemoglobina glicada ($HbA_{1C)}$, um marcador da glicemia a longo prazo. Trata-se de uma avaliação de glicemia média de 2 a 3 meses anteriores a análise. Para diagnóstico de DM considera-se como ponto de corte o percentual ≥ 6,5% (ADA, 2019).

O DM pode ser classificado em quatro tipos que se distinguem em diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) ou diabetes autoimune; diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2); diabetes gestacional e outros tipos específicos baseados em distúrbios genéticos, síndromes monogênicas (como diabetes neonatal e MODY, do inglês *maturity-onset diabetes of the Young*) ou pelo uso de medicamentos como glicocorticoides ou após transplante de órgãos, entre outros fatores (ADA, 2019).

O DM2 corresponde a 90% dos casos de DM, com hiperglicemia resultante da combinação entre secreção insuficiente, sem produção compensatória de insulina e a resistência à ação deste hormônio, além de fatores genéticos e ambientais, como dietas com alta densidade energética e inatividade física. A ação ineficiente da insulina gera irregularidades no metabolismo dos macronutrientes (IOANNIDIS, 2008), que pode resultar na menor resposta tecidual à insulina em um ou mais pontos dos complexos mecanismos de ação desse hormônio (CHAWLA *et al*., 2016; GRAVES; DONAGHUE, 2019).

Ainda, a hiperglicemia persistente no diabetes está associada a complicações crônicas como disfunções micro e macrovasculares, que resultam em elevados custos com o tratamento e piora na qualidade de vida dos indivíduos com DM (IDF, 2017).

O controle glicêmico é altamente regulado, sendo o pâncreas o órgão central desse mecanismo, porque é responsável pela produção dos principais hormônios insulina e glucagon, responsáveis pela regulação glicêmica. Estes hormônios interagem com o peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP1), peptídeos YY, grelina e colecistocinina, a fim de regular a ingestão calórica, seja armazenando ou retirando suprimentos energéticos
(WOODS *et al.,* 2006).

No entanto, a insulina e o glucagon são os hormônios de destaque na via metabólica da glicose são secretados pelas células β e α pancreáticas, respectivamente, as quais respondem as mudanças nas concentrações de glicose de forma antagônica, ou seja, durante a hiperglicemia, as células α são estimuladas a produzirem glucagon, e quando as concentrações de glicose estão aumentadas as células β são estimuladas a produzirem insulina (WALKER *et al.,* 2011). A disfunção nestas células pode alterar o controle glicêmico e está associada com o aparecimento de diabetes.

A insulina é um hormônio anabólico essencial para a manutenção da homeostase de glicose, pois aumenta a entrada desta molécula nos tecidos muscular e adiposo e simultaneamente, inibe a produção de glicose pelo fígado. Além de estimular o crescimento e diferenciação celular, esse hormônio promove o armazenamento de substratos no tecido adiposo, fígado e músculos por estimular a

lipogênese, glicogênese e síntese proteica, e ainda inibe a lipólise e glicogenólise (MAYER *et al.,* 2007).

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

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

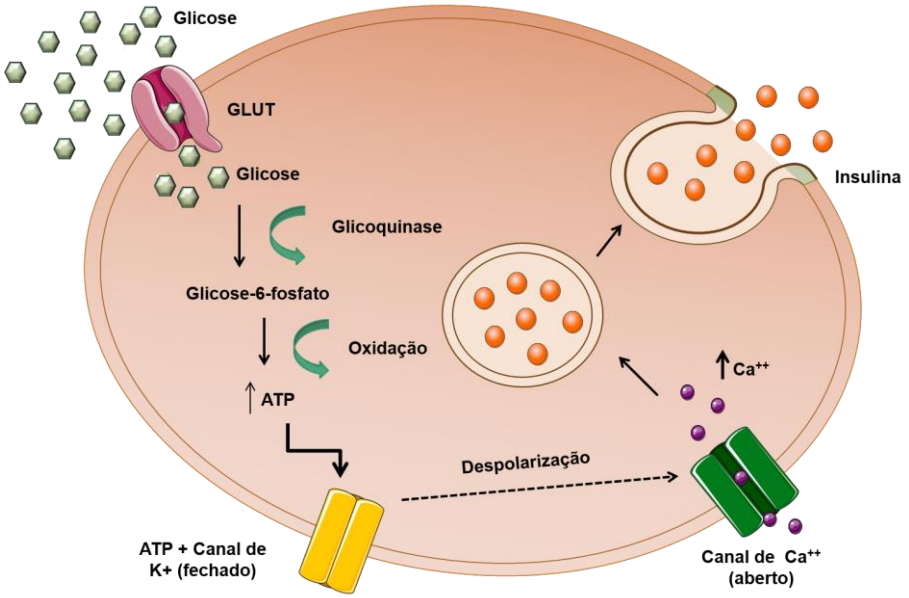
Os transportadores de glicose (GLUT) são responsáveis pelo ingresso das moléculas de glicose nas células β, com consequente aumento da produção de adenosina trifosfato (ATP). O aumento da razão entre ATP e adenosina difosfato (ADP) estimula o fechamento dos canais de potássio (K^+), sensíveis a ATP (K^{ATP}) na membrana plasmática. Este desfecho impede o efluxo de K^+, acumulando carga positiva no interior celular e elevando o potencial de membrana, o que reduz a polaridade da membrana plasmática (ELIASSON *et al.,* 2007).

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

A insulina circula pelo organismo até ligar-se às células alvo, por meio do receptor de insulina (IR), unindo moléculas adaptadoras, como receptores de insulina e da proteína semelhante ao colágeno com homologia SRC (SHC). Desta forma,

ocorre a autofosforilação do IR, que fosforila a proteína substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) (MURROW; HOEHN, 2010; WHITE, 2002).

Figura 1: Esquema representativo do mecanismo de liberação de insulina.



Legenda: GLUT: transportadores de glicose, Ca^{2+} Cálcio, K^{+}: potássio.
O acúmulo de glicose plasmática ativa a abertura dos canais receptores de glicose GLUT2. A glicose passa para o meio intracelular, onde é oxidada até a liberação de ATP. Ocorre a despolarização da membrana que ativa a abertura dos canais de Ca^{++} e estimula a liberação da insulina.

A partir da ativação do IRS-1, ocorre estímulo para a ligação de proteínas com domínios SH2, como Pl3k (fosfatidilinositol-3-quinase) ou Grb2 (proteína 2 ligada ao receptor de fator de crescimento). Assim, o receptor fosforilado ativa várias moléculas de IRS-1, que por sua vez fosforila qualquer proteína com domínio SH2. Essas proteínas recrutam Grb2 que, associada a SOS (*son-of-sevenless*) ativam o Erk1/2 (quinase regulada pelo sinal extracelular), via *Mitogen Activated Protein Kinases* MAPK (OBBERGHEN, *et al.* 2001).

Em paralelo, a via Pl3k se liga ao IRS-1 fosforilado, que sofre mudança conformacional, resultando no aumento da atividade e produção do fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) na membrana plasmática. Após essa ligação, PIP3 recruta proteínas como quinase B (Akt/PKB) que, entre outras ações, regula a translocação

do GLUT-4 para a membrana plasmática, resultando no aumento da entrada da glicose para a célula (MURROW; HOEHN, 2010).

Alterações na ativação de enzimas de sinalização próximas a insulina (IR, PI3K), dos alvos jusantes (PDK - quinase dependente de fosfatidilinositol e PKB), dos alvos MAPK em músculos e tecido adiposo, vêm sendo estudadas em indivíduos com obesidade, dabetes *mellitus* tipo 2 e resistência à insulina, pois podem ser responsáveis por defeitos na sinalização da cascata de insulina (FROJDO; VIDAL; PIROLA, 2009).

Com ação oposta à ação da insulina, o glucagon estimula a elevação da concentração da glicose sanguínea, por meio da gliconeogênese e da glicogenólise O glucagon está aumentado em pacientes com DM2 durante de jejum e sua concentração é suprimida no estado pós-prandial, resultando em altos níveis de glucagon no sangue. Essa alteração originou a hipótese bi-hormonal e a importância do glucagon na patogênese do diabetes (GURUNG; JIALAL, 2019).

A liberação de glucagon é iniciada pela ação da enzima *prohormona convertase* 2 (PC2), que cliva o pró-glucagon em glucagon biologicamente ativo. Em resposta a hipoglicemia o glucagon é liberado pelas células alfa pancreáticas. Ocorre também a participação de aminoácidos nesse processo de homeostase glicêmica, no qual oxintomodulina e polipeptídeo insulinotrópico dependente de glicose (GIP) estimulam a secreção de glucagon e o peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) inibe secreção (GURUNG; JIALAL, 2019).

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

2.2 Estresse oxidativo e inflamação no diabetes

Estresse oxidativo consiste no “desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, em favor dos oxidantes, levando a uma interrupção da sinalização e controle redox”. Tais espécies reativas podem ser produtos de processos fisiológicos, resultantes de reações enzimáticas, ou ainda podem atuar como mediadores para a transferência de

elétrons em várias reações bioquímicas, assim como fazer parte da cascata de sinalização intracelular, sendo necessários para a homeostase (SIES, 2015).

Há duas classes de moléculas resultantes de processos metabólicos que podem aumentar o estresse oxidativo no DM. A primeira classe é constituída por moléculas que derivam do oxigênio (ERO): os radicais livres superóxido ($O_2^{\bullet-}$) fisiologicamente produzido na mitocôndria pela cadeia transportadora de elétrons, hidroxila ($OH^{\bullet}$), alquila ($L^{\bullet}$), alcoxila ($LO^{\bullet}$) e peroxila ($LOO^{\bullet}$), bem como as espécies reativas não radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e oxigênio *singlet* ($^1O_2$). A segunda classe inclui espécies reativas que derivam do nitrogênio: óxido nítrico ($NO^{\bullet}$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-) e peroxinitrito ($ONOO^{\bullet-}$) (Rehman *et al.,* 2017).

O mecanismo pelo qual o estresse oxidativo se relaciona com a resistência à ação da insulina ainda não está totalmente esclarecido. Uma hipótese é que o retículo endoplasmático apresenta potencial redox necessário para formar as ligações dissulfetos (S-S), que são utilizadas em apenas um terço das proteínas. O restante dessas pontes (S-S) não utilizadas apresentam-se como potenciais alvos para ER, e tais modificações na estrutura proteica seriam responsáveis por alterações da função de algumas proteínas, entre elas a insulina (WATSON, 2014).

A oxidação da glicose é a principal via para a produção de ER no DM, e o aumento dessa produção propõe mecanismos que aumentam ainda mais a formação de ER, incluindo danos celulares, a via MAPK e a formação de produtos de glicação avançada (AGE), entre outros, (MARITIN *et al.,* 2003; CERIELL0, 2000). Além disso, a hiperglicemia é considerada tóxica para as células β do pâncreas que possuem baixa expressão de enzimas antioxidantes, sendo sensíveis à ação de ERO (STEINBRENNER *et al*. 2015).

As células podem ainda responder a estímulos externos que ativam vias como a MAPK. Essa ativação pode ser indireta, pela oxidação de resíduos essenciais de cisteína que inibem a desfosforilação e inativam as fosfatases, responsáveis pela inativação da MAPK. Ou por ação direta, por meio da PKC, fatores de transcrição, produção intracelular dos precursores dos produtos de glicação avançada (AGE), formando ER e desregulando a cascata da insulina (STEINBRENNER *et al*. 2015).

A inflamação é destacada como um importante fator etiológico para o desenvolvimento da resistência à insulina. Como consequência das elevadas concentrações de AGE há alteração das funções de proteínas intracelulares, induzindo a produção de ERO. A ligação com receptores de AGE (RAGE) ativa o fator de transcrição NFkB (*Nuclear Factor kappa B)*, o qual estimula a transcrição de citocinas inflamatórias como IL-1, IGF-1, TNF-α, TGF-β (GIACCO; BROWNLEE, 2010; GOLDIN *et al.,* 2006). Ademais, a inflamação mediada por RAGE pode ainda ser aumentada pela alta afinidade entre o componente A do LPS e o domínio V do RAGE (TEISSIER; BOULANGER, 2019).

Os estudos que sustentam a hipótese da inflamação na etiologia do diabetes mostram uma elevação nos níveis de IL-6 e PCR entre indivíduos com alterações na resistência à insulina e naqueles com alterações clínicas do DM2. A proteína C reativa (PCR) é a principal mediadora da resposta inflamatória na fase aguda da inflamação, sendo a primeira derivada da via de biossíntese hepática dependente de IL-6. Estudo conduzido em animais mostrou que a infusão da IL-6 induziu a liponeogênese subsequente a hiperglicemia, e hiperinsulinemia compensatória. Respostas metabólicas similares foram observadas em humanos (Rehman *et al.,* 2017).

O diabetes foi sugerido como uma doença redox, ou seja, as respostas inflamatórias podem ser secundárias às respostas de proteínas inativas no retículo endoplasmático (RE). Isso ocorre por falhas na ponte dissulfeto que são fundamentais para estabilizar a conformação 3D das proteínas, resultando em uma proteína ineficiente ou sem função (WATSON *et al.,* 2014).

Os padrões moleculares associados aos danos celulares (DAMPs), podem estar envolvidos nesse mecanismo. Distribuídos didaticamente em classes, os DAMPs da classe V, apresentam associação com estresse do retículo endoplasmático.

O aumento da expressão de pró-insulina resulta na ruptura da homeostase do RE, acumulando proteínas “desdobradas” ou inativas e causando estresse do RE, associado ao estresse oxidativo. Esse mecanismo é considerado DAMP da classe V. Esse processo resulta na resposta a proteínas desdobradas, do inglês *unfolded protein response* (UPR), e apresenta 3 diferentes vias: proteína quinase residente no reticulo endoplasmático (PERK); a quinase endorribonuclease transmembrana que

necessita inositol 1α (IRE1α); e fator de transcrição de ativação 6 (ATF6), responsável pela ativação NFkB e MAPK, e consequentemente pela expressão de citocinas próinflamatórias (LAND, 2015).

2.3 Microbioma intestinal e diabetes

O microbioma intestinal é um ecossistema único, exercendo um papel fundamental no organismo humano saudável. Exemplos de interação com o organismo hospedeiro incluem influências na digestão e absorção de nutrientes, síntese de vitaminas, ácidos graxos e metabólitos, ação trófica na modulação da diferenciação e proliferação de células epiteliais intestinais, e o desenvolvimento e maturação do sistema imune intestinal. Por sua vez, o hospedeiro fornece nutrientes que são utilizados pelas bactérias, garantindo sua sobrevivência (POSSEMIERS *et al.,* 2009; AZIZ *et al.,* 2013).

Muitos fatores interferem na composição da microbiota, como o tipo de parto, a idade gestacional ao nascimento, o uso de antibióticos nos primeiros meses de vida e a alimentação. Esses fatores podem ter impactos significativos na determinação das comunidades microbianas intestinais da criança. No entanto, as transformações da microbiota infantil-adulta, são influenciadas principalmente por fatores dietéticos e ambientais (TRASANDE *et al.,* 2013).

O trato gastrintestinal é colonizado por trilhões de bactérias, e sua quantidade varia de 10^{11} a 10^{14} UFC/ml. Essa população bacteriana está principalmente concentrada no cólon e ceco, de modo que o conteúdo fecal pode concentrar de 100 a 200 bilhões de células bacterianas por grama de fezes, por peso seco. (MACCAFERRI *et al.,* 2011; CANDELA *et al.,* 2014; UDAYAPPAN *et al*. 2014).

A relação entre a microbiota intestinal e o DM2 tem sido alvo de intensa investigação, já que alterações em sua composição podem promover uma inflamação sistêmica, o que também é uma característica marcante de diversas doenças metabólicas (KARLSSON *et al.,* 2013). No diabetes, por exemplo, poderia haver um ambiente imunitário permissivo no intestino, o que exacerbaria a inflamação sistêmica,

piorando o quadro do paciente com diabetes (MCPHEE; SCHERTZER, 2015; WU *et al.* 2013).

A microbiota apresenta grande variação entre os indivíduos. Contudo é convencional que a microbiota saudável apresente o predomínio dos filos Firmicutes e *Bacteroide*tes (90%), seguidos por Actinobacteria, Verrucomicrobia e Proteobacteria e menos de 1% de espécies patogênicas (AZIZ *et al.,* 2013; PFLUGHOEFT, VERSALOVIC, 2012; HMPC 2012; HOLLISTER *et al.,* 2014)

Entre os fatores que podem influenciar a composição da microbiota intestinal destaca-se a dieta, a qual pode ser adaptada e modulada para beneficiar a composição da microbiota intestinal. Uma relação marcante entre a dieta e o microbioma intestinal já está descrita, por exemplo, existe uma associação entre pessoas que usualmente consomem maiores quantidades de proteínas de origem animal e gorduras saturadas, com predominância do gênero *Bacteroides* no seu intestino. Da mesma forma, consumidores usuais de uma dieta rica em carboidratos (açúcares simples e fibras), apresentam uma predominância do gênero *Prevotella* no microbioma intestinal, evidenciando a modulação microbiana por meio dos padrões alimentares (WU *et al.,* 2012).

Além disto, um estudo conduzido em camundongos mostrou que a alteração de uma dieta rica em gordura e carboidratos para uma dieta pobre em gordura e rica em vegetais, resultou na alteração da microbiota em curto prazo, associando a modulação da microbiota pela dieta ao desenvolvimento de DM2 (TURNBAUGH *et al.,* 2009).

Em estudo recente, Egshatyan *et al*. (2016), também identificaram a predominância de *Prevotella* no *clust*er com maior ingestão de carboidratos, sugerindo modulação da microbiota pela alimentação, com possível atuação na patogênese do DM. A modulação do microbioma é um importante fator para absorção de nutrientes e mecanismo de ação dos medicamentos, como por exemplo a metformina (WANG *et al.,* 2018).

Para melhor elucidar tais relações, é útil e eficaz a investigação da contribuição funcional desses microrganismos, por meio de fenótipos fisiológicos que apresentam predisposição para a saúde ou doença. Dessa forma, justifica-se aprofundar o conhecimento sobre fatores relacionados entre a gênese do DM2 e a microbiota

intestinal, cuja composição pode determinar progressão ou proteção (ARUMUGAM *et al.,* 2011; HUTTENHOWER *et al.,* 2012; TURNBAUGH *et al.,* 2009).

Até o momento, estudos têm encontrado resultados diferentes na caracterização da composição da microbiota intestinal de indivíduos com diabetes tipo 2. Qin *et al*. (2012) identificaram maior abundância de *Clostridium.* Karlsson *et al*. (2013), verificaram o gênero *Lactobacillus* em maior abundância.

Alguns mecanismos são propostos para elucidar tal relação no diabetes, como a supressão do *Fasting Induced Adipose Factor* (FIAF) pela microbiota. O FIAF é um inibidor da lipase lipoproteica (LPL), a qual tem sua atividade aumentada e por sua vez aumenta a absorção de ácidos graxos e o acúmulo de triglicerídeos nos adipócitos (BÄCKHED *et al.,* 2004).

Alguns dados corroboram a hipótese de que a relação microbiota/diabetes possa se dar por meio de um impacto da microbiota no sistema nervoso central, através do eixo intestino-cérebro influenciando a regulação fome/apetite, ou ainda por meio de fatores indiretos, como a ação dos receptores de ácidos graxos livres (*free fatty acids receptors* – FFAR). Esses receptores são expressos por células epiteliais no intestino e produzem o peptídeo YY (PYY), o qual é responsável por inibir a secreção gástrica, o esvaziamento gástrico, a contração da vesícula biliar e ainda reduzir o tempo de trânsito gastrintestinal. Assim, propicia-se maior absorção de nutrientes do lúmen intestinal, em especial dos ácidos graxos de cadeia curta que são substratos para a lipogênese no fígado (ULVEN, 2012; HOLZER *et al.,* 2010; ROBERFROID *et al.,* 2010).

A microbiota intestinal abundante de bactérias produtoras de butirato está relacionada à proteção quanto ao desenvolvimento de DM2. Isso porque ácidos graxos de cadeia curta, como o butirato, podem interagir com as histona-desacetilases, regulando a expressão gênica de reguladores metabólicos, como o PGC-1α, um coativador de transcrição associado ao aumento da oxidação de ácidos graxos, atividade mitocondrial, assim como a prevenção da endotoxemia metabólica (ZHAO *et al.,* 2015).

Outro mecanismo proposto, relacionando a interação da microbiota com o diabetes, é a inibição da via 5’ monofosfato adenosina proteína quinase (AMP-Q) pela microbiota, favorecendo o aumento da adiposidade corporal e o desenvolvimento de resistência à insulina. A enzima AMP-Q tem importante papel na regulação do apetite e do metabolismo dos ácidos graxos e glicose. Uma vez

inibida, essa via ativa processos anabólicos e bloqueia processos catabólicos. Estudo que avaliou camundongos *germ free*, verificou que estes não aumentaram seu peso corporal mesmo recebendo dieta hipercalórica. Isso ocorreu pelo aumento da atividade da AMP-Q no fígado e músculo esquelético, resultando em maior oxidação de ácidos graxos e melhora da sensibilidade à ação da insulina (KOLA, 2008).

A mucosa intestinal é composta por uma monocamada epitelial e atua como uma barreira entre o organismo e o ambiente externo. Quando a microbiota intestinal está saudável, a barreira mucosa permite a passagem de água nutrientes e compostos bioativos, e simultaneamente impede o ingresso de substâncias nocivas. No entanto, a permeabilidade dessa barreira pode ser alterada, contribuindo para inflamação de baixo grau, levando a resistência à insulina (JAYASHREE *et al.,* 2014).

A alteração na permeabilidade da barreira intestinal favorece a translocação de lipopolissacarídeo (LPS), o principal componente da membrana externa das bactérias Gram-negativas. Esta endotoxina é composta por três módulos: um antígeno O altamente variável, constituído por oligosacárideos, sendo um central e um lipídeo A (responsável por grande parte da toxicidade). Receptores Toll-like (TLR), assim como RAGE, reconhecem o lipídio A, desencadeando respostas imunes e inflamatórias (JAYASHREE *et al.,* 2014).

Após a ligação LPS/TLR4, distintas vias de sinalização são ativadas, como MAPK, a AP-1 (*activator protein* 1), STAT (*signal tranducer and activator of transcription*), IRF3 (*interferon (IFN)-regulatory factor 3*), e principalmente o NFκB, que como descrito anteriormente, é um importante ativador de citocinas pró-inflamatórias, tanto por células do sistema imune, como também do tecido adiposo, promovendo uma endotoxemia metabólica (CARVALHO *et al.,* 2012).

Desta forma, o aumento da concentração sérica de LPS tem sido investigada para caracterizar a endotoxemia. No entanto, a avaliação dessa endotoxina é limitada, por possuir meia-vida curta. Sendo assim, a proteína ligadora de LPS (LBP) uma proteína de fase aguda, sintetizada no fígado, tem sido utilizada como marcador de endotoxemia metabólica. Após a ligação LPS/LBP, forma-se o complexo com o *cluster* de diferenciação 14 (CD14), presente principalmente em macrófagos, ativando o NF-kB. Uma vez ativado, ocorre a translocação do NF-kB

para o núcleo celular promovendo a expressão de citocinas pró-inflamatórias, principalmente fator de necrose tumoral-α (TNF-α) e a Interleucina (IL), que são capazes de alterar a fosforilação de proteínas do substrato do receptor de insulina (IRS), impedindo a translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4), comprometendo a entrada da glicose. Dessa forma a concentração sérica de LPS está diretamente relacionada com DM2 (TILVES *et al.,* 2016)

Concentrações circulantes aumentadas de LPS, associadas a alta ingestão de gorduras, pode gerar inflamação subclínica de forma crônica, fator presente na gênese e progressão de DM2 (CARVALHO, *et al.,* 2012).

O LPS apresenta associação com lipoproteínas séricas e triacilglicerídeos no diabetes, e o HDL é considerado um importante um fator de desintoxicação e neutralização de LPS. Foi observada correlação negativa entre a concentração dessa lipoproteína e o LPS, assim como a correlação positiva entre as concentrações de LPS e triacilglicerol, aumentando assim o risco de desenvolver eventos cardiovasculares e piorando a qualidade de vida de indivíduos com DM2 (NYMARK *et al.,* 2009).

Ademais, o componente A do LPS aparentemente tem alta afinidade pelo domínio V do RAGE, contribuindo assim para o aumento da concentração de LPS na inflamação mediada por RAGE (TEISSIER; BOULANGER, 2019).

Caricilli *et al*. (2011) ao avaliarem camundongos *knockout* TLR2, com maior abundância de Firmicutes e recebendo uma dieta balanceada, observaram aumento da inflamação pela maior captação de LPS e aumento da resistência à insulina quando comparados ao grupo controle. Porém, quando avaliaram camundongos *knockout* TLR e *germ free,* verificaram maior sensibilidade à ação da insulina, sugerindo a participação da microbiota em alterações inflamatórias e metabólicas.

Egshatyan *et al*. (2016) avaliaram a composição da microbiota humana em indivíduos com diferentes níveis de tolerância a glicose, distribuídos em três grupos da seguinte forma: grupo 1 com concentração adequada de glicose, grupo 2 classificado com pré-diabetes e grupo 3 composto por DM2. Os resultados mostraram maior abundância do filo Firmicutes, seguido por Bacteroidetes, em todos os grupos. Aproximadamente 50% da abundância microbiana total foi representada por cinco gêneros: *Blautia, Bacteroides, Prevotella, Faecalibacterium e Clostridium.* Sendo que o gênero *Blautia* foi o mais abundante no grupo DM2 (EGSHATYAN *et*

al., 2016). Há ainda a interação entre a microbiota e os antidiabéticos orais, indicados no DM2. Entre eles, a metformina, da classe das biguanidas, que atua na inibição da gliconeogênese hepática, e é a mais utilizada no tratamento para homeostase glicêmica, isso porque além dos efeitos antidiabéticos, também está associada à melhora do perfil lipídico, à redução de peso e de eventos cardiovasculares (SBD, 2016).

Forslund er al. (2016), em estudo com indivíduos com DM2 distribuídos em quatro grupos: DM2, DM2 em tratamento com metformina (DM2Met), DM1 e grupo controle (sem diabetes), encontraram efeitos indiretos do uso da metformina na melhora do perfil lipídico, isso porque foi observada redução da absorção lipídica e da inflamação provocada por LPS apenas no grupo DM2Met. Além disso, o grupo DM2Met apresentou em sua composição microbiana aumento de *Subdoligranulum* e *Akkermansia,* resultado diferente dos demais grupos, inclusive do grupo DM2 sem metformina, indicando semelhança com a microbiota de indivíduos saudáveis

A associação entre *Akkermansia* e a redução da resistência à ação da insulina sob o tratamento de metfomrina, foi observada tanto em modelo animal (murinho), quanto em humanos, sugerindo que os microrganismos poderiam mediar o metabolismo de glicose em associação à metformina, beneficiando tanto os efeitos terapêuticos quanto reduzindo efeitos adversos. Contudo, a validação desses dados é necessária para comprovar a causalidade e esclarecer os mecanismos dessa mediação (FORSLUND *et al.* 2016).

Resistência, resiliência e redundância funcional são propriedades exibidas por microbiotas robustas: a capacidade da microbiota de restaurar a função original (fenótipo). Entretanto, é uma questão complexa determinar quais fatores tornam uma microbiota robusta (MOYA; FERRER, 2016).

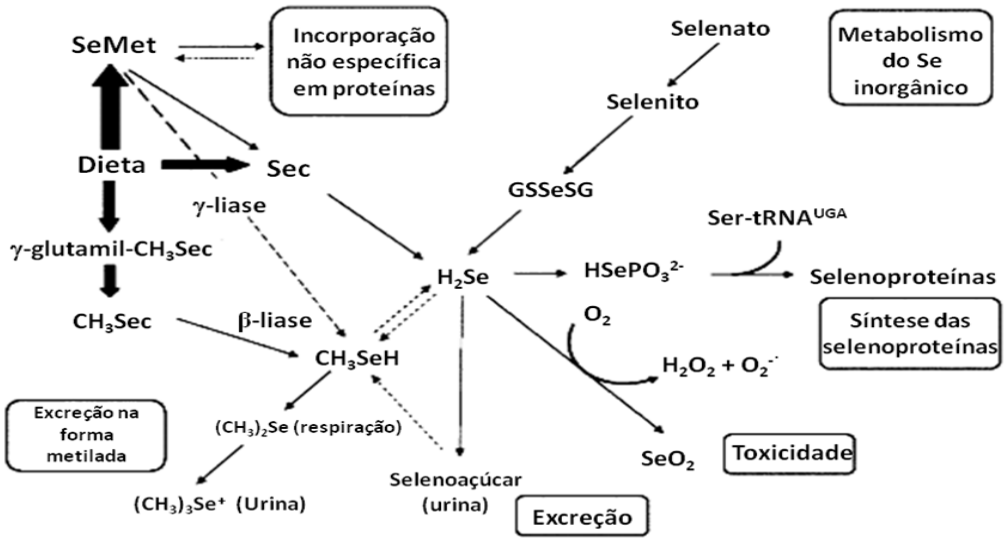
2.4 O papel do selênio na microbiota e no diabetes

No diabetes, a interação entre microbiota e selênio tem sido discutida, contudo, até o momento, a síntese da discussão é de que se trata de uma relação complexa, com resultados controversos. Diante da ação antioxidante e anti-inflamatória deste micronutriente e do papel da microbiota intestinal no diabetes, apresentada anteriormente, a discussão dessa interação é relevante.

O selênio foi descoberto em 1817 pelo químico sueco Jöns Jacob Berzelius. Em meados da década de 1950, o selênio foi definido como um micronutriente essencial. No entanto, somente em 1973 foi descoberto que o selênio é um componente essencial da enzima glutationa peroxidase (GPX) (FAIRWEATHER-TAIT *et al.,* 2011; HESKETH, 2008).

Após a ingestão, por meio de diferentes alimentos ou suplementos, o selênio pode percorrer diferentes rotas metabólicas, principalmente por apresentar formas inorgânicas e orgânicas. A via de absorção do selênio não está completamente elucidada, mas sabe-se que as formas inorgânicas, selenato e selenito, além de serem absorvidas com maior eficiência são menos retidas pelo organismo quando comparadas a formas orgânicas selenocisteína (Sec) e selenometionina (SeMet) (BURK *et al.,* 2006). Na **Figura 2** está esquematizada a via metabólica de selênio, conforme ingestão nas suas diferentes formas.

Figura 2. Via metabólica de selênio em humanos (Adaptado de Combs, 2015).



Legenda: O Se inorgânico pode ser incorporado em selenoproteínas por meio do seleneto de hidrogênio (H_2Se). Enquanto o selênio da SeMet também pode ser incorporado às selenoproteínas com Sec, por meio do catabolismo de H_2Se, e diretamente em outras proteínas contendo Met. Legenda: SeMet: selenometionina; Sec: selenocisteína; GSSeSG: selenodiglutationa; γ-glutamil-CH_3Sec: γ-glutamil-selênio-metilselenocisteína; H_2Se: Seleneto de hidrogênio; $HSePO_3^{2-}$: selenofosfato; CH_3Sec: selênio-metilselenocisteína; CH_3SeH: metilselenol; $(CH_3)_2Se$: dimetil selenito; SeO_2: dióxido de selênio; $(CH_3)_3Se^+$: íon trimetil selênio.

Uma vez absorvido pelo trato gastrintestinal, o selênio é transportado principalmente para o fígado, onde é metabolizado e utilizado na produção de selenoproteínas e redistribuído para outros tecidos, por meio da corrente sanguínea. Dessa forma, o fígado é um órgão central no metabolismo do selênio, que é utilizado para sintetizar o aminoácido Sec, encontrado no sítio ativo de selenoenzimas (SEALE *et al.,* 2018).

A maioria das formas de selênio é absorvida eficientemente, mas a sua utilização pelo organismo depende da via metabólica, a qual influenciará na forma de selênio que estará disponível no plasma para ser utilizada, e a excreção dos compostos de selênio. O selenato e selenito são reduzidos pela selenodiglutationa formando o selenito de hidrogênio, o qual atua como um *pool* central de selênio tanto para eliminação ou integração de selênio nas selenoproteínas. A selenocisteína e selenometionina entram no *pool* do selenito, para que o selênio seja utilizado na síntese de selenoproteínas ou excretado pela urina na forma de selenoaçúcar (principal forma de excreção de selênio). Ressalta-se que o metilselenol pode entrar na via do *pool* de selenito. (COMINETTI *et al.,* 2011; FAIRWEATHER-TAIT; COLLINGS; HURST, 2010; RAYMAN; INFANTE; SARGENT, 2008).

Em paralelo, a selenometionina pode ser incorporada diretamente em proteínas por meio da substituição da metionina. Uma via independente é a do composto orgânico γ-glutamil-metilselenocisteína, o qual é convertido em metilselenocisteína (CH3Sec) e transformado pela β-liase em metilselenol (CH3SeH), sendo excretado principalmente pela respiração, ou em menor quantidade pela urina na forma de íon trimetilselênio (COMBS, 2015; RAYMAN; INFANTE; SARGENT, 2008).

O selênio pode ser incorporado nas células por três vias: a primeira por absorção de selênio inorgânico por meio de transporte de ânion. A selenometionina, adquirida por meio da dieta pode ser captada por meio dos transportadoes de metionina ou ainda pode ser transformada em selenocisteína através da via de trans-selenação ou captada da Selenoproteína P (SELENOP) que abriga 10 resíduos de selenocisteína em humanos (SHETTY *et al.,* 2017; OM *et al.,* 2010).

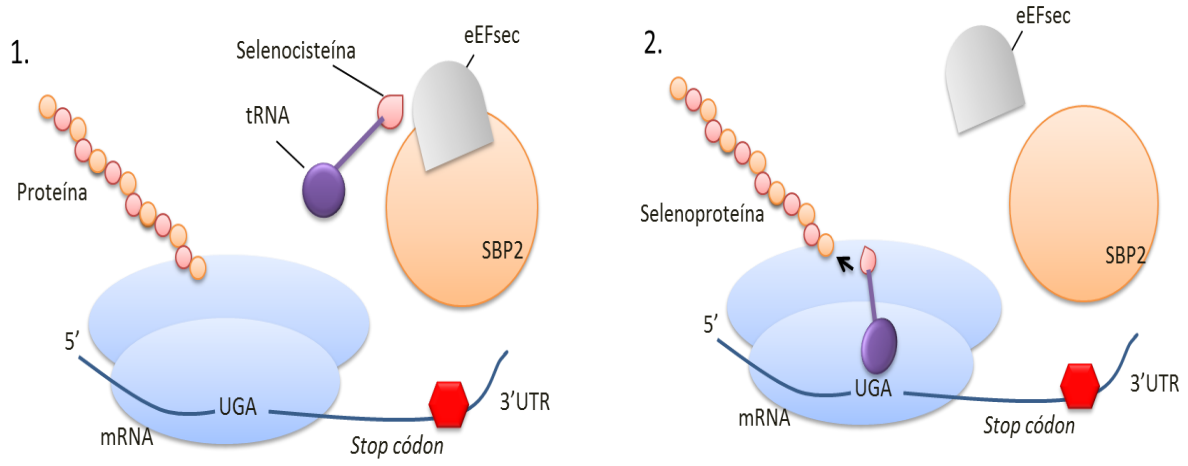
A Sec é co-translacionalmente incorporado a uma cadeia peptídica por meio de máquinas de incorporação altamente específicas, exigindo que certos fatores cis e trans funcionem adequadamente (SEALE *et al.,* 2018). Esse fato é importante para

todos os aspectos do metabolismo de selênio. Os padrões de expressão das selenoproteínas são muito bem regulados, e a maioria dos efeitos metabólicos são observados com a suplementação de indivíduos deficientes em Se (SCHOMBURG *et al.,* 2009).

Na síntese de selenoproteínas, o selênio por meio da Sec, é especificamente incorporado a selenocistil-tRNASec e, eventualmente, na posição específica de cadeias polipeptídicas, como indicado pelo códon finalizador UGA (OM *et al.,* 2010).

A reprogramação do códon UGA para a incorporação da Sec e a sequência de aminoácidos para formar a selenoproteína, é um mecanismo incomum e ocorre na região codificadora do mRNA. Para isso, é necessária uma estrutura específica de haste-alça de ação cis, denominada sequência de inserção Sec (SECIS) na região 3' não traduzida (3'UTR) do mRNA. Importante ressaltar que cada selenoproteína tem uma SECIS especifica e única. Sendo assim, a síntese específica de selenocysteyl-tRNASec, de seryltRNASec e selenido envolvem reações sequenciais coordenadas e catalisadas por selenofosfato sintetase, seril-tRNA quinase e selenocisteína sintase. Além desses fatores, são necessários outros fatores trans para a incorporação da Sec. (SHETTY; COOPELAND, 2018; OM *et al.,* 2010). Na **Figura 3**, está o esquema representativo do processo de inserção da Sec.

Figura 3. Esquema representativo do processo de incorporação da selenocisteína.



Legenda: Sec: selenocisteína; SECIS: sequência de inserção de selenocisteína; SBP2: proteína ligadora de Secis 2; EFSec: fator de elongação específico da selenocisteína; tRNA: RNA transportador. **1.** SECIS recruta a proteína ligadora de Secis (SBP2) a qual atua na captação do fator

de elongação específico da selenocisteína (EFSec) e de seu tRNA. **2.** Inserção do tRNA na região UGA resultando na incorporação da Sec, formando selenoproteína.

Em humanos, a principal forma biológica de selênio é a Selenocisteína (Sec), presente nas selenoproteínas, e pode ser adquirida por meio dietético, ou de subprodutos do metabolismo de selênio ou ainda do subproduto da degradação de selenoproteínas. (SHETTY; COOPELAND, 2018).

A distribuição do selênio no organismo é complexa, dinâmica e não homogênea entre os tecidos (SCHOMBURG; SCHWEIZER, 2009). A selenocisteína liase (SelCys) é responsável pela utilização e reorganização de selênio nas selenoproteínas, sua ação é catalisar a remoção do selênio dependente de 5-fosfato piridoxal da L-selenocisteína. A SelCys apresenta especificidade a esse substrato específico e nenhuma interação com a L-cisteína. A clivagem específica da selenocisteína pela enzima SecLys é uma etapa metabólica crítica para a reciclagem da selenocisteína, formada pela degradação proteolítica das selenoproteínas (OM *et al.,* 2010; SEALE *et al.,* 2018).

A decomposição de Sec libera o seleneto, que retorna para a síntese de Sec se ligando a um fosfato para gerar selenofosfato. O selenofosfato é utilizado para sintetizar Sec em seu tRNA [Ser] e incorporado em selenoproteínas recém-traduzidas. Desta forma, o átomo de Se da SelCys é reciclado. No entanto, o selênio não é considerado um regulador da atividade da SecLys, visto que foi observada correlação inversa entre expressão de SecLys e a concentração sérica de selênio (SEALE *et al.,* 2018).

O sequenciamento genético e os avanços das ferramentas de bioinformática, possibilitaram o aumento na identificação de selenoproteínas em diversas espécies. Até o momento foram identificadas 50 famílias de selenoproteínas, sendo 25 em humanos. Nem todas com as funções elucidadas, mas 12 delas atuam em reações de oxido-redução (GLADYSHEV *et al.,* 2016; LABUNSKYY *et al.,* 2014).

Existe uma hierarquia para distribuição de selênio para síntese de selenoproteínas. Em casos de deficiência, a síntese de algumas selenoproteínas como GPX4, TxnRd1 ou TrxRd2 é priorizada, enquanto que a expressão de GPX1, GPX3, SELENOP e DIO2 é reduzida (SCHOMBURG; SCHWEIZEr, 2009)

Apesar da menor concentração de selênio no cérebro, esta é altamente estável e dependente da ingestão desse micronutriente. Desse modo, a distribuição

de selênio para cérebro é priorizada. Ainda assim, sugere-se que na deficiência de selênio ocorre aumento na captação e armazenamento desse mineral pelo cérebro. A regulação da expressão de SecLys influenciada pela concentração de selênio pode ser um dos mecanismo de suprimento desse elemento (SEALE *et al.,* 2018).

Entre as selenoproteinas destaca-se a SELENOP, principal selenoproteína plasmática, sintetizada principalmente no fígado e secretada no sangue, com função de transportar selênio para outros tecidos. É considerada um biomarcador significativo do *status* de selênio e essencial para a biossíntese de selenoproteínas ativas, protegendo o organismo de danos oxidativos (HYBSIER *et al.,* 2017).

A SELENOP pode conter entre 10 e 35 resíduos de Sec e ainda possui um terminal amino Sec, próprio das selenoproteínas com ação antioxidante, o que sugere potencial função redox desta enzima (GLADYSHEV *et al.,* 2016).

A síntese de SELENOP é uma desafio adicional, visto que contém vários códons UGA. Observou-se que acima do segundo códon UGA há a sequência de codificação do N-terminal de uma metionina e o C-terminal (um aminoácido com grupo carboxila, -COOH) são determinantes e independentes para a síntese eficiente de SELENOP. Além disso, a distância entre o primeiro códon UGA e o peptídeo de ligação também é importante para a eficiência da tradução. Em concentrações limitadas de selênio, o N-terminal sofre rearranjo estrutural que envolve um complexo de incorporação de Sec, desprovido dos fatores envolvidos em seu processo normal. Isso inibe o complexo de incorporação de Sec, resultando principalmente na segunda isoforma UGA truncada (SHETTY; COOPELAND, 2018).

A SELENOP fornece selênio para atividade da SecLys por meio da sua degradação e liberação de Sec. Tal mecanismo pode ocorrer por diferentes vias, como a captaçao por receptores da membrana da Apolipoproteína E (ApoER2), principalmente pelas células do cérebro e testículos (OLSON *et al.,* 2007), ou ainda pela endocitose mediada por megalina (homólogo ao ApoER2) nos rins (OLSON *et al.,* 2008); ou por pinocitose durante a transferência materna/fetal (BURK *et al.,* 2013); ou ainda pela via dependente de clatrina nos lisossomos. No entanto, o destino da proteína e liberação de selênio no lissosoma ainda não está claro (KUROKAWA *et al.,* 2012).

Quando há redução da expressão de SELENOP são ativadas vias de transulfuração e de redução de selenito, que metabolizam selenocompostos em seleneto, para a síntese de selenoproteína e manutenção do metabolismo de selênio (SEALE *et al.,* 2018).

No entanto, em casos de interrupção da SELENOP para manutenção do metabolismo de selênio, são ativadas as vias de transulfuração e de redução de selenito, que metabolizam selenocompostos em seleneto, para a síntese de selenoproteína (SEALE *et al.,* 2018).

A concentração de selênio na SELENOP circulante difere entre os indivíduos e pode fornecer informações importantes sobre o metabolismo e *status* do selênio, mulheres jovens têm maior concentração de selênio quando comparada a mulheres idosas e homens jovens e idosos (HYBSIER *et al.,* 2017).

Fontenelle *et al*. (2018), em uma ampla revisão, observaram que tanto estudos *in vitro* como em modelo animal, apresentaram associação entre SELENOP e resistência à insulina. Nesses modelos de estudo, a SELENOP parece inibir a ativação da AMPK induzida por espécies reativas que inibiram a via ROS / AMPK / PGC-1α no músculo esquelético por meio do seu receptor LRP1.

Estudos em humanos, a associação entre SELENOP e resistência à insulina também foi observada. Entretanto, esses resultados não foram relacionados com a concentração sérica de selênio (OO, 2018). Ademais, estudos em humanos avaliando selênio e perfil glicêmico são controversos (FENG *et al.,* 2015; POUNIS *et al.,* 2014; GAO *et al.,* 2014)

Em estado de estresse oxidativo, há redução da expressão de SELENOP e aumento da expressão de GPX, que é o grupo mais numeroso das selenoproteínas (HUGHES *et al.,* 2018). Desvendar o mecanismo subjacente para a tradução preferencial, pode esclarecer a hierarquia da expressão de selenoproteína que prioriza a utilização de selênio sob condições de estresse ou privação de selênio (SHETTY *et al.,* 2017).

Atualmente são conhecidas 8 isoformas de GPX, incluindo: GPX citosólica (GPX1), a GPX especifica gastrintestinal (GPX2), a GPX encontrada no plasma (GPX3), a GPX fosfolipídio hidroperóxido (GPX4) e a GPX6, localizada no epitélio olfatório e nos tecidos embrionários. Outras variantes da GPX contêm cisteína ao

invés de selenocisteína, incluem a GPX5 com expressão restrita no epidídimo, GPX7 fosfolipídio hidroperóxido e GPX8 (LABUNSKYY *et al.,* 2014). A GPX1 é a selenoproteína mais abundante em mamíferos, com ação citosólica, degrada o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em H_2O e O_2. A redução da atividade da GPX1 resulta em concentrações elevadas de H_2O_2 intracelular, e aumento do estresse oxidativo (LABUNSKYY *et al.,* 2014).

O estresse oxidativo causa lesões celulares como a peroxidação dos lipídeos de membrana, a oxidação de receptores hormonais e enzimas e lesões no material genético, como oxidações de bases do DNA que podem resultar em processos mutagênicos e tumorais (MARTLELLI; NUNES, 2014). Por outro lado, a superexpressão de GPX1 é capaz de reduzir o estresse (LABUNSKYY *et al.,* 2014).

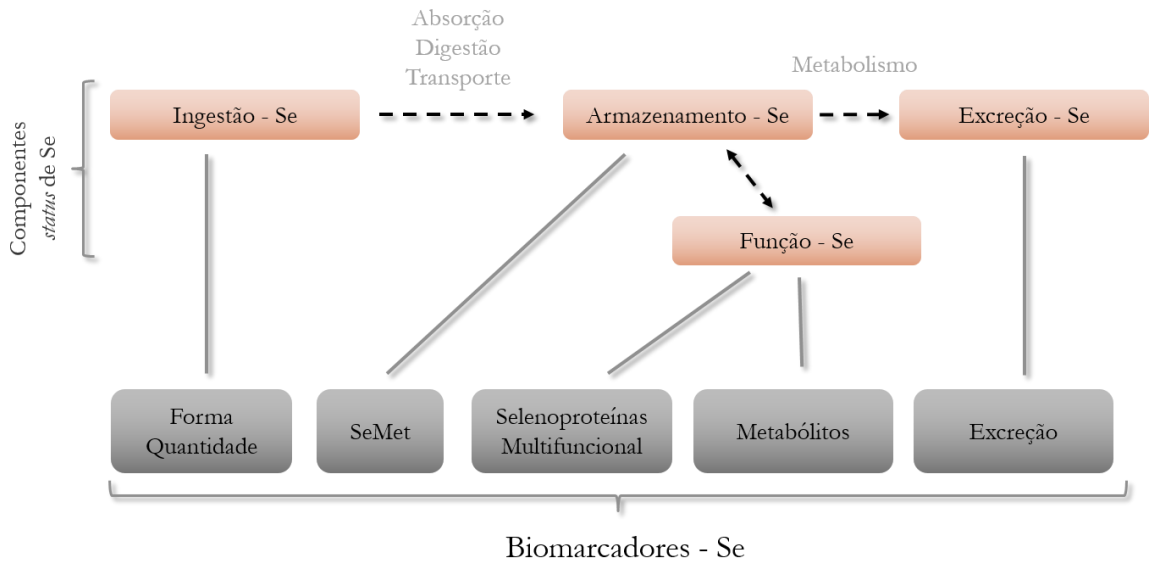
O *status* de selênio das populações pode ser avaliado por meio das selenoproteínas, mas também pela concentração do mineral nos cabelos, nas unhas, na urina, nas fezes e no sangue (sangue total, soro, plasma e eritrócitos). As análises de selenoproteínas em diferentes frações do sangue podem fornecer uma estimativa mais acurada do *status* de selênio (FAIRWEATHER-TAIT *et al.,* 2011).

De maneira geral, os biomarcadores de selênio podem ser classificados em 2 tipos:

1. Biomarcadores diretos, ou seja, os que fornecem informação direta sobre a função do micronutriente. Ex.: selenoproteínas GPX1, GPX3, SELENOP.

2. Biomarcadores indiretos, baseado nas concentrações de selênio dos alimentos, tecidos, urina ou fezes. Ex.: a SeMet no plasma e nos tecidos pode indicar a quantidade de selênio potencialmente disponível para uso funcional. Pode indicar a probabilidade de deficiência, adequação ou de efeitos adversos em relação ao selênio, porém sem fornecer evidência direta de qualquer um destes estados (COMBS, 2015). A relação entre os biomarcadores de selênio e os componentes do *status* desse micronutriente estão apresentados na **Figura 4.**

Figura 4. Biomarcadores de selênio em relação aos componentes de *status* de selênio.



Fonte: Adaptado de Combs, 2015. Legenda: Se: selênio, SeMet: selenometionina

O *Institute of Medicine* (IOM), por meio do *Food and Nutrition Board* (FNB) realizou estimativas de ingestão de selênio com o objetivo de evitar a deficiência e a toxicidade na população. A determinação das necessidades de selênio foi baseada na maximização da atividade da GPX, e os resultados foram utilizados como indicador para o cálculo da Necessidade Média Estimada (EAR) e Ingestão Dietética Recomendada (RDA) (ESTADOS UNIDOS-IOM/FNB, 2001). As recomendações de ingestão de selênio estão apresentadas no **Quadro 1**.

Quadro 1. Recomendações de ingestão relativas ao selênio em µg/dia, de acordo com a idade, proposto pelo *Institute of Medicine/Food and Nutrition Board*, 2000.

Recomendação de ingestão de referência DRIs	Selênio (µg/dia)			
	1-3 anos	4-8 anos	9-13 anos	> 14 anos
EAR	17	23	35	45
RDA	20	30	40	55
UL	90	150	280	400

Legenda: EAR – necessidade média estimada; RDA – ingestão dietética recomendada; UL – nível máximo de ingestão tolerável. Fonte: IOM/FNB (2000).

As Sociedades de Nutrição Alemã, Austríaca e Suíça, propuseram novos valores de referência para a ingestão adequada (AI) de nutrientes, entre eles o selênio. No caso do selênio analisaram a saturação de SELENOP no plasma como critério para a derivação dos valores de referência. Os autores justificam que países cujo solo apresenta baixa concentração de selênio, como a Alemanha, a ingestão de selênio deve ser aumentada, por esse motivo, a implementação de novas referências de ingestão de selênio (KIPP *et al.,* 2015). Os valores sugeridos estão apresentados no **Quadro 2**.

Quadro 2. Valores de ingestão adequada (AI) de selênio em µg/dia, revisados de acordo com a idade, proposto pelas Sociedades de Nutrição da Alemanha, Áustria e Suíça, 2015.

Recomendação de ingestão SNAAS	Selênio (µg/dia)							
	0-4 meses	4-12 meses	1-4 anos	4-7 Anos	7-10 anos	10-13 anos	13-15 anos	> 15 anos
Sexo Feminino	10	15	15	20	30	45	60	60
Sexo Masculino	10	15	15	20	30	45	60	70

Legenda: SNAAS: Sociedade de Nutrição da Alemanha, Áustria e Suíça.

A castanha-do-brasil é considerada a fonte mais rica de selênio em alimentos, com concentrações que variam de 11 a 115 µg/g. Essas diferença se deve a variações nas concentrações desse mineral no solo, às condições ambienteis, climáticas, diferindo portanto em relação à safra (CARDOSO *et al.* 2015; COMINETTI *et al.,* 2012; THOMSON *et al.,* 2008; SCUSSEL, 2007; DUMONT *et al.,* 2006). Apresenta baixo conteúdo de carboidratos e aproximadamente 17% de proteínas, constituídas principalmente pelos aminoácidos metionina (18%) e cisteína (8%), sendo a selenometionina a forma predominante, que confere alta biodisponibilidade desse micronutriente, cerca de 80% (FAIRWEATHER-TAIT; COLLINGS; HURST, 2010). Contém ainda 60 a 70% de lipídeos, com ácidos graxos mono e poli-insaturados (ALASALVAR e SHAHIDI, 2009). Porém a principal importância da castanha-do-brasil reside na possibilidade de suprir as necessidades de selênio com apenas 1 noz (3 a 5g).

O estado nutricional relativo ao selênio de um indivíduo e o risco para o desenvolvimento e/ou agravamento do diabetes tem sido foco de discussões no meio científico. Os mecanismos de defesa antioxidante no diabetes são deficientes, com alterações na atividade das enzimas antioxidantes (AKSOY *et al.,* 2005; SINDHU *et al.,* 2004). Com isso, crescem as investigações sobre o efeito de substâncias que possam contribuir para neutralizar o aumento dos radicais livres provocados por esta doença reduzindo os riscos de efeitos secundários e promovendo o equilíbrio entre oxidação e redução (COSKUN *et al.,* 2005; BALASUBASHINI *et al.,* 2004).

Mueller *et al.* (2009) em uma extensa revisão sobre a relação selênio e diabetes, ressalta que a participação do selênio nas selenoproteínas com função de oxido-redução, estabelece uma relação entre este mineral e doenças crônicas não transmissíveis com o objetivo de amenizar danos. Contudo, é importante o estabelecimento de concentrações adequadas, uma vez que concentrações elevadas de selênio podem produzir efeitos adversos, assim como o seu uso permanente na forma de suplementos já foram relacionados ao surgimento de diabetes e da síndrome metabólica.

Estudo conduzido em animais, suplementados com altas concentrações de selênio por longo período, mostrou aumento da síntese das enzimas GPX e selenoproteínas S e P (SELENOS e SELENOP). A super expressão da GPX reduz espécies reativas, inclusive as que participam da via da insulina, resultando em processos de glicólise, gliconeogênese e lipogênese desregulados (ZHOU *et al,* 2013).

A avaliação do efeito antidiabético do selênio em humanos é escassa, sendo que tal relação está estabelecida por sua ação insulino mimética, uma vez que o selênio é capaz de ativar a proteína Akt e quinases envolvidas na cascata de sinalização da insulina (PILLAI; SUGATHAN; INDIRA, 2012).

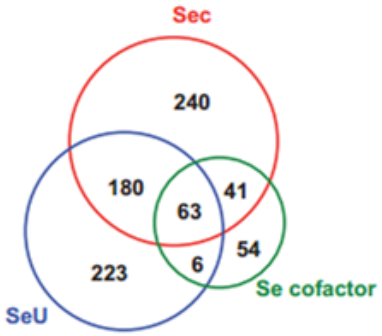
A SELENOP é regulada positivamente sob hiperglicemia, via FOXO1 α (*Forkhead box protein O1*) e HNF-4α, com suportado pelo coativador PGC-1a. A regulação ascendente das enzimas gliconeogênicas no fígado diabético ocorre de forma análoga. Isso pode explicar as concentrações aumentadas de SELENOP no plasma de indivíduos com diabetes (STEINBRENNER, 2013).

Se de algum modo, o aumento da concentração de selênio parece estar relacionada com a progressão do DM, por outro lado, infecções estão frequentemente

associadas a deficiências de micronutrientes, como o selênio, o que pode afetar as funções celulares na imunidade inata e adaptativa (STEINBRENNER *et al*. 2013).

Um importante fator entre selênio e inflamação é a microbiota intestinal. A utilização de selênio pelas bactérias é composta por três subsistemas: Sec-decodificação, SeU-utilização e Sec-cofator, ou seja, formas que utilizam selênio como cofator. Aproximadamente um quarto de todas as bactérias expressam cerca de 90 famílias de selenoproteínas, com variação entre duas e mais de mil selenoproteínas em cada família, portanto, necessitam do mineral para seu crescimento ótimo. Sendo assim, a microbiota intestinal pode ser capaz de sequestrar selênio para a expressão de suas próprias selenoproteínas, reduzindo a disponibilidade do mineral para o hospedeiro. Poucos estudos foram desenvolvidos sobre o papel do selênio na modulação da microbiota. A distribuição de vias metabólicas das bactérias que utilizam selênio está apresentada na **Figura 5** (LIN *et al.,* 2015; KASAIKINA *et al.,* 2011).

Figura 5. Distribuição de vias metabólicas conhecidas que utilizam selênio em bactérias



Legenda: Sec: selenocisteína; SeU: selenoproteína U, Se-cofactor: formas que utilizam o selênio como cofator. Fonte: LIN *et al.,* 2015

A inserção da Sec para formação das selenoproteínas de bactérias é semelhante ao processo em humanos. A inserção bacteriana de Sec também é iniciada pela ligação da SECIS no códon UGA. A partir disso, vários fatores para a inserção são ativados, incluindo a Selenocisteína sintase (SelA), fator específico de alongação de

selenocisteína (SelB), Sec-especificos tRNA e o tRNA correspondente ao códon UGA) (PENG *et al.,* 2016).

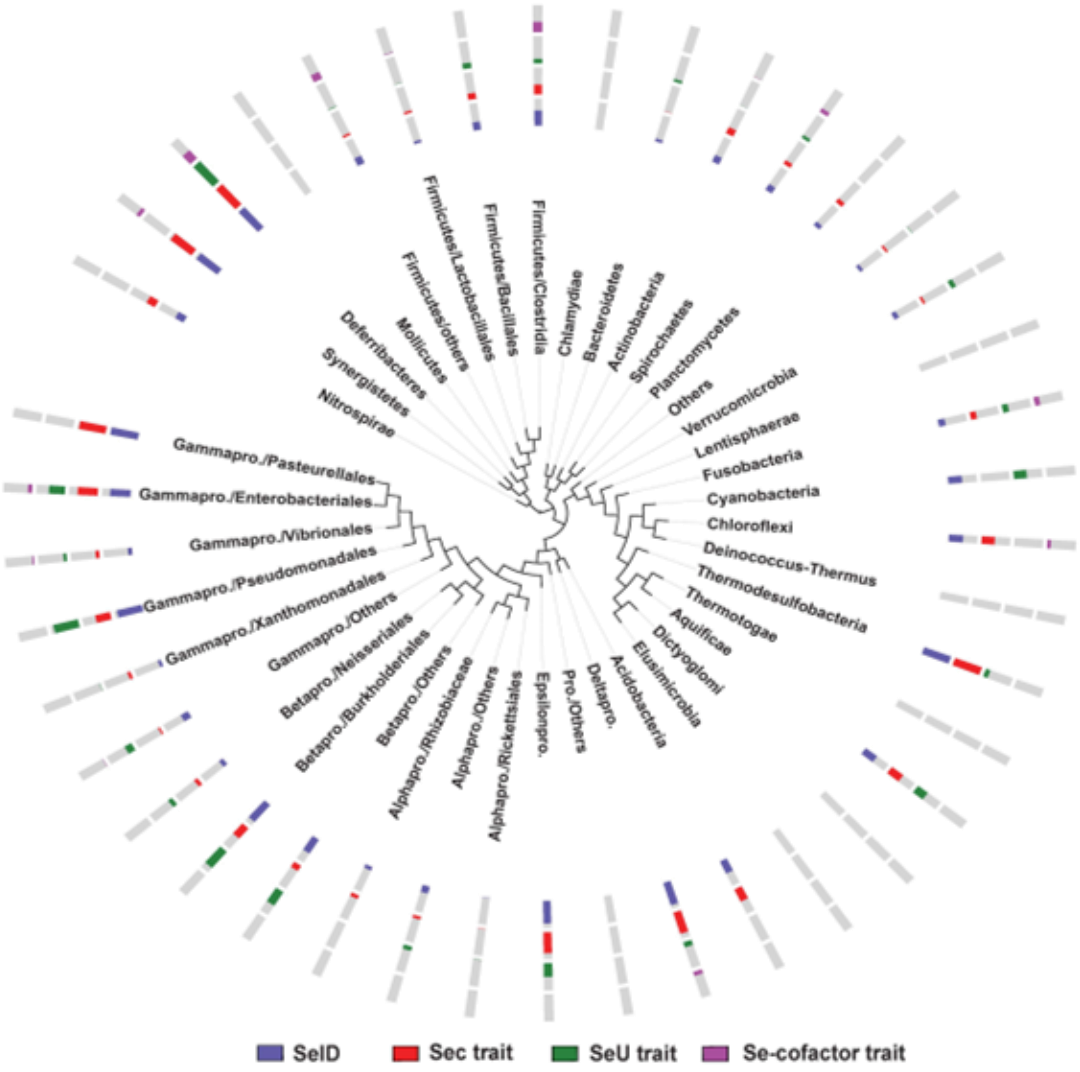
Análises genômicas comparativas sobre os componentes que utilizam selênio em genomas bacterianos completamente sequenciados mostram uma grande quantidade de genes e vias metabólicas influenciadas pelo selênio, distribuído em grupos taxonomicamente distintos (PENG *et al.,* 2016).

Em uma abordagem genômica, foram investigados mais de 5200 genomas bacterianos sequenciados a fim de compilar o uso de selênio nesse domínio. A princípio, foi analisada a distribuição de componentes-chave envolvidos em diferentes características de utilização de selênio, formando grande mapa de filogenia de utilização deste micronutriente em bactérias. Também foi identificado um subconjunto de organismos que apresentavam gene SelD, sugerindo uma nova via de utilização de selênio nestes organismos. Análises adicionais do conjunto total de selenoproteínas dos microrganismos estudados identificaram a presença de um novo filo de bactérias ricas em selenoproteínas. Por fim, a análise de fatores ambientais de todos os organismos revelou que diferentes traços de selênio podem favorecer condições ecológicas específicas, tais como habitat, concentração de oxigênio e temperatura (PENG *et al.,* 2016). Os padrões de distribuição de SelD e os elementos de utilização de selênio encontrados em diferentes filos ou classes, estão apresentados na **Figura 6.**

A presença de SelD foi detectada em quase todas as linhagens bacterianas avaliadas, com exceção de um pequeno número de filo ou classe como *Chlamydiae*, *Mollicutes*, *Deinococcus-Thermus* e *Thermotogae*. Sugerindo que a utilização de selênio é antiga, uma vez que seu uso foi comum a quase todas as espécies em bactérias (PENG *et al.,* 2016).

Estudo conduzido em ratos investigou o metabolismo de SeMet e selenito no trato gastrintestinal, especialmente na formação de produtos voláteis de excreção de selênio, como dimetilselenido (DMSe). O selenito foi completamente metabolizado, no cólon e ceco, formando o DMSe, sugerindo contribuição da microbiota na excreção de selênio por meio da produção de compostos de selênio metilados e selênio elementar (KRITTAPHOL *et al.,* 2011).

Figura 6. Distribuição de SelD e características conhecidas de utilização de selênio pelas bactérias (PENG *et al.,* 2016).



A árvore filogenética é simplificada para mostrar apenas os grandes táxons e ramos bacterianos. As quatro faixas (círculos) ao redor da árvore (de dentro para fora) representam os padrões de distribuição de traços de SelD, Sec, SELENOU e cofatores de selênio, respectivamente. O comprimento da seção colorida de cada coluna representa a porcentagem de organismos que têm SelD ou a características de selênio correspondente entre todos os organismos sequenciados neste filo. **Fonte:** PENG *et al.* 2016.
Legenda: SelD: Selenofosfato sintase D (SelD), Sectrait; Formas de selênio, SeU: selenoproteína U, Se-cofactor trait: formas que utilizam o selênio como cofator; Pró: Proteobactérias.

Hrdina *et al*. (2009) administraram dietas deficiente em selênio (0,086 µgSe/g) e adequada no mineral (0,15 µg Se/g) para camundongos *germ free,* durante 5 semanas, após desmame. O grupo com dieta deficiente apresentou maior atividade GPX e da tiorredoxinas (Trx) no fígado e intestino, sugerindo utilização total do micronutriente pelo hospedeiro.

Outro estudo avaliou o impacto do selênio na microbiota e a possível interação entre o microbioma e o *status* do hospedeiro em relação ao selênio. Camundongos *germ free* foram distribuídos em dois grupos, sendo que um grupo recebeu microbiota de camundongos tratados com dieta contendo selênio. A partir disto, ambos os grupos receberam diferentes concentrações de selênio sob a forma de selenito (0,0, 0,1, 0,4 e 2,25 µg selênio/g) na dieta, durante 8 semanas. O grupo que recebeu microbiota tratada com selênio apresentou aumento da diversidade da microbiota intestinal (KASAIKINA *et al.,* 2011).

Ainda no mesmo estudo, observou-se redução de *Parabacteroides* e aumento de Bacteriodetes, principalmente na dieta com concentração de 0,4 µg selênio/g. Além disso, o selênio da dieta influenciou a expressão de selenoproteínas em ambos os grupos. Contudo, o grupo *germ free* apresentou maior expressão e atividade de GPX1 e metionina-R-sulfóxido redutase 1 (MsrB1) no fígado e nos rins. Os estudos sugerem interação do selênio da dieta na composição da microbiota intestinal e colonização do trato gastrointestinal de camundongos, que, por sua vez, pode influenciar no *status* do mineral do hospedeiro e expressão de selenoproteínas (KASAIKINA *et al.,* 2011).

Diante da interação entre diabetes e inflamação, considerando a importância do selênio em aspectos já discutidos anteriormente na inflamação, e o papel da microbiota intestinal nesse contexto, sobretudo no diabetes, é oportuno o estudo dessas ações em conjunto que visem avaliar o efeito da ingestão de alimentos fonte de selênio na modulação da microbiota e da inflamação frente a melhora do *status* desse micronutriente em indivíduos com diabetes.

3. HIPÓTESE EXPERIMENTAL

A ingestão de castanha-do-brasil (*Bertholletia* excelsa H.B.K.) influencia o estado nutricional relativo ao selênio de indivíduos adultos com diabetes *mellitus* tipo 2, assim como melhora o quadro inflamatório e modula positivamente a composição da microbiota intestinal.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar os efeitos da ingestão de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) em indivíduos adultos com diabetes *mellitus* tipo 2, com relação ao estado nutricional relativo ao selênio, aos biomarcadores inflamatórios e sobre a composição da microbiota intestinal.

4.2 Específicos

- Caracterizar a castanha-do-brasil quanto a composição centesimal e a concentração de selênio;
- Avaliar os dados antropométricos e a ingestão alimentar de macronutrientes e de selênio dos participantes antes e após a ingestão da castanha-do-brasil;
- Analisar as variáveis do controle glicêmico, perfil lipídico e marcadores bioquímicos de inflamação e de permeabilidade intestinal antes e após a ingestão da castanha-do-brasil;
- Analisar as variáveis bioquímicas do estado nutricional relativo ao selênio antes e após a intervenção com castanha-do-brasil;
- Avaliar a composição da microbiota intestinal antes e após a intervenção com castanha-do-brasil e relacioná-la com as demais variáveis bioquímicas avaliadas.

5. CASUÍSTICA

5.1 Protocolo Experimental

Este é um estudo prospectivo de intervenção, composto por dois momentos de avaliação, o tempo basal (Tempo 0 - T0) e após a intervenção (Tempo 1 – T1), no qual os participantes receberam 1 noz de castanha-do-brasil por dia (aproximadamente 320 μg de selênio/dia), durante 60 dias.

Em ambos os tempos foram realizadas: uma coleta de fezes para caracterização da microbiota intestinal e uma coleta de sangue para análises de biomarcadores inflamatórios, parâmetros para avaliação do estado nutricional em relação ao selênio e da permeabilidade intestinal.

Também foi realizada a avaliação antropométrica, com medidas de peso, estatura, para cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC) e circunferência da cintura (cc). A avaliação da ingestão alimentar foi realizada por meio de Registro Alimentar de 3 dias (sendo um dia no final de semana) (ANEXO 4).

Para caracterização dos participantes, foi aplicado um questionário sobre informações socioeconômicas, nível de atividade física, tempo de diagnóstico da doença, antecedentes familiares para doenças crônicas não transmissíveis, uso de medicamentos, presença de animais de estimação na casa e forma de nascimento (parto normal ou cesária).

5.2. Aspectos Éticos

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e dado ciência no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP), sob o Parecer número: 1.757.364 (ANEXO 1).

Todos os participantes foram esclarecidos sobre os procedimentos aos quais seriam submetidos e o destino do material biológico coletado, assim como, a demanda de tempo necessária para a realização do estudo. Foram informados também sobre o direito de desistir de participar da pesquisa em qualquer momento, sem constrangimentos ou prejuízos ao seu atendimento no ambulatório, como descrito no

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), assinado e entregue aos participantes. O TCLE descreve ainda informações sobre o projeto, de acordo com a Resolução CNS nº 510/2016, itens III, IV e V, que tratam da proteção dos participantes e orienta procedimentos referentes às pesquisas que necessitam experiências com humanos (ANEXO 2).

5.3. Seleção dos Participantes

Foram convidados para participar da pesquisa 112 pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2, de ambos sexos, com idade entre 30 e 60 anos de idade, atendidos no ambulatório de endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

5.4 Critérios de inclusão

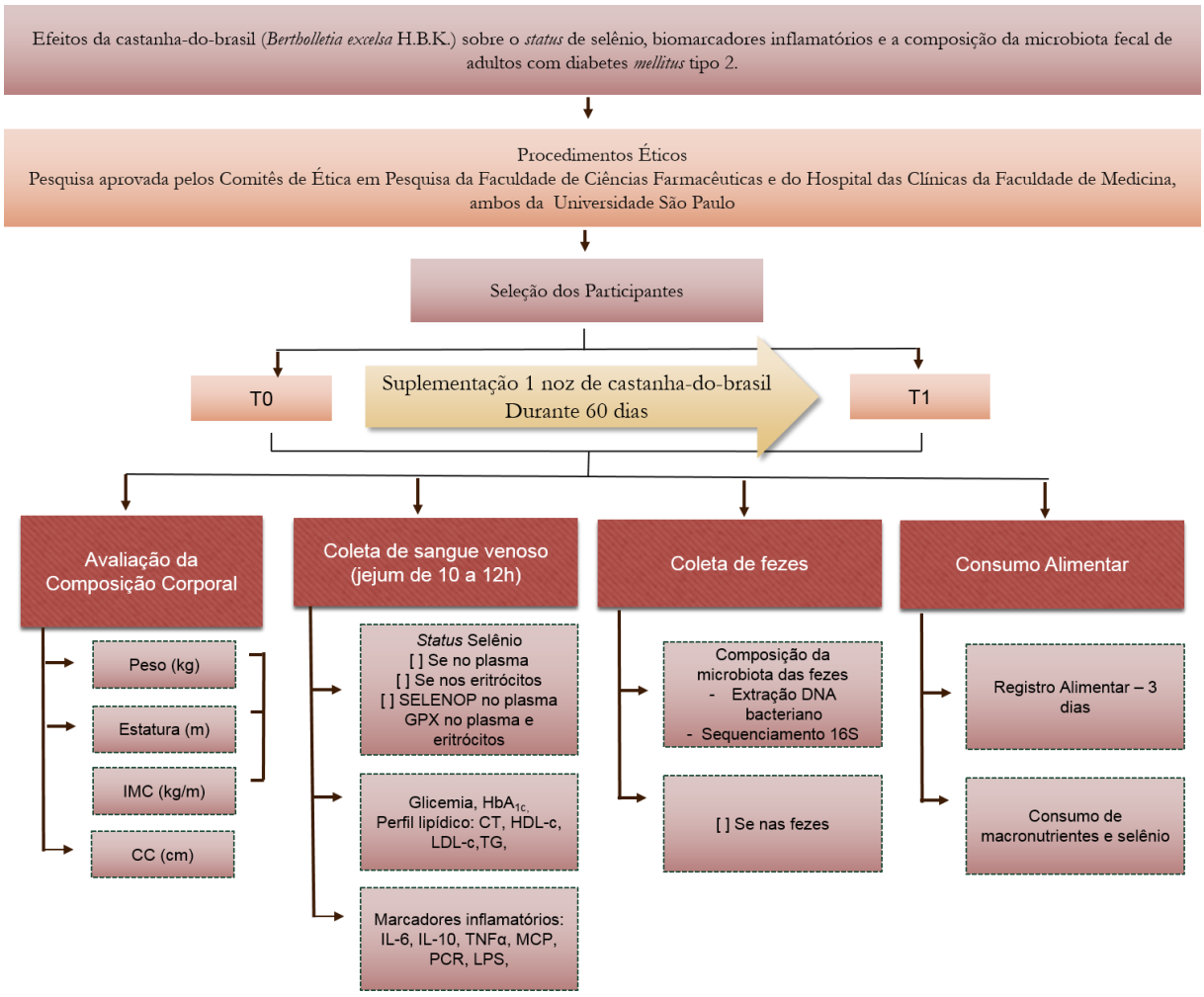
Foram incluídos na pesquisa voluntários com diagnóstico de diabetes *mellitus* tipo 2, que não estivessem fazendo uso de suplementos vitamínico-mineral, probióticos, antibióticos, inibidores, bomba de prótons, antagonistas do receptor H2, antidepressivos, antiácidos, laxativos ou castanha-do-brasil e não ter alergia a oleaginosas. Não fumantes ou que não consumissem bebida alcóolica com regularidade. Sem histórico de doença renal, hepática ou distúrbios da tireoide.

5.5. Critérios de exclusão

Não foram incluídos no estudo os participantes que faltaram para a segunda fase da pesquisa (T1) (n=21) ou que não entregaram o Registro Alimentar de 3 dias (n=02) ou ainda que não realizaram a coleta das fezes (n=04)

O Fluxograma do estudo está apresentado na **Figura 7**.

Figura 7. Fluxograma das atividades do estudo. São Paulo, 2019.



Legenda: T0: Tempo 0; T1: Tempo1; IMC: Índice de massa corporal; CC: circunferência da cintura; Se: selênio; SELENOP: Selenoproteína P; $HbA_{1c:}$ hemoglobina glicada; CT: colesterol total; HDL-c: lipoproteína de alta densidade; LDL-c: lipoproteína de baixa densidadel; TG: triacilglicerol; IL6: interleucina 6; IL10: interleucina 10; TNF-α: Fator de necrose tumoral; MCP: Proteína quimiotática de monócitos; PCR: Proteína C reativa; LPS: lipopolissacarídeo.

6.MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Caracterização da castanha-do-brasil

As castanhas-do brasil utilizadas nessa pesquisa foram fornecidas pela empresa Agropecuária Aruanã S/A (Itacotiara-AM). As castanhas foram trituradas para análises de composição centesimal, perfil de ácidos graxos e concentração de selênio e demais minerais (zinco, cobre, manganês, magnésio).

As análises de composição centesimal, as cinzas e lipídeos, foram conduzidas de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz e da *Association of Official Analyctical Chemists* (AOAC) (2006) para análise de proteínas. A concentração de minerais foi determinada pelo método de espectrofotometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, Perkin Elmer DRC II), previamente padronizado pelo Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (BATISTA, *et al.,* 2009). A determinação de carboidratos foi estimada por diferença.

Os ácidos graxos presentes na castanha foram extraídos segundo o método descrito por Folch, Lee e Stanley (1957). Em seguida, os lipídios foram transformados em ésteres metílicos para a identificação e quantificação por cromatografia gasosa de acordo com a metodologia descrita pela AOAC (2002).

6.2 . Avaliação Antropométrica

6.2.1. Peso

Para aferição do peso foi utilizada balança antropométrica com graduação de 100g. Os participantes foram posicionados no centro da balança, com roupas leves e sem calçados, em posição ereta e com os braços estendidos ao longo do corpo.

6.2.2. Estatura

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

6.2.3. Índice de massa corpórea

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

6.2.4. Circunferência da cintura

A circunferência da cintura foi medida no ponto médio entre o rebordo costal inferior e a crista ilíaca, segundo orientação, utilizando fita métrica não elástica (SBC, 2017). A circunferência da cintura foi realizada logo após a medição da estatura, para que o participante mantivesse a mesma posição.

6.2.5. Avaliação da ingestão alimentar

Para avaliação da ingestão alimentar foi utilizado o método de Registro Alimentar de 3 dias, com o registro de todos os alimentos consumidos em dois dias durante a semana, mais um dia no final de semana, em ambos os tempos (T0 e T1).

A ingestão alimentar foi calculada utilizando a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) e a Tabela *United States Department of Agriculture* (USDA).

A adequação das dietas foi realizada por meio da *Dietary Reference Intakes* (DRI), considerando os macronutrientes e selênio. A necessidade estimada de energia (EER - *Estimated Energy Requeriment*) foi calculada para obter a adequação energética das dietas dos participantes, segundo preconizado pelo *Institute of Medicine* (2002). Os valores da ingestão de selênio foram ajustados pela energia quando os resultados apresentaram distribuição normal segundo o método residual proposto por *Willet* (1998).

6.3 Coleta dos materiais biológicos

6.3.1 Sangue

Amostras de 20 mL de sangue foram coletadas no período da manhã, estando os participantes em jejum de no mínimo 10h, distribuídos em tubos com EDTA para análise da concentração de selênio e um tubo sem coagulante para determinação do perfil lipídico e marcadores de inflamação.

Após a coleta, o plasma e o soro foram separados do sangue total por centrifugação a 3.000 rpm, durante 15 minutos, a 4°C, sendo acondicionados em microtubos de polipropileno e armazenados a -80°C para posterior análise. Em seguida, a massa eritrocitária obtida do sangue total foi lavada três vezes com 5mL de solução salina a 0,9%, homogeneizada lentamente por inversão e centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos a 4ºC, sendo o sobrenadante descartado. Após a última centrifugação, a solução salina foi aspirada e a massa de eritrócitos foi cuidadosamente extraída com micropipeta e colocada em microtubos de polipropileno e armazenada a -80ºC até o momento da análise.

6.3.2. Fezes

As amostras de fezes dos participantes foram coletadas em recipientes plásticos esterilizados e armazenadas em refrigeração, desde o momento da coleta, sendo mantida em gelo durante o transporte até entrega ao pesquisador. O período entre a coleta das fezes e o armazenamento a -80ºC não excedeu o prazo de 12 horas. As amostras foram separadas em alíquotas e armazenadas em tubos criogênicos de 2 ml, a -80 ºC, para posterior análises de selênio nas fezes e isolamento de DNA para avaliação da composição da microbiota intestinal.

6.4. Parâmetros bioquímicos de avaliação do selênio

6.4.1. Determinação de selênio no plasma, eritrócitos e fezes

As concentrações de selênio no plasma, nos eritrócitos e nas fezes foram determinadas pelo método de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS Perkin Elmer DRC II). Para isso, 100 µg/L de amostra foram diluídos na proporção de 1:50 em um tubo de polipropileno desmineralizado, contendo solução de Triton X-100 a 0,01% e ácido nítrico a 0,5% (v/v), conforme descrito por Batista *et al*. (2009). As análises foram realizadas no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de

Metais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade São Paulo (Ribeirão Preto - SP).

6.5. Determinação enzimática

6.5.1.Glutationa peroxidase

A atividade da enzima GPX foi determinada nos eritrócitos. Esta análise foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Paglia & Valentine (1967), em um analisador bioquímico Labmax 240, usando kit disponível comercialmente (Ransel; Randox Laboratories, UK). Também foi determinada a concentração de hemoglobina, e a atividade da enzima foi expressa em U/g de hemoglobina.

6.5.2. Determinação da concentração plasmática de SELENOP

A determinação da concentração de SELENOP foi realizada por ensaio imunoenzimático indireto (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay -ELISA), como descrito pelo fabricante (Cloud-Clone Corp.®; Texas, EUA).

6.6. Determinações dos parâmetros glicêmicos e lipídicos

A determinação da glicemia foi realizada pelo método enzimático e a determinação do percentual de hemoglobina glicada foi dosada pelo método de turbidimetria, reconhecido pela *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP). Ambas determinações foram realizadas com os kits comerciais Glicose Liquiform® e HbA_{1c} turbiquest® (Lagoa Santa-Minas Gerais, Brasil), respectivamente.

As concentrações de colesterol plasmático total, HDL-colesterol. LDL-colesterol e triglicerídeos foram realizadas por métodos enzimáticos comerciais Colesterol Liquiform®, HDL, LDL Liquiform® e Triglicérides Liquiform® (Labtest, Lagoa Santa-Minas Gerais, Brasil), respectivamente.

6.7 Determinação dos marcadores inflamatórios e permeabilidade intestinal

A determinação das citocinas IL-8, IL-1B, IL-10, TNF, IL-12p70 foi realizada no plasma, por meio da CBA *Human Inflammatory Cytokines* Kit (BD). A concentração sérica da proteína de ligação de lipopolissacarídeo (LBP) foi determinada no plasma por imunoadsorção (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - ELISA), conforme protocolo proposto no kit comercializado por Cloud-Clone Corp® (Katy, Texas, EA).

6.8. Análise da composição da microbiota intestinal

A extração do DNA bacteriano das amostras de fezes foi realizada utilizando o PSP® *Spin Stool DNA kit* (Stratec®, Berlim, Alemanha), de acordo com instruções do fabricante, e quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific®, Massachusetts, EUA). As amostras foram armazenadas a -80ºC até o momento da análise.

O DNA isolado foi utilizado como molde para amplificação do gene codificador de RNA ribossomal 16S (RNAr 16S) na região V1-V2 por reações de polimerase em cadeia (PCR), adicionando-se *primers* específicos para bactérias (27F e 338R), como descrito por Caporaso *et al.* (2012). Após o PCR, todas as amostras foram purificadas usando AGENCOURT AMPure XP Beads (Beckman Coulter®, Brea, CA, EUA) e testadas por gel de eletroforese para averiguar a qualidade e o tamanho do DNA.

A biblioteca de DNA foi preparada com alíquotas de todas as amostras e purificada por meio do kit silica-membrane based NucleoSpin clean-up (Machery-Nagel GmbH & Co., Duren, Alemanha). Finalmente, a biblioteca foi sequenciada na plataforma Illumina MiSeq®System (Illumina INC, San Diego, CA, EUA) pelo Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa – Universidade de São Paulo (CEFAP-USP/GENIAL).

6.9 Análise de Bioinformática

Os dados brutos do sequenciamento foram processados utilizando o *pipeline Quantitative Insight into Microbial Ecology* (QIIME, versão 1.9.0), usando os parâmetros padrões do programa (CAPORASO *et al*., 2010). A quantidade de

leituras foi normalizada e rarefeita em 9800 sequências para excluir a profundidade diferente de sequenciamento entre as amostras. Após o pré-processamento, as sequências *paired-end* foram unidas baseadas nas regiões sobrepostas (join_paired_ends.py). As sequências representativas foram filtradas por qualidade e clusterizadas em OTUs (*operational taxonomic units*) pelo método UCLUST (*open reference*) com 97% de similaridade (pick_otus.py e pick_rep_set.py) e o banco de referência SILVA (*release* 132) (QUAST *et al*., 2013) foi utilizado para atribuir taxonomia (assign_taxonomy.py).

Os dados do microbioma foram analisados utilizando o *software* R versão 1.1.463 (http://www.r-project.org). Todas as análises estatísticas pareadas para comparar o T0 e T1 foram realizadas com o teste *Wilcoxon.* O nível de significância adotado foi de 5%. A alfa diversidade foi calculada pelos índices: abundância relativa (índice Shannon) e absoluta (Espécies observadas), diversidade estimada (Chao1) e filogenética (Diversidade filogenética) com comando core_diversity.py no QIIME. A partir desse comando, determinou-se também a abundância das bactérias em nos níveis taxonômicos filo, classe, ordem, família e gênero.

A beta diversidade das amostras foi medida pelas matrizes de distâncias ponderadas UniFrac baseadas em dados de abundância quantitativa (*weighted*) e presença-ausência (*unweighted*) de espécies, gerados usando o pacote *Vegan* dentro do pacote R. A análise multivariada permutacional de variância (PERMANOVA) permitiu avaliar os efeitos globais da intervenção com castanha-do-brasil, bem como a relação com as covariáveis de interesse, avaliadas, sobre a composição do microbioma dos indivíduos (ANDERSON, 2001; LOZUPONE *et al*., 2010). A análise de coordenada principal (PCoA) com as métricas de distâncias UniFrac foi realizada para visualizar a variação e separação das amostras.

Os enterótipos foram identificados seguindo o protocolo descrito por (ARUMUGAM *et al*., 2011) e disponível em http://enterotype.embl.de/enterotypes.html. As amostras foram clusterizadas de acordo com as distâncias UniFrac. O número ótimo de clusters foi estimado pelo índice Calinski-Harabasz (CH) e avaliado pela técnica de validação *silhouette* quanto sua robustez.

Os gêneros identificados nas amostras também foram avaliados quanto a variação de sua abundância entre os tempos (delta = T1 - T0). A relação entre o

delta das variáveis bioquímicas e dos gêneros foi avaliada pelo teste de correlação Pearson com a biblioteca *reshape2* no R. Para visualização dos dados, construiu-se um mapa de calor (*heatmap*) com os valores de coeficiente de correlação (R) e com marcações das correlações significativas ($p<0,05$).

Por fim, as abundâncias das OTUs foram comparadas entre os tempos pelo teste t não paramétrico e aquelas que sofreram alteração significativa ($p<0,05$) com a intervenção foram exploradas na análise de regressão linear. O modelo de regressão linear também foi utilizado para analisar a associação entre gêneros e parâmetros bioquímicos com os pacotes *lme4* e *lmerTest* no R, ajustada pelos efeitos aleatórios (variação interpessoal).

6.9. Controle de contaminação

Todo o material utilizado para análises de selênio foi desmineralizado em banho de ácido nítrico a 30%, pelo período mínimo de 12 horas, e enxaguado pelo menos 10 vezes consecutivas com água nanopura, minimizando assim a contaminação por minerais. O material utilizado nas demais determinações foi esterilizado.

6.10. Avaliação estatística

Os resultados foram analisados e apresentados em média e desvio-padrão, frequência absoluta (n) e relativa (%). Utilizou-se o programa *Statistical Package for the Social Sciences,* versão 23.0 (SPSS, Chicago, IL, USA), e o R versão 1.1.463 para a análise dos dados. Para avaliar o efeito da intervenção sobre as variáveis apresentadas, aplicou-se o teste *Wilcoxon* para amostras dependentes. Considerou-se p-valor menor que 0,05 para discriminação de médias estatisticamente diferentes. Além disso, quando apropriado, o valor de p foi corrigido de acordo com o método de controle de *False Discovery Rate* (FDR) proposto por Benjamini & Hochberg (1995), que reduz a proporção de falsos positivos.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Caracterização da castanha-do-brasil

A composição centesimal e a concentração de minerais foram determinadas em amostras aleatórias das castanhas utilizadas nesse estudo. As castanhas apresentaram altas concentrações lipídicas (72,64%), seguida de proteínas (15,91%) e dos carboidratos (11,47%), resultados semelhantes foram encontrados por Stockler-Pinto *et al.* (2015), com percentual de 75% de lipídeos, 15% de proteínas e 10% carboidratos.

Além dos macronutrientes a castanha-do-brasil, também fornece micronutrientes e compostos bioativos. Merece destaque o alto teor de selênio dessa oleaginosa, sendo considerada como excelente fonte desse mineral (CARDOSO *et al.,* 2017; GARCIA-ALOY *et al.,* 2019).

A concentração de selênio presente nos alimentos depende principalmente da concentração desse elemento no solo. Nesse sentido, foi avaliada a concentração de selênio de castanhas-do-brasil de 71 castanheiras, de diferentes localizações do Brasil, onde se observou a variação do teor de selênio de < 0,5 a 146,6 mg de selênio por kg^{-1}. (SILVA JUNIOR *et al.,* 2017). A quantidade de selênio encontrada em uma noz da castanha-do-brasil, com peso médio de 5g, utilizada nesse estudo, foi de 395,5μg de selênio. Na **Tabela 1** encontram-se os dados da caracterização das castanhas-do-brasil utilizadas nesse estudo.

Tabela 1. Composição centesimal das castanhas-do-brasil (*Bertholletia excelsa* BHK) utilizadas neste estudo. São Paulo, 2019.

Variável	100 g	1 noz (5 g)
Energia (kcal)	685,1±18,1	34,6±1,1
Umidade (%)	0,9±0,0	0,0±0,0
Proteína (g)	17,0 ± 0,4	0,8 ±0,0
Lipídios (g)	63,3 ± 2,0	3,0±0,0
Carboidratos (g)	19,8± 3,8	0,9±0,2
Cinzas (g)	2,6±0,2	0,2±0,0
Selênio (mg)	8,0±1,6	0,4±0,5

Resultados em média ± desvio padrão.

Apesar da grande proporção lipídica, a castanha-do-brasil não é considerada fonte desse macronutriente, visto que a quantidade de lipídeos fornecida por meio da ingestão de uma noz de castanha de uma noz de castanha é de 3g (27 kcal), que corresponde a aproximadamente 6% da ingestão habitual dos participantes. A composição dos ácidos graxos presentes na castanha-do-brasil, utilizadas nesse estudo foi de nesse estudo encontra-se na **Tabela 2**.

Tabela 2. Perfil de ácidos graxos da castanha-do-brasil. São Paulo, 2019.

Composto	Ácidos graxos	Concentração (%)
C 18:2c	Linoléico	42,16 ± 0,14
C 18:1c	Oleico	31,24 ± 0,05
C 16:0	Palmítico	14,74 ± 0,09
C 18:0	Esteárico	10,88 ± 0,05
C 16:1	Palmitoléico	0,35 ± 0,02
C 20:3 ω-3	Eicosatrienóico	0,14 ± 0,01
C 20:0	Araquídico	0,24 ± 0,02
C 17:0	Margárico	0,07 ± 0,0
C 14:0	Mirístico	0,05 ± 0,0
C 18:3	Linolênico	0,05 ± 0,0
C 22:0	Behenico	0,05 ± 0,0
C 20:1	Gadoléico	0,05 ± 0,0
C 17:1	Heptadecenóico	0,02 ± 0,0
-	Não identificado	0,1 ± 0,01

Resultados em média ± desvio padrão.

7.2 Caracterização dos indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2.

Durante o período de seleção e de acordo com os critérios de inclusão, foram convidados 135 voluntários. Destes, 70 aceitaram o convite, mas somente 56 voluntários compareceram à primeira coleta (T0) e 29 participantes concluíram a pesquisa, retornando após o período de intervenção com a castanha (T1). A média da idade dos participantes foi 54,9±3,6 anos, sendo 11,7±6,9 anos o tempo médio de diagnóstico da doença.

Os participantes não utilizaram suplemento vitamínico-mineral, antibióticos ou probióticos, por pelo menos 4 meses antes do início do estudo. Não

apresentavam doenças associados ao diabetes. No entanto, todos relataram pelo menos 1 caso de doença no histórico familiar como: diabetes *mellitus* (68,97%), hipertensão arterial (68,97%), dislipidemia (20,69%), doença cardiovascular (27,59%), doença renal (17,24%) e câncer (48,28%). Os aspectos socioeconômicos estão apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Características socioeconômicas dos participantes. São Paulo, 2019.

Variável	N	%
Gênero		
Masculino	15	51,7
Etnia		
Branco	14	48,28
Pardo	9	20,69
Negro	6	31,03
Renda familiar		
2-4 SM	13	44,8
5-7 SM	10	34,5
> 8 SM	6	20,7
Escolaridade		
Ensino fundamental incompleto	2	6,9
Ensino fundamental completo	1	3,4
Ensino médio incompleto	14	48,3
Ensino médio completo	1	3,4
Ensino superior incompleto	2	6,9
Ensino superior completo	9	31,0
Estado civil		
Solteiro	9	31,0
Casado	16	55,2
Divorciado	3	10,3
Viúvo	1	3,4
Prática de atividade Física		
Não	16	55,2

Dados apresentados em frequência absoluta (n) e relativa (%).
Legenda: SM: salário mínimo vigente durante o estudo (R$937,00).

Mais da metade dos participantes (55%) relataram não praticar nenhum tipo de atividade física. Em relação ao consumo de bebida alcoólica, 17,24% da população avaliada tinha hábito de ingerir bebida alcoólica (cerveja ou vinho) 1 vez por semana e 69% dos participantes nunca fumaram, sendo 31% ex fumante a pelo menos 10 anos. Entre as mulheres avaliadas 11 (38%) tinham pelo menos 1 filho, com idade mínima de 14 anos. Todos os participantes utilizavam o medicamento da classe biguanidas (metformina) para controle glicêmico. Associado ao uso desse medicamento 2 participantes (6,9%) ainda faziam uso de 6U de insulina NPH (*Neutral Protamine Hagedorn*) 3x ao dia, para controle glicêmico. Em relação ao tipo de parto, a maioria dos participantes 25 (86,2%) relataram nascimento de parto normal, quanto ao aleitamento materno 16 (55%) dos participantes não souberam informar; 6 (27%) foram amamentados mais que 6 meses; 2 (6,9%) foram amamentados até os 6 meses de idade e 5 (17%) não foram amamentados.

7.3 Avaliação antropométrica dos indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2

Não foi observada diferença nos dados antropométricos entre os tempos avaliados. Resultados apresentados na **Tabela 4.**

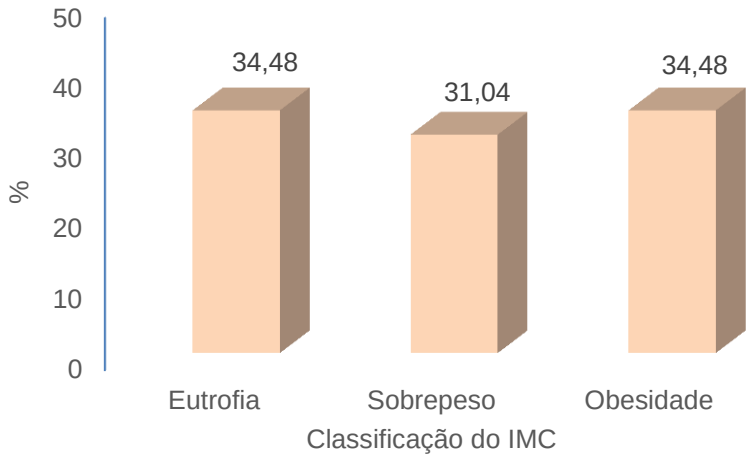
Tabela 4. Características antropométricas dos indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2. São Paulo, 2019

Características	T0	T1	*p-valor*
Peso (kg)	76,5 (18,3) 74,80 (50,40 – 136,3)	76,9 (18,4) 74,80 (50,40 – 132,3)	0,227
Estatura (m)	1,7 (0,1) 1,65 (1,48 – 1,87)	1,7 (0,1) 1,65 (1,48 – 1,87)	1,000
CC (cm)	96,6 (8,3) 95 (80 – 129)	96,2 (7,9) 94 (80 – 128)	0,217
IMC (kg/(m)²)	26,94 (4,8) 26,67 (18,61 – 38,56)	27,7 (5,3) 27,52 (18,6 – 42,16)	0,710
RCE	0,59 (0,06) 0,58 (0,49 – 0,71)	0,55 (0,06) 0,58 (0,49 – 0,71)	1,000
IC	1,32 (0,13) 1,31 (1,07 – 1,66)	1,30 (0,13) 1,31 (1,05 – 1,66)	0,856

Resultados apresentados em média (desvio padrão); mediana (valor mínimo – valor máximo). Não foram observadas diferenças entre os tempos T0 e T1 ($p<0,05$) - Test Wilcoxon - amostras pareadas.
Legenda: IMC: índice de massa corporal; CC: circunferência da cintura; RCE: Razão Cintura Estatura; IC: Índice de conicidade.

O ponto de corte do IMC para adultos é baseado na relação entre o índice e o desenvolvimento de doenças crônicas ou mortalidade. Desse modo, a classificação de sobrepeso e obesidade indicam risco aumentado e muito aumentado, respectivamente, de desenvolver doenças crônicas. Essa classificação segue padrões internacionais, desenvolvidos para pessoas adultas e de descendência europeia (ABESO, 2016). A distribuição dos participantes segundo classificação IMC está apresentada na **Figura 08.**

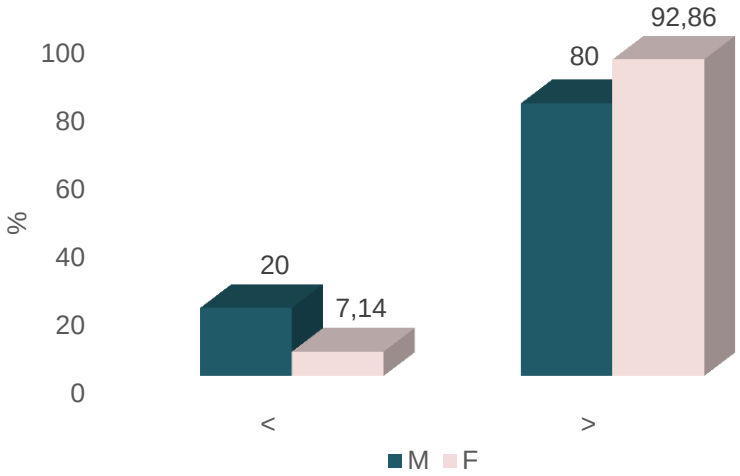
Figura 08. Distribuição percentual dos indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2, segundo a classificação do estado nutricional pelo IMC, proposto pela *World Health Organization* (2000), São Paulo, 2019.



O aumento do IMC está associado ao risco aumentado de desenvolver complicações secundárias do DM2. Estudo avaliou mulheres com DM2 e o grupo com IMC ≥ 40 apresentou risco de desenvolver resistência à insulina (OR = 3,57) e doença cardiovascular (OD = 2,45), esses valores foram maiores, quase o dobro quando comparados ao grupo de mulheres com IMC ≤ 25 a 27, que apresentaram valores de OR = 1,7 e OR = 1,15-1,54, para risco de resistência à insulina e doença cardiovascular, respectivamente, todas as análises com IC 95% (GRAY *et al.,* 2015).

Uma vez que o IMC não distingue massa gordurosa de massa magra, a medida da circunferência da cintura é indica para avaliar a distribuição da gordura intra-abdominal, auxiliando na avaliação do risco de desenvolver doenças crônicas. Essa medida apresenta diferentes pontos de corte para homens e mulheres, sendo risco cardiovascular aumentado para medida de circunferência abdominal igual ou superior a 90 cm em homens e 80 cm em mulheres (ABESO, 2016). A distribuição percentual dos participantes segundo a avaliação da circunferência da cintura está apresentada na **Figura 09**.

Figura 09. Distribuição percentual dos indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2, segundo a classificação da circunferência da cintura (ABESO, 2016). São Paulo, 2019.



Legenda: < abaixo do ponto de corte; > acima do ponto de corte; H: sexo masculino; F: sexo feminino. Pontos de corte: sexo masculino: 90cm; sexo feminino: 80cm.

A adiposidade abdominal promove alterações metabólicas, como a resistência à ação da insulina. O aumento do tecido adiposo visceral está relacionado ao aumento de gordura em outros órgãos, como fígado e coração, sendo um importante marcador da distribuição de gordura corporal. Provavelmente há um ou mais componentes genéticos que determinam a capacidade de expansão e acúmulo de gordura ectópica intra-abdominal (FONTELA *et al.,* 2017; SMITH, 2015, CORNIER *et al.,* 2011).

A utilização de indicadores de baixo custo, pouco invasivos e de fácil aplicabilidade tem se apresentado como uma boa estratégia para predizer alterações

metabólicas e risco de desenvolver doenças crônicas, oriundas do acúmulo da gordura abdominal. Dentre esses indicadores destaca-se a Relação Cintura Estatura (RCE) e o Índice de conicidade (IC) (FONTELA *et al.,* 2017)

A relação entre a circunferência da cintura e a estatura (RCE) baseia-se no pressuposto de que, para determinada estatura, há um grau aceitável de gordura armazenada na parte superior do corpo. Esse indicador tem sido proposto para avaliar adiposidade central por estar fortemente associado aos fatores de risco cardiometabólicos, incluindo hiperinsulinemia de jejum. Além da simplicidade da execução, a RCE apesenta um único ponto de corte universal para classificação (0,5), determinando o balanço entre sensibilidade e especificidade (VASQUES *et al.,* 2010).

O IC baseia-se na ideia do corpo humano como um cilindro, e a medida em que a gordura é acumulada ao redor da cintura, o corpo altera sua forma de cilindro para forma semelhante a dois cones com uma base. Fórmula utilizada para o cálculo do Índice de Conicidade está apresentada na **Figura 10**.

Figura 10. Fórmula do Índice de Conicidade.

$$\text{Índice C} = \frac{\text{Circunferência Cintura (m)}}{0{,}109\sqrt{\dfrac{\text{Peso Corporal (kg)}}{\text{Estatura (m)}}}}$$

Legenda: Índice C: Índice de conicidade.

O valor 0,109 utilizado na forma consiste na constante que resulta da raiz da razão entre 4¶, originado da dedução do perímetro do círculo de um cilindro, e a densidade média do corpo humano de 1050 kg/m³. Assim, o denominador é o

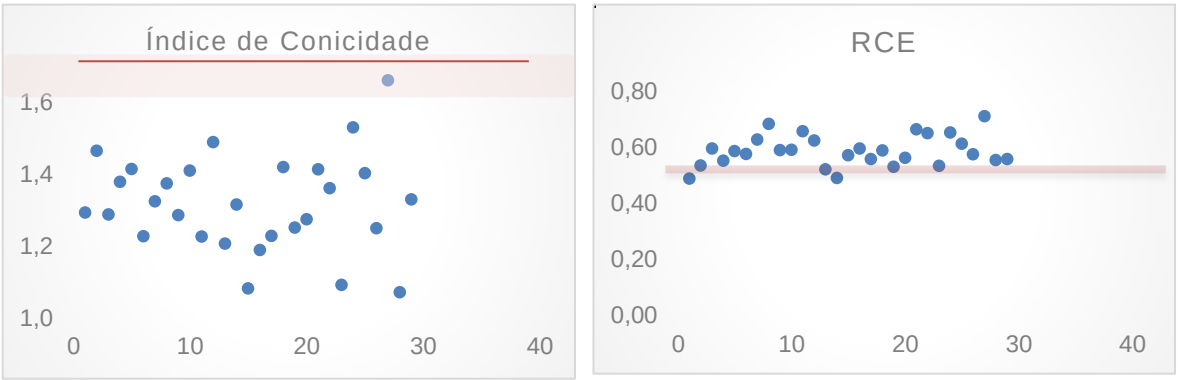
cilindro produzido pelo peso e estatura de determinado indivíduo (VALDEZ *et al.,* 1993)

A média do Índice de Conicidade foi de 1,30, o que significa que o grupo, em média, apresentou a circunferência do abdômen, considerando estatura e peso, 1,30 vezes maior que a circunferência sem gordura abdominal. O intervalo teórico desse

indicador é de 1,00 (cilindro perfeito) a 1,73 (cone duplo), quanto maior o acúmulo de gordura na região abdominal, mais próximo de 1,73, aumentando o risco de desenvolver distúrbios metabólicos e doenças crônicas.

Os indicadores RCE e Índice C são bons indicadores do risco de resistência a ação da insulina. Importante ressaltar a influência de outras variáveis, como fatores genéticos e estilo de vida na modulação da ação deste hormônio (VASQUEZ, 2010). Não foram encontradas diferenças no ponto médio dos Índices, antes e após a intervenção com a castanha-do-brasil. Em relação a RCE todos os participantes apresentam riso aumentado. Diferente do resultado observado para o Índice C, o qual não houve risco aumentado. Com base nesses dados, não podemos inferir que os participantes têm resistência à ação da insulina. A distribuição dos participantes, segundo a classificação do Índice de conicidade e RCE está apresentada na **Figura 11**.

Figura 11. Distribuição dos participantes segundo Índice de Conicidade e Razão Cintura/Estatura. São Paulo, 2019.



Legenda: RCE: Razão Cintura Estatura.

7.4. Avaliação da Ingestão alimentar dos indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2.

A alimentação é fundamental e ao mesmo tempo desafiadora para os indivíduos com diabetes. O plano alimentar, como em todos os casos, mas especialmente no diabetes tipo 2, deve ser individual e o paciente deve estar engajado na educação alimentar para que a terapia obtenha melhor resultado. De modo geral,

alimentos fonte de carboidratos complexos e proteínas são indicados para controle glicêmico (ADA, 2019). Os dados da ingestão alimentar dos participantes desta pesquisa estão apresentados na **Tabela 05**.

Tabela 05. Valores de ingestão de energia, macronutrientes, ácidos graxos saturados, mono poli-insaturados e selênio dos pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2, nos dois tempos de avaliação. São Paulo, 2019.

Nutriente	T0	T1*	p-valor$^{\Omega}$	Referência
Energia (kcal)	1324,58 ± 552,46	1370,85 ± 397,45	0,53	-
Carboidratos (g)	148,81 ± 62,17	148,37 ± 46,99	0,53	45 – 65%**
Carboidratos (%)	46,0	47,2		
Proteínas (g)	68,54 ± 33,22	69,43 ± 28,28	0,53	10 – 35%**
Proteínas (%)	21,7	22,9		
Lipídeos (g)	46,01 ± 23,62	51,98 ± 19,67	0,54	20 – 35%**
	32,26	30,0		
Colesterol (mg)	220,09 ± 147,35	210,17 ± 96,85	0,78	<200[2]
G. Monoinsaturadas (g)	14,35 ± 8,06	14,70 ± 7,53	0,82	-
G. Poliinsaturadas (g)	9,51 ± 4,89	8,72 ± 3,63	0,06	-
G. Saturadas (g)	15,08 ± 8,19	15,79 ± 6,95	0,75	< 7% [2,3]
G. *Trans* (g)	1,09 ± 0,56	1,47 ± 1,33	0,39	-
Fibras (g)‡	15,76 ± 7,55	15,29 ± 5,72	0,56	38 / 25 [4,5]
Selênio (μg)	37, 09 ± 56,80	429,66 ± 55,42	0,000	45 [1]

Resultados em média ± desvio padrão. Legenda: $^{\Omega}$Teste wilcoxon para amostras pareadas com os valores residuais de cada nutriente; - Não recomendação especifica para o diabetes; ‡ sem os valores da castanha-do-brasil [1]Necessidade Média Estimada (EAR/DRI/2014), [2]IDF (2017); [3]Calculado sobre a quantidade total de gorduras; [4]Homens / Mulheres; [5]Ingestão

adequada (AI/DRI/2005) **Faixa de distribuição de macronutrientes aceitável (AMDR/DRI). T0: Tempo 0; T1: Tempo 1.

Não houve diferença significante da ingestão de macronutrientes entre os tempos avaliados. Os estudos ainda são inconclusivos acerca da distribuição específica de macronutrientes indicada para o tratamento do diabetes (EMADIAN *et al.,* 2015). Contudo, o mais importante é manter a ênfase em padrões saudáveis de alimentação para o diabetes, como a dieta do mediterrâneo (BOUCHER, 2017), dieta baseada em vegetais (PAWLAK, 2017), e DASH do inglês *Dietary Approaches to Stop Hypertension* (CAMPBELL, 2017), as quais abordam alimentos ricos e diversos nutrientes e retirando o foco de nutrientes específicos, surgindo como boa estratégia para o tratamento do diabetes tipo 2 (MARINYUK, 2017). Dessa maneira, considerando a ausência de uma referência específica para avaliação da adequação da ingestão de macronutrientes para indivíduos com DM2, utilizamos como parâmetros *Dietary Reference Intakes* (DRI), propostos pelo *Institute of Medicine* (IOM), indicados para população sem doença.

LEY *et al* (2014) em uma ampla revisão evidenciaram que a ingestão de proteína na ordem de 20% a 30% foi eficiente em aumentar a saciedade, auxiliando na redução de peso de indivíduos com DM2. Além disso, a ingestão de proteínas pode aumentar a resposta da insulina (ADA, 2019).

Em relação aos carboidratos a ingestão deve enfatizar alimentos ricos em fibras, como vegetais, frutas, legumes e cereais integrais. A substituição de carboidratos refinados e açúcares simples por carboidratos complexos, assim como de gordura saturada por monoinsaturadas e poli-insaturadas foi capaz de reduzir a HbA_{1c} e melhorou a resistência à insulina, assim como melhorou a secreção deste hormônio (MCMACKEN; SHAH, 2017).

Além disso, uma dieta de baixa razão ω-6 / ω-3 está relacionada com a melhora da homeostase da glicose no sangue, com a redução da inflamação sistêmica, com a redução da expressão de receptores de produtos de glicação avançada nas paredes dos vasos renais, diminuindo o risco de nefropatias diabéticas (LEE *et al.,* 2019).

A gordura da dieta deve fornecer principalmente ácidos graxos mono e poli-insaturados. Recomenda-se a ingestão de alimentos ricos em ácidos graxos n-3 de cadeia longa, como de peixes (EPA e DHA), nozes e sementes (ALA), uteis para

melhorar o metabolismo da glicose e reduzir o risco de doença cardiovascular (ADA, 2019).

Avaliar a ingestão alimentar é uma atividade complexa, tanto pela coleta de dados como em sua análise. A complexidade aumenta quando se avalia a ingestão de micronutrientes. A concentração de minerais no alimento está diretamente relacionada à sua concentração no solo, seja por meio da agricultura ou da pecuária. Por esse motivo, pode ocorrer discrepância nas concentrações de minerais apresentadas nas bases de dados para análise da ingestão (STOFFANELLER; MORSE, 2015).

As duas principais formas dietéticas de selênio são a selenocisteína derivada de alimentos de origem animal e a selenometionina que pode ser obtida por meio de alimentos de origem animal e vegetal (STOFFANELLER; MORSE, 2015).

A média de ingestão de selênio dos indivíduos com DM2, teve aumento maior que 90% após a intervenção com a castanha. Por ser considerada boa fonte de selênio, não somente por ter altas concentrações, mas também por apresentar boa disponibilidade, é que a castanha-do-brasil é utilizada como suplementação deste mineral (DONADIO *et al.,* 2018; HU *et al.,* 2016; CARDOSO *et al.,* 2016).

Em uma ampla revisão sobre a ingestão de selênio na Europa e Oriente Médio, Stoffaneller e Morse (2015) sugerem a ingestão de 90 a 100 µg selênio/dia como adequada para a expressão máxima da GPX. Considerando essas recomendações, 73% dos estudos por eles avaliados encontravam-se abaixo. Contudo, ao se considerar a recomendação da OMS (FAO/WHO 2004), de 63 µg selênio/dia, somente 12% desses estudos ficaram abaixo dos valores recomendados.

7.5 Efeitos da suplementação sobre os parâmetros bioquímicos avaliados nos indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2.

7.5.1. *Status* de Selênio

O estado nutricional relativo ao selênio é resultado da ingestão, retenção e metabolismo desse mineral. Dessa forma, além de avaliar o estado nutricional, por meio da ingestão, também se avalia o status de selênio por meio de sua concentração nos tecidos, por sua função e sua eliminação (COMBS, 2015).

A distribuição dos participantes segundo os parâmetros bioquímicos de selênio está apresentada na **Tabela 06.**

Tabela 06. Efeito da suplementação com castanha-do-brasil sobre o *status* de selênio de indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2. São Paulo, 2019.

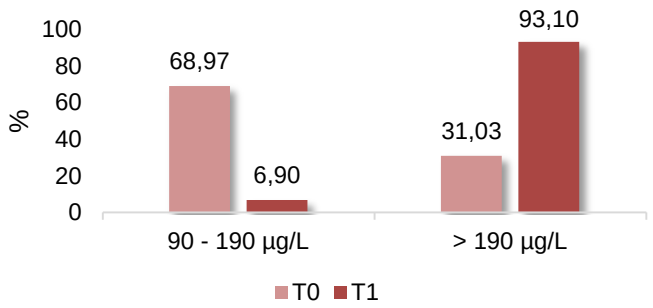
Marcadores	T0	T1	Delta (%)	*p*-valor*	Ref
Selênio no plasma [1]	115,4 ± 43,9 (58,3 – 240,9)	201,98±71,6 (89,3 – 373,3)	95,82	<0,001	60 - 120
Selênio nos eritrócitos[1]	188,0 ± 82,7 (109,4 - 188,0)	444,32± 167,0 (148,85 – 925,5)	163,16	<0,001	90 - 190
Selênio nas fezes[2]	177,6±78,5 (69,5 – 370,5)	390,5±249,9 (70,1 – 1136,7)	166,31	<0,001	-
SELENOP [3]	7083,9±1208,3 (8883,0 – 51102,0)	6369,8±1143,9 (3323,0 – 8985,0)	-5,36	0,026	-
Atividade da GPX[4]	69,8± 23,7 (14,13 – 124,8)	83,37 ± 42,3 (29,2 – 202,8)	30,61	0,040	27,5-73,6**

Resultados apresentados em média ± desvio padrão, Valores Mínimo e Máximo (min – máx)
Legenda: T0: Tempo 0; T1: Tempo 1; GPX: glutationa peroxidase; Delta: diferença entre T1 e T0. *teste Wilcoxon para amostras dependentes e considerado significante quando p<0,05; **:Referência proposta pelo *kit* disponível comercialmente (Ransel®, Randox Laboratories, UK). 1. Valores em ug/dL; 2. Valores em ppb; 3. Valores em ng/ml; 4. Valores em U/gHb

A concentração plasmática de selênio é um biomarcador sensível e reflete as alterações da ingestão a curto prazo. O selênio eritrocitário permite avaliar alterações do estado nutricional, visto que responde às alterações a longo prazo (COMBS, 2015).

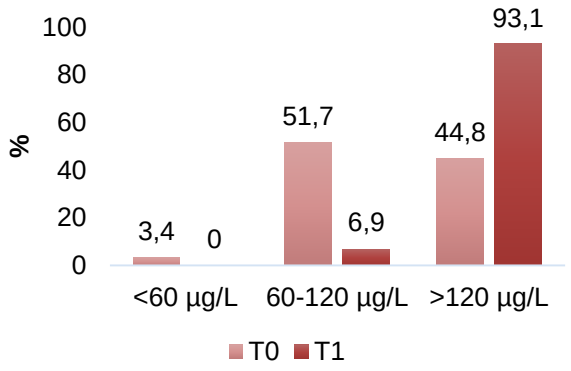
O estado nutricional dos indivíduos em relação ao selênio está apresentado nas **Figuras 12 e 13.**

Figura 12. Distribuição percentual dos participantes segundo concentração de selênio nos eritrócitos. São Paulo, 2019



Legenda: T0: Tempo 0; T1: Tempo 1. Intervalo de referência de 90 a 190 µg/L proposto por VANDAEL; DEELSTRA, 1993.

Figura 13. Distribuição percentual dos participantes segundo concentração de selênio no plasma. São Paulo, 2019



Legenda: T0: Tempo 0; T1: Tempo 1. Intervalo de referência de 60 a 120 µg/L proposto por VANDAEL; DEELSTRA, 1993.

A concentração de selênio plasmático apresentou aumento de 95,8% após a intervenção. Navia *et al.* (2014) observaram correlação diretamente proporcional entre a ingestão de selênio e sua concentração sérica (r = 0,169; p <0,05). Outros estudos com suplementação de selênio por meio da castanha-do-brasil observaram aumento da concentração sérica deste mineral. A ingestão de seis nozes de castanha-do-brasil, forneceu 48µg de selênio/dia, promoveu aumento de 19,62% a concentração plasmática de selênio (HU *et al.,* 2016). De maneira semelhante, a suplementação de idosos com comprometimento cognitivo leve, com uma noz de castanha-do-brasil, contendo ~300µg de selênio/dia, durante 8 semanas, aumentou 226% (CARDOSO *et al.,* 2016); assim como a ingestão de ~350µg de selênio/dia, durante 4 semanas, aumentou 67% a concentração plasmatica de selênio em adultos sem doença (DONADIO *et al.,* 2018).

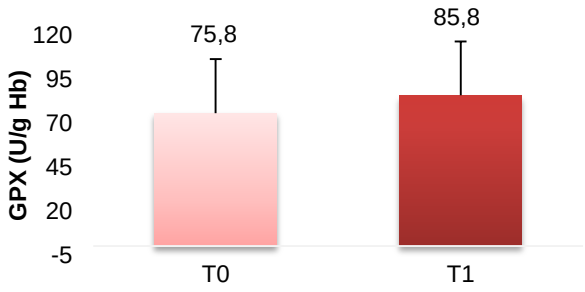
De maneira semelhante, a concentração de selênio nos eritrócitos aumentou pouco mais de 160% nos pacientes com DM2. Outros estudos que utilizaram a castanha-do-brasil como fonte de selênio também observaram aumento de ~150% a concentração de selênio eritrocitário em idosos com comprometimento cognitivo leve (CARDOSO *et al*. 2016) e ~62% em adultos sem doença (DONADIO *et al.,* 2019) da concentração de selênio eritrocitário.

A SELENOP representa 50% do selênio plasmático, sendo expressa principalmente no fígado, mas também apresenta expressão significativa em outros tecidos, incluindo o cólon. A suplementação com proteína do leite enriquecida com selênio (150ug de selênio/dia) aumentou a expressão proteica de SELENOP no cólon em humanos. A avaliação do cólon pode indicar como a ingestão de selênio, assim como presença de alterações gênicas, como polimorfismos nos genes que expressam selenoproteínas, influenciam na expressão e função dessas selenoproteínas (MÉPLAN; HESKET, 2012).

A suplementação de 75 µg de selênio/dia em adultos sem doença, foi capaz de aumentar 52% da concentração de SELENOP (XIA *et al.,* 2010). Após a suplementação com seis nozes de castanhas-do-brasil, com peso médio de 3g (48µg selênio/dia), durante 6 semanas, houve aumento de 89% na expressão gênica da SELENOP (HU *et al.,* 2016). A ingestão de ~350 µg de selênio/dia, por 8 semanas, aumentou a concentração de SELENOP de 3,4 mg/L para 3,9 mg/L (p=0,001) (DONADIO *et al.,* 2019).

Outro marcador do *status* de selênio é a atividade da GPX, visto esta ser considerada um marcador que se correlaciona com o estado nutricional em relação ao selênio (NÉVE, 1991). Os resultados da atividade enzimática estão apresentados na **Figura 14.**

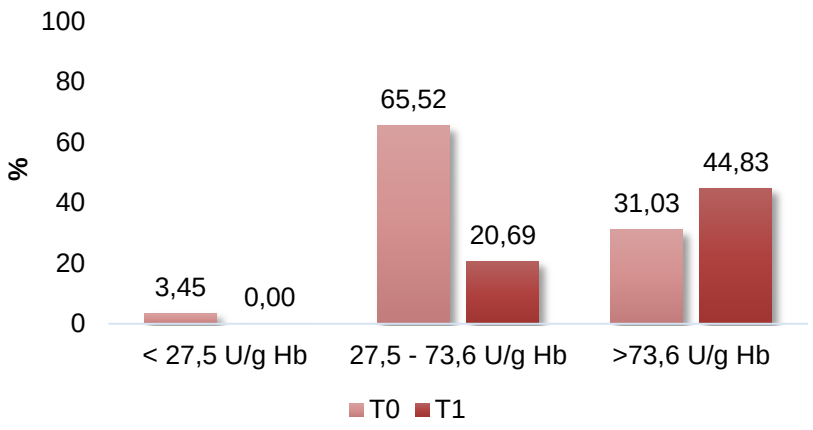
Figura 14. Atividade da enzima glutationa peroxidase nos eritrócitos dos individuos com diabetes *mellitus* tipo 2, em ambos os tempos avaliados. São Paulo, 2019.



Legenda: GPX: glutationa peroxidase. Test Wilcoxon amostras pareadas (p<0,05).

A distribuição dos participantes segundo a atividade da GPX está apresentada na **Figura 15**.

Figura 15. Distribuição percentual dos participantes segundo a atividade da GPX. São Paulo, 2019.



Resultados apresentados como média. Test Wilcoxon amostras pareadas (p<0,05)
Valores de referência 25,7 – 73,6 U/g Hb Legenda: GPX: glutationa peroxidase.

Estudo com suplementação com castanha-do-brasil (~290 µg de selênio/dia) mostrou aumento da atividade enzimática da GPX após a intervenção em adolescentes com DM tipo 1, representando aumento de 14,7% na atividade dessa enzima (PIRES, 2012).

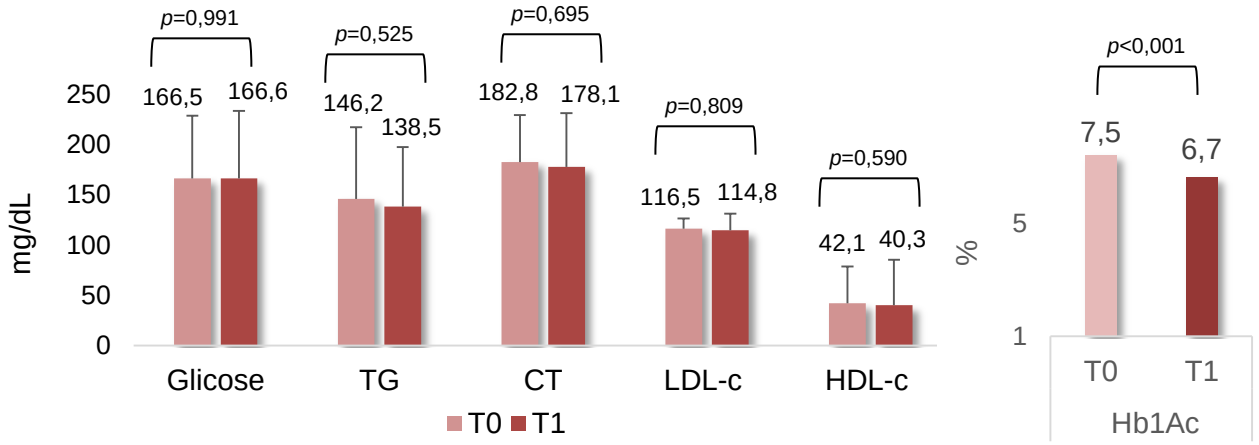
Cardoso et al. (2016) observaram aumento de 29% da atividade da GPX eritrocitária após a intervenção com castanha-do-brasil em idosos com comprometimento cognitivo leve. Resultado semelhante foi encontrado no estudo de Cominetti e colaboradores (2011) ao avaliarem mulheres obesas, o qual observou aumento da atividade enzimática da GPX nos eritrócitos de 34,3 U/g Hb para 51,4 U/g
Hb, após a intervenção com castanha-do-brasil. Em ambos os estudos foi oferecida uma noz de castanha-do-brasil ao dia, contendo aproximadamente 290µg de selênio por unidade de castanha, por 60 dias.

7.5.2. Perfil lipídico e glicêmico

Alterações no *status* de selênio parecem refletir na homeostase glicêmica. Houve redução significativa do percentual da hemoglobina glicada (HbA_{1c}) (p=0,000). Sendo assim, a intervenção com a castanha-do-brasil aproximou os indivíduos ao percentual de HbA_{1c} atendendo o proposto pela ADA (2019), cujo objetivo é reduzir de 0,3 a 2% da HbA_{1c} apenas com a Terapia Nutricional. No entanto, não foram

observadas diferenças significativas nos marcadores do perfil lipídico. Os resultados referentes ao perfil glicêmico e lipídico, estão apresentados na **Figura 16**

Figura 16. Marcadores glicêmicos e lipídicos, segundo o tempo de avaliação, dos indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2. São Paulo, 2019



Resultados apresentados em média e DP. Test Wilcoxon para amostras pareadas.
Não foi observada diferença estatística significativa (p<0,05) entre os tempos (T0, T1), com exceção do percentual de hemoglobina glicada (HbA_{1c}).
Valores de referência: glicemia de jejum (≤ 126 mg/dL)[1]; [1] (≤7%) ADA; 2019; triglicerídeos (< 150 mg/dL)[2]; colesterol total (<190 mg/dL)[2]; HDL-c (> 40 mg/dL)[2]; LDL-c (< 130 mg/dL) - VI Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, 2017. Legenda: CT: colesterol total; TG: triacilglicerídeos.

A Associação Americana de Diabetes (ADA) define como critério diagnóstico para diabetes 6,5% de HbA_{1c}. Porém, para o tratamento do diabetes *mellitus* tipo 2, foi proposta a adoção de estratégias que permitam maior flexibilidade ao adotar valores individuais para HbA_{1c} a fim de otimizar o tratamento. Sendo assim, dependendo do histórico individual, fatores como quadro de hipoglicemia recorrente, gravidez, comorbidades associadas, a presença de complicações micro e macrovasculares, entre outros, devem ser considerados para estabelecer metas mais rigorosas (6,5%) ou menos rigorosas (8%) (ADA, 2019).

Indivíduos com menor período de doença, tratados apenas com estilo de vida ou com uso de metformina para controle glicêmico e sem doença cardiovascular significativa, a ADA recomenda a adoção de 6,5% como referência de HbA_{1c} (ADA,

2019). Pouco mais de 80% dos participantes deste estudo estão incluídos nesses critérios.

A melhora da resposta glicêmica após a ingestão da castanha-do-brasil também foi observada em indivíduos com câncer (HU *et al.,* 2016) ou sem doença (DONADIO *et al.,* 2018).

Estudos de suplementação com selênio em indivíduos com DM2, observaram resultados divergentes. Ao suplementar os indivíduos com DM2, com 200µg de levedura de selênio, no período de 120 dias, Faghihi *et al* (2014) observaram aumento de 40,7% na concentração sérica de selênio, que foi diretamente proporcional ao aumento da glicose de jejum (p=0,01) quando comparados ao grupo placebo. Em protocolo de suplementação semelhante Bahmani *et al* (2016) não observaram diferença na concentração de glicose de jejum.

A suplementação com selênio de indivíduos sem doença, apresentou resultados diferentes em relação aos benefícios para homeostase glicêmica. Pounis *et al*. (2014) observam correlação positiva entre o aumento da concentração sérica de selênio e o aumento da glicose sérica. No entanto, Gao *et al* (2014), não observaram associação entre as concentrações séricas de selênio e glicose.

Uma possível implicação seria a capacidade do selênio de ativar a proteína Akt e outras quinases envolvidas na cascata de sinalização da insulina, tendo assim uma ação antidiabética. Por outro lado, a regulação de enzimas gliconeogênicas no fígado
ocorre de forma análoga à regulação de SELENOP via FOXO1, o que relaciona positivamente SELENOP e glicemia (PILLAI *et al.,*2012; STEINBRENNER, 2013).

Não houve alteração do perfil lipídico após a intervenção. Não foram encontrados estudos intervencionais com a castanha-do-brasil em indivíduos com DM2 que avaliassem o perfil lipídico. Porém, resultados semelhantes foram encontrados com suplementação de selênio por meio da castanha-do-brasil em indivíduos com DM1 (PIRES, 2012), em adultos sem doença (TG p=0,838; CT p=0,729; HDL p=0,699; LDL p=0,581) (DONADIO *et al.,* 2017). Por outro lado, Strunz *et al*. (2008) também não encontraram diferença nas concentrações de triglicerídeos, colesterol total e as frações HDL e LDL (p<0,05).em 15 adultos sem doença após a ingestão de uma noz de castanha-do-brasil por dia durante 15 dias (~45µg de selênio).

Christensen *et al* (2015) avaliaram 2287 indivíduos, a partir dos 12 anos de idade, do NHANES 2011-2012 e observaram que 40% da população avaliada estava com concentrações de colesterol limítrofe ou elevada. Foi observada correlação positiva entre alto nível de colesterol e selênio (p=0,02). Além de correlação positiva entre a concentração de selênio e a concentração de LDL-c, mas não de forma linear.

No entanto, estudos realizados no Reino Unido (RAYMAN *et al.,* 2011) e China (CHEN *et al.,* 2015), associaram a suplementação de selênio com menores concentrações de colesterol total e triglicerídeos, sem alterações nas concentrações de HDL-c.

A interação entre selênio e mecanismos relacionados à regulação das concentrações intracelulares de espécies reativas de oxigênio e o metabolismo de carboidratos e lipídios podem explicar esses resultados (FONTENELLE *et al.,* 2018).

7.5.3. Marcadores inflamatórios e de permeabilidade intestinal

A intervenção com castanha-do-brasil não foi capaz de alterar o perfil inflamatório dos indivíduos com DM2. Os parametros inflamatórios avaliados estão apresentados na **Tabela 07**.

Do mesmo modo, a suplementação com castanha-do-brasil (aproximadamente 290 µg de selênio) em individuos com diabetes tipo 1 não alterou os parâmetros inflamatórios (PIRES, 2012).

Resultados diferentes foram encontrados por Colpo *et al* (2014) que ao fornecer quantidades diferentes de castanha-do-brasil (20g e 50g) observaram aumento das concentrações séricas de IL10 e redução das concentrações de IL-1, IL-6, TNF-α e IFN-γ (P <0,05). Contudo, não foram observadas alterações nos marcadores bioquímicos para função hepática e renal (aspartato e alanina aminotransferases, albumina, proteína total, fosfatase alcalina, gama-glutamiltransferase, ureia e creatinina), indicando ausência de toxicidade.

A inflamação no diabetes é caracterizada por altas concentrações de IL-6 e PCR. Estudo conduzido em animais mostrou que a infusão da IL-6 foi capaz de induzir a liponeogênese subsequente a hiperglicemia, hiperinsulinemia compensatória. Efeitos semelhantes foram observados em humanos (FESTA *et al.,* 2000; FROHLICH, 2000).

Tabela 07. Efeito da suplementação com castanha-do-brasil sobre os marcadores inflamatórios e permeabilidade intestinal de indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2. São Paulo, 2019.

Variáveis	*T0*	*T1*	*Delta (%)*	*p-valor*
IL1b[1]	2,84 ± 2,96 (0,00 – 8,03)	2,84 ± 2,86 (0,00 – 7,76)	0,0	0,250
IL6[1]	2,86 ± 1,96 (0,42 – 7,12)	2,68 ± 1,94 (0,21 – 6,34)	-0,01	0,728
IL8[1]	10,13 ± 7,92 (4,28 – 38,73)	7,83 ± 4,25 (2,64 – 17,42)	-0,23	0,142
IL10[1]	1,55 ± 0,87 (0,00 – 3,21)	1,53 ± 0,73 (0,31 – 2,89)	0,00	0,871
IL12p70[1]	0,55 ± 0,51 (0,00 – 1,96)	0,74 ± 0,64 (0,00 – 2,05)	0,00	0,450
TNF[1]	2,52 ± 2,63 (0,00 – 7,67)	2,81 ± 2,85 (0,00 – 8,10)	0,01	0,084
LBP[2]	21426,0 ± 8566,8 (8883,0-51102,0)	18687,4 ± 7426,5 (7651,5 – 38140,5)	-1,97	0,086

Legenda: LBP: Proteína ligadora de lipopolissacarídeos; TNF: Fator de Necrose Tumoral; IL: Interleucina; [1]Valores em pg/L; 2. Valores em ng/L. Dados apresentados em média ± desvio padrão Legenda: e Valores Mínimo - Máximo (min – máx). Dados significativos (p<0,05). Teste Wilcoxon para variavéis agrupadas

A participação da microbiota é essencial para o quadro inflamatório. Estudo conduzido em camundongos *germ free,* com obesidade induzida por dieta rica em gordura, não apresentou aumento da expressão de TNFα e NF-kB nas células epiteliais, evidenciando a participação da microbiota nesse processo inflamatório, que precede o desenvolvimento da resistência à insulina e DM2 (CONCANON *et al.,* 2005).

A mucosa intestinal degradada resulta no aumento da sua permeabilidade, favorecendo a translocação do LPS intestinal para a corrente sanguínea, causando endotoxemia metabólica.(GOMES *et al.,* 2017). A aparente alta afinidade do LPS

com RAGE contribui proporcionalmente com a sua concentração sérica e ação sobre a inflamação mediada por RAGE. O aumento da permeabilidade intestinal está associado ao aumento de citocinas pró-inflamatórias e resistência à insulina (TEISSIER; BOULANGER, 2019).

7.6 Efeitos da suplementação sobre a microbiota intestinal

7.6.1. Dados descritivos da microbiota intestinal

Em um ambiente intestinal saudável há o equilíbrio entre estados pró e anti-inflamatórios. Tal equilíbrio se dá, principalmente, pelas funções trófica e imune exercidas pela microbiota intestinal. A função trófica ocorre, sobretudo, pela fermentação de substratos oriundos dos alimentos, produzindo ácidos graxos de cadeia curta como o acetato, o propionato e o butirato. Esses ácidos graxos auxiliam tanto nos processos metabólicos como no controle bacteriano, e é nesse ambiente de competição por nutrientes e receptores na mucosa intestinal que torna a microbiota capaz de impedir o crescimento de microorganismos patógenos (WU *et al*., 2013; CARABOTTI *et al*., 2015).

Este é o primeiro estudo que avalia influência da suplementação com castanha-do-brasil na microbiota intestinal de indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2. O sequenciamento do gene 16S DNA ribossomal, para caracterização da microbiota

intestinal, foi realizado pela plataforma Illumina Miseq® e gerou 1.360.599 sequências. As sequencias obtidas foram processadas bioinformaticamente usando o software QIIME, removendo sequências de baixa qualidade, e gerando uma tabela de identificação das unidades taxonômicas operacionais (OTU). Dessa forma, 153.440 OTU diferentes foram identificadas de acordo com o banco de dados SILVA (QUAST *et al*. 2015) e, em média, foram obtidas 21.635 ± 7.741 sequências por amostra. A tabela de OTUs foi usada para avaliar a riqueza e a diversidade microbiana das amostras, assim como para estabelecer relações com parâmetros bioquímicos mensurados.

7.6.2 Alfa Diversidade

A alfa diversidade corresponde a diversidade de espécies bacterianas intraindividual e foi avaliada pela abundância relativa (índice Shannon) e absoluta (Espécies observadas), a diversidade estimada (Chao1) e os dados filogenéticos (Diversidade filogenética). O índice de diversidade Shannon refere-se à abundância relativa, ou seja, variedade e complexidade de espécies de uma comunidade. As espécies observadas consistem no número absoluto de espécies identificadas na amostra. O índice de riqueza Chao1 consiste na avaliação numérica da abundância segundo o número de OTU de uma comunidade, resultando na diversidade estimada. A diversidade filogenética considera a soma das distâncias dos diversos galhos da árvore filogenética como uma medida de biodiversidade. Não houve alteração nos valores destes índices após a intervenção (**Tabela 08)**.

Tabela 08. Índices de Alfa diversidade. São Paulo, 2019.

Índice	T0	T1	*p*-valor*
Chao1	4732,38 ± 1268,24	4320,06 ± 956,26	0,22
Espécies Observadas	1499,35 ± 336,69	1405,69 ± 288,30	0,26
Diversidade Filogenética	64,48 ± 12,93	62,23 ± 13,17	0,60
Shannon	6,35 ± 0,94	6,23 ± 0,77	0,63

* Valor de $p < 0,05$, Teste Wilcoxon para amostras pareadas. Legenda: T0: Tempo 1. T1: Tempo 1.

A baixa diversidade alfa tem sido associada a doenças crônicas, incluindo doenças inflamatórias intestinais, obesidade e DM2 (FANGMANN *et al.,* 2018; BLASER 2014; GARRETT 2015; HANSEN *et al.,* 2015; LE CHATELIER *et al.,* 2013). Esse quadro de baixa diversidade da microbiota intestinal parece estar relacionado a um sistema imunológico deficiente, o que resultaria no desenvolvimento de tais doenças.

O impacto da alimentação na diversidade da microbiota intestinal está bem descrito na literatura. O aumento da ingestão de carboidratos simples e gorduras, associado à ingestão reduzida de fibras, impactam na composição microbiana (AW; FUKUDA, 2018).

As fibras fermentadas pela microbiota intestinal resultam na produção de AGCC, os quais exercem efeitos anti-inflamatórios sistêmicos, produzindo imunoglobulina A e citocinas imunossupressoras (AW; FUKUDA, 2018). O número de bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) é reduzido em indivíduos com DM2 (QIN *et al.,* 2012; KARLSSON *et al*. 2013, LARSEN *et al.,* 2010).

Nossos resultados corroboram com a literatura, visto que, foi observada menor abundância de bactérias produtoras de AGCC, menor que 0,03%. A intervenção com a castanha-do-brasil não alterou a abundância das bactérias *Roseburia* (p=0,193); *Eubacterium* (p=0,45), *Bifidobacterium* (p=1,000) e *Faecalibacterium* (p=0,054).

A menor quantidade de bactérias produtoras de AGCC no DM2, afeta diretamente a homeostase glicêmica, uma vez que os AGCC podem se ligar aos receptores acoplados à proteína G, promovendo a secreção do peptídeo – 1 semelhante ao glucagon (GLP1), que por sua vez impede a secreção de glucagon, inibindo a gliconeogênese no fígado, melhorando a sensibilidade à insulina e reduzindo a resposta inflamatória de baixo grau causada pela migração de bactérias do intestino para o tecido adiposo mesentérico e circulação sanguínea. A ausência desses AGCC inibe esse processo (AW; FUKUDA, 2018).

A análise taxonômica revelou o total de 13 filos, 29 classes, 58 ordens, 112 famílias e 238 gêneros entre as amostras. A microbiota predominante em ambos os tempos está apresentada na **Tabela 9**.

A microbiota intestinal considerada saudável é composta pelos filos bacterianos Firmicutes e *Bacteroide*tes (> 90%), seguidos por Actinobacteria e Verrucomicrobia;
geralmente poucas (0,1%) espécies patogênicas e oportunistas estão presentes (PFLUGHOEFT, VERSALOVIC, 2012; HMPC, 2012; HOLLISTER *et al.,* 2014)

No entanto, a composição da microbiota intestinal de indivíduos com DM2 tem sido descrita com maior abundância de bactérias consideradas oportunistas, como *Bacteroides*. Essa alteração da composição, tem impacto funcional, associado ao aumento no transporte de açúcares, respostas ao estresse oxidativo, redução da biossíntese de butirato, entre outros (PATTERSON *et al.,* 2017).

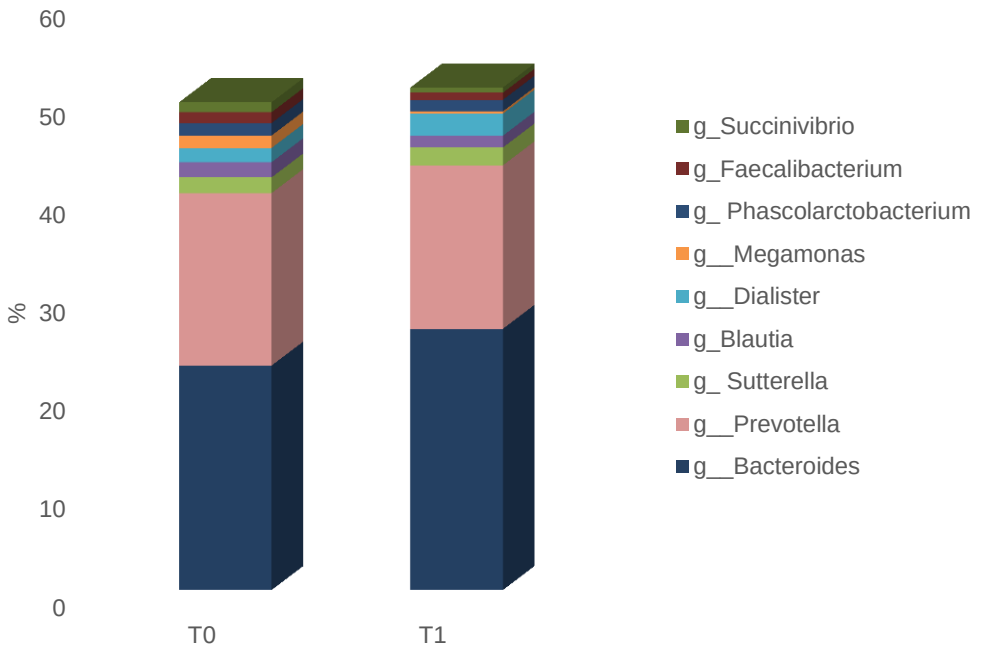
Tabela 9. Abundância relativa da microbiota em diferentes níveis antes e após da suplementação de castanha-do-brasil. São Paulo, 2019.

Níveis	T0 (%)	T1 (%)	p-valor*	FDR
Filo				
p__Bacteroidetes	49,75	54,18	0,101	0,405
p__Firmicutes	40,78	36,68	0,143	0,405
p__Proteobacteria	5,42	5,42	0,966	0,992
p__Tenericutes	0,57	1,07	0,370	0,562
p__Actinobacteria	0,39	0,47	0,966	0,992
Classe				
c__Bacteroidia	49,75	54,18	0,101	0,405
c__Clostridia	37,69	34,69	0,361	0,562
c__Betaproteobacteria	3,25	2,52	0,205	0,405
c__Erysipelotrichi	2,25	1,10	0,085	0,405
c__Gammaproteobacteria	0,45	0,89	0,139	0,405
Ordem				
o_Bacteroidales	49,76	54,18	0,100	0,405
o_Clostrtidiales	37,67	34,68	0,360	0,405
o_Erysipelotrichales	2,65	1,10	0,205	0,405
o__Enterobacteriales	2,09	1,92	0,085	0,405
o__Burkholderiales	1,87	1,86	0,139	0,405
Família				
f__Bacteroidaceae	22,87	26,62	0,169	0,405
f__Prevotellaceae	17,55	16,64	0,623	0,816
f__Ruminococcaceae	14,97	14,53	0,655	0,830
f__Lachnopiraceae	10,62	9,05	0,213	0,405
f__Veillonellaceae	5,25	4,60	1,000	1,000
f__Rikenellaceae	3,10	4,02	0,019	0,279
Gênero				
g__Bacteroides	22,87	26,61	0,169	0,481
g__Prevotella	17,55	16,63	0,605	0,807
g_ Sutterella	1,59	1,81	0,429	0,687
g_Blautia	1,55	1,20	0,183	0,481
g__Dialister	1,45	2,24	0,211	0,481
g__Megamonas	1,26	0,24	0,281	0,536
g_ Phascolarctobacterium	1,27	1,17	0,732	0,901
g_Faecalibacterium	1,10	0,72	0,056	0,297
g_Succinivibrio	1,01	0,53	0,584	0,807

*Valor de $p < 0,05$, Teste Wilcoxon para amostras pareadas.
Legenda: T0: Tempo 0; T1: Tempo 1; FDR: False Discovery Rate.

Os gêneros com abundância superior a 1% foram selecionados e estão apresentados na **Figura 17**.

Figura 17. Gêneros bacterianos mais abundantes identificados nas amostras. São Paulo, 2019.



Legenda: T0: Tempo 0; T1: Tempo1.

Não houve mudança na abundância relativa das bactérias em quaisquer dos níveis taxonômicos. Um discreto aumento foi observado na abundância de *Rikenellaceae (família)*, do filo Bacteroidetes, a qual não foi significante após correção para comparações múltiplas por *False Discovery Rate* (FDR).

A razão Bacteroidetes/Firmicutes (B/F) não alterou após a intervenção (Δ 0,18, p=0,98). Estudos que avaliaram a composição global da microbiota de indivíduos com DM2 associaram a baixa razão B/F à obesidade e positivamente correlacionada com altas concentrações séricas de glicose (LEY *et al.,* 2006; LARSEN *et al.,* 2010; VERDAM *et al.,* 2013). De maneira semelhante, Jandhyala *et al*. (2017) observaram a razão F/B (Firmicutes/Bacteroidetes) aumentada em indivíduos com DM2 em relação ao grupo controle.

No entanto, esses resultados permanecem controversos, pois o aumento de 20% da razão F/B foi observado em indivíduos magros e sem doença (JUMPERTZ *et al*., 2011). Em modelo animal (ratos com DM2) foi observada correlação negativa entre a alta razão F/B e a glicemia, e ainda associação com aumento na captação

de energia da fermentação bacteriana, com consequente aumento da produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (LEE *et al*., 2019).

Muito se tem investigado sobre a abundância relativa desses filos mais prevalentes relacionados ao DM2. A redução na abundância de Bacteroidetes foi observada em indivíduos com obesidade, importante fator de risco para o desenvolvimento de DM2 (MEDINA-VERA *et al*., 2019; FANGMANN *et al*., 2018; FERNANDES *et al*., 2014; SCHWIERTZ *et al*., 2010; TURNBAUGH *et al*., 2009). Observou-se abundância de Firmicutes reduzida em indivíduos com DM2 (QIN *et al*., 2012) ou aumentada (KARLSSON *et al*., 2013, LARSEN *et al*., 2010).

Sendo assim, até o momento não existe consenso sobre a relação F/B em humanos. Finucane *et al* (2014) em uma extensa revisão da literatura, concluíram que há diferença da composição da microbiota intestinal entre indivíduos obesos e magros, com ou sem doença, porém sem prevalecer uma composição taxonômica simples, pragmática e consistente ao longo dos estudos.

O terceiro filo mais frequente em nosso estudo foi o Proteobacteria, seguido por Tenricutes e Actinobacteria, essa frequência se manteve após a intervenção. Esses filos bacterianos estão, normalmente, presentes em baixas concentrações na microbiota do cólon humano (FANGMANN *et al*., 2018).

O aumento da abundância de Bacteroidetes e Proteobactérias pode induzir a patogênese do DM2, por meio da resposta inflamatória induzida por endotoxinas, uma

vez que como bactérias Gram negativas, e contêm o lipopolissacarídeo (LPS) em sua camada externa, um potente promotor da endotoxina (LARSEN *et al.,* 2010).

Não houve alteração na abundância das classes bacterianas mais prevalentes encontradas nesse estudo após a suplementação, *Bacteroidia* (Δ 4,73, p= 0,101) e *Clostridia* (Δ -3, p= 0,301). Zhang *et al* (2013) observaram maior abundância da Classe *Clostridria* em indivíduos com DM2. A classe *Betaproteobacteria,* que faz parte do filo Proteobacteria, foi a terceira classe mais abundante observada, também não houve alteração no T1 (Δ 0,73, p= 0,205). Larsen *et al*. (2010) observaram maior abundância de *Betaproteobacteria* em indivíduos com DM2, quando comparados aos indivíduos sem doença.

Em relação aos gêneros, *Bacteroides* foi o mais abundante, seguido por *Prevotella*. A abundância desses gêneros não foi alterada na comparação entre os tempos avaliados, (Δ 3,84, p= 0,169) e (Δ -0,92, p= 0,605), respectivamente.

O gênero Gram negativo *Bacteroides* é mais frequentemente descrito no cólon e nas fezes em humanos. Sua interação com o hospedeiro pode influenciar o a função do sistema imunológico. A predominância do gênero *Bacteroides* também foi observada em indivíduos com DM (NAVAB-MOGHADAM *et al.,*2017).

*Faecalibacterium c*orrespondeu a pouco mais de 1% da composição da microbiota intestinal dos indivíduos com DM2 deste estudo. Em adultos sem doença, esse gênero bacteriano representa cerca de 5% da microbiota fecal total, sendo considerado um sensor da saúde intestinal humana. A abundância de *Faecalibacterium* está reduzida em indivíduos com distúrbios intestinais e metabólicos, como doenças inflamatórias intestinais, síndrome do intestino irritável, câncer colorretal, obesidade, diabetes, doença celíaca. Sua abundância reduzida pode prejudicar a integridade da barreira da mucosa intestinal, alterando metabolismo epitélio - bacteriano intestinal (JANDHYALA *et al.,* 2017; NAVAB-MOGHADAM *et al*., 2017; MARTIN *et al.,* 2017; PATTERSON *et al.,* 2016).

Não foi observada alteração na abundância do gênero *Akkermansia* após a intervenção com castanha-do-brasil (<1%). A abundância reduzida de Akkermansia também foi observada em outro estudo com indivíduos com DM, além de indivíduos com sobrepeso, obesidade e alta glicemia de jejum. Além disso, a abundância de *Akkermansia* foi correlacionada inversamente em estados de doenças, e positivamente relacionada com a diminuição da concentração de LPS e com a melhora na resistência à insulina, uma vez que estas são produtoras de AGCC que por sua vez fornecem energia para as células intestinais produtoras de mucina (WANG *et al.,* 2017).

No T1, após a intervenção, houve correlação inversa entre a abundância de *Akkermansia* e *Sutterella* (r=-412, p=0,014). *Sutterella* foi o terceiro gênero mais abundante identificado neste estudo. Não houve alteração da abundância de *Sutterella* após a intervenção (Δ 0,22, p=0,465).

ALLIN *et al* (2018) observaram abundância aumentada de *Sutterella* [Clostridium] (p=0,60) em indivíduos com DM2, quando comparados ao grupo sem

doença. Lin *et al* (2015) observaram correlação negativa entre *Akkermansia* e *Sutterella,* em indivíduos com síndrome metabólica.

Até o momento o gênero *Sutterella* ainda não teve seu papel bem esclarecido nas amostras biológicas e ambientais. Por vezes foi associada a infecções, distúrbios gastrintestinais e doenças inflamatórias humanas. Ainda não foi descrito como patogênico, contudo, já foram encontrados anticorpos reagentes à *Sutterella*, o que sugere infecção (BRENT *et al*., 2012).

O aumento da abundância de *Sutturella* também foi observado em indivíduos que utilizavam metformina para controle glicêmico, em comparação aos que utilizavam análogo de GLP1 (secretagogo – que potencializa a secreção de insulina, e ao mesmo tempo inibe a liberação de glucagon) (WANG *et al.,* 2018). Essa diferença foi observada principalmente nos indivíduos com menor período de uso dos medicamentos (WANG *et al.,* 2018).

Todos os participantes deste estudo utilizavam metformina para controle glicêmico. No entanto, não foi observada correlação entre o uso desse medicamento e a abundância de *Sutterella*, em ambos os tempos avaliados (T0 p = 0,778; T1 p = 0,409).

7.6.3 Enterótipos

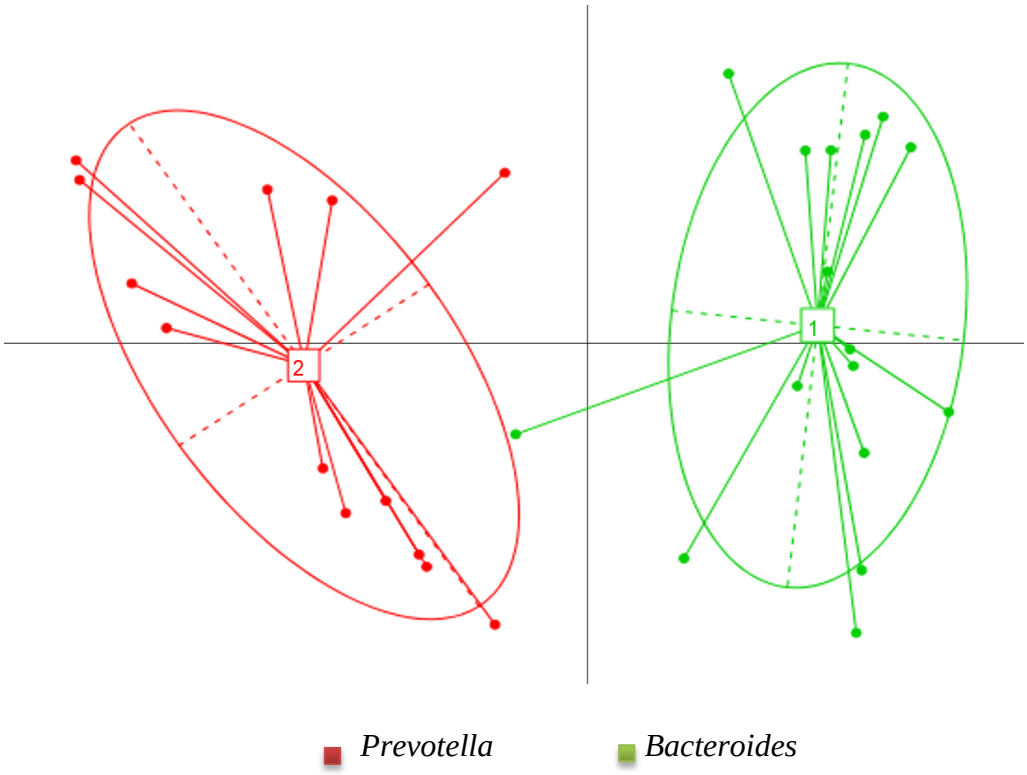
A presença de um perfil bacteriano predominante foi investigada nas amostras. Os enterótipos foram identificados de acordo com o método descrito por Arumugam *et al* (2011), utilizando a tabela de gêneros e a matriz de distância *weighted* Unifrac gerada na análise de beta diversidade das amostras. Para esta análise de composição da microbiota, considerou-se apenas os dados do início do estudo (T0).

Essa abordagem avalia as distâncias entre os grupos (*clusters*) e agrupa os indivíduos de acordo com o gênero predominante. Formaram-se dois enterótipos predominantes, *Bacteroides* e *Prevotella*. O *cluster Bacteroides* foi atribuído a 16 indivíduos e o *Prevotella* agrupou 13 participantes. O suporte estatístico para a divisão de enterótipos proposta neste estudo foi fraco (*silhouette* = 0,23), possivelmente pelo tamanho da amostra. O escore *Silhouette* é uma medida de qualidade para toda estrutura de agrupamento, ele foi calculado para avaliar o grau

de similaridade entre os 2 *clusters*, sendo que valores próximos a 1 sugerem que a segregação é significante e legítima. A **Figura 18** apresenta os clusters encontrados.

Resultado semelhante ao encontrado por Fugmann *et al* (2015), ao avaliarem mulheres que tiveram diabetes *mellitus* gestacional (pós DMG), as quais apresentaram risco dez vezes maior de desenvolver DM2 em comparação às gestantes normoglicêmicas, que apresentaram como enterótipos predominantes *Prevotella* e *Bacteroides*.

Figura 18. Enterótipos identificados nas amostras. São Paulo, 2019.



7.6.4 Interação com os marcadores bioquímicos

A composição da microbiota pode ser descrita de forma quantitativa, utilizando a abundância de cada táxon ou qualitativa avaliando presença ou ausência de cada dado. Aqui, a análise multivariada de permutação (PERMANOVA) foi realizada para avaliar a contribuição das variáveis na β diversidade das amostras

analisadas. Para isso, foram utilizadas as matrizes UniFrac *unweighted* a qual descreve a presença ou ausência de gêneros e UniFrac *weighted* que apresenta a abundância de gêneros.

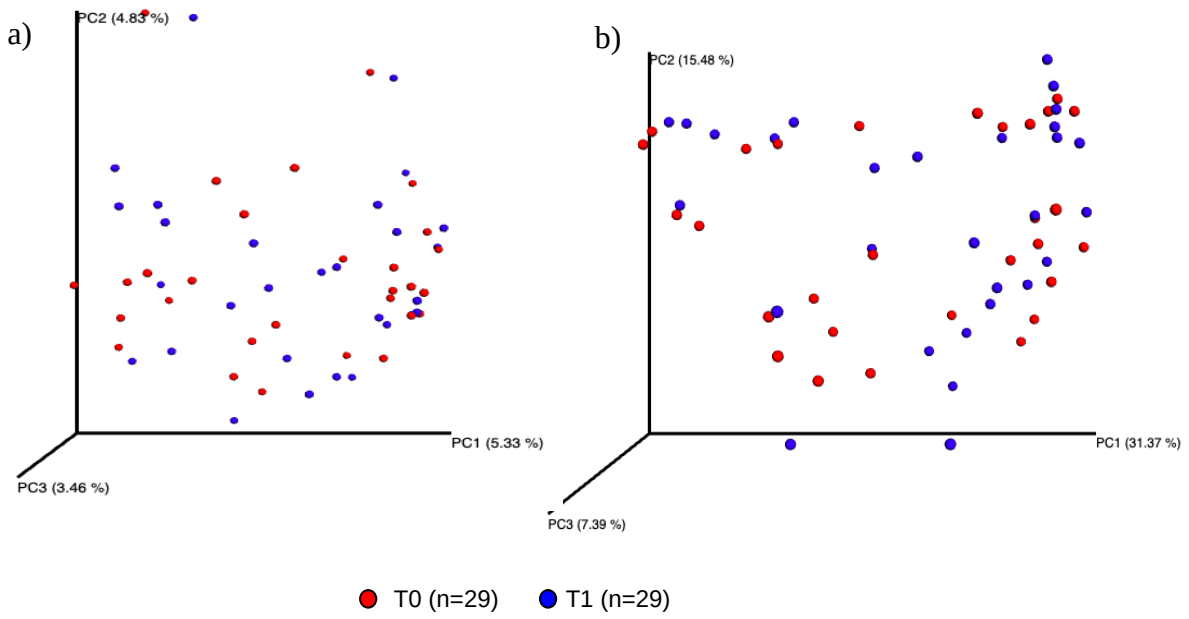
A medida UniFrac calcula a distância entre comunidades biológicas utilizando informações filogenéticas entre os membros para calcular as medidas de dissimilaridade, ou seja, calcula a distância entre os galhos da árvore filogenética comum entre a comunidade microbiana (LOZUPONE; KNIGHT, 2005).

A medida UniFrac não ponderada (*Unweighted*) considera os ramos de uma árvore filogenética com base na abundância de informações, não considerando sequências duplicadas na distância de ramificação da árvore filogenética, ou seja, é uma medida qualitativa da β diversidade (LOZUPONE *et al.,* 2007).

Enquanto a medida UniFrac ponderada (*Weighted*) é uma medida quantitativa da diversidade β, capaz de detectar mudanças nas sequências de cada linhagem ou táxon presentes considerando a abundância relativa de diferentes tipos de bactérias (LOZUPONE *et al.,* 2007).

A composição global da microbiota está apresentada na **Figura 19**.

Figura 19. Distribuição das amostras de acordo com o tempo, utilizando as matrizes de distância UniFrac *unweighted* (a) e *weighted* (b)



Legenda: a) Distância Unifrac *unweighted*; b) Distância Unifrac *weighted*

A composição global da microbiota não foi alterada pela intervenção com castanha-do-brasil. Dessa forma, investigamos a influência de cada variável bioquímica, separadamente nas diferenças de β diversidade de cada indivíduo, em ambos os tempos juntos, antes e após a intervenção do estudo. Os resultados estão apresentados na **Tabela 10**.

Kasaikina *et al*. (2011) observaram aumento da diversidade da microbiota intestinal pós aumento da ingestão de 0,1 e 0,04 mg/g de selênio por dia. Essa alteração não foi observada em nossos resultados. A variação interpessoal da microbiota foi mais forte que a variação induzida, sendo assim a intervenção com castanha-do-brasil não foi capaz d impactar a composição global do microbioma.

As distâncias *Weighted* e *Unweighted* são eficientes quando os objetos formam aglomerados naturais distintos. Avaliando o indivíduo nos dois tempos (T0/T1), considerando as variações intraindividuais, não houve alteração na diversidade da microbiota, segundo marcadores bioquímicos avaliados.

Tabela 10. Relação entre as variáveis bioquímicas mensuradas e a composição global da microbiota intestinal dos voluntários. São Paulo, 2019.

	T0/T1(n=58)		**T0 (n=29)**		**T1 (n=29)**	
	weighted	*unweighted*	*weighted*	*unweighted*	*weighted*	*unweighted*
Marcadores do *status* de selênio, perfil glicêmico e de permeabilidade intestinal						
Erit_Se	0,98	0,99	0,96	1,00	0,30	0,18
Fezes_Se	0,97	0,97	0,27	0,95	0,35	0,59
Plasm_Se	0,99	1,00	0,97	1,00	0,70	1,00
GPX	0,93	0,97	0,75	0,45	0,56	0,77
SELENOP	0,55	0,66	0,49	0,76	0,21	**0,02**
HbA_{1c}	0,63	0,82	0,43	0,79	**0,04**	0,34
Glicose	0,91	1,00	0,48	1,00	0,09	0,92
LBP	0,99	1,00	1,00	1,00	0,64	0,87

Legenda: Tempo 0; T1: Tempo 1; Erit: Eritócitos; Plasm: Plasma; GPX: glutationa peroxidase; Se:selênio; SELENOP: selenoproteína P; HbA_{1c} Hemoglobina glicada; LBP: proteína ligadora de lipopolissacarídeos. Valor de p calculado pela análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA), $p<0,05$).

A microbiota tende a permanecer estável, isso devido ao fato da resiliência e resistência que a microbiota possui em relação a mudanças. A manutenção da

microbiota saudável depende do equilíbrio entre os microorganismos e da interface intestinal do hospedeiro. Dessa forma, a microbiota atua como proteção contra doenças relacionadas a disbiose ou distúrbios metabólicos. No entanto, a resiliência de uma microbiota disbiótica está relacionada de doenças (SOMMER *et al.,* 2017).

A composição observada no T0 reflete, principalmente, os hábitos individuais, ou seja, a ingestão habitual dos participantes. A concentração de selênio nas fezes é o resultado da ingestão habitual, que após absorção e utilização do organismo se torna remanescente no cólon e pode influenciar a composição da microbiota. Antes da intervenção com castanha-do-brasil, não foi observada associação em nenhum dos parâmetros avaliados.

No entanto, o T1 representa o efeito da suplementação com castanha-do-brasil, visto que não houve alteração no padrão alimentar entre os tempos. Houve uma correlação positiva entre a variação na concentração de SELENOP e na distância interpessoal com o tratamento com castanha-do-brasil (r=0,48, p=0,008). Portanto, quanto mais resistente for a microbiota, menor a variação de SELENOP após a intervenção. Para os demais marcadores avaliados, não foi observada correlação significativa.

Segundo a dinâmica ecológica da microbiota, após uma perturbação ou intervenção, pode-se determinar se a microbiota é resistente, e assim, não será alterada, ou, não resistente quando após um evento muda em nível de espécies, gêneros e funções. Diante das três rotas plausíveis para alteração da microbiota, quais sejam: pequenas alterações passíveis de retorno ao estado anterior sem dificuldades, alterações intermediárias, na qual microorganismos diferentes ao meio podem se estabelecer e a terceira quando as alterações são grandes e irreversíveis (MOYA; FERRER, 2016).

Propriedades como resistência, resiliência e redundância funcional estão presentes em microbiotas robustas, com capacidade de restaurar a função diante de alguma perturbação. Essa caracterização é complexa. No entanto, já foi observado que espécies próximas podem ter grandes diferenças genômicas, assim como respostas distintas a fatores ambientais (KELLER *et al.,* 2014)

Uma explicação funcional sobre composição da microbiota intestinal e seus fenótipos metabólicos estáveis ou transferíveis, quando submetidos a doenças específicas ou a fatores ambientais (MOYA; FERRER, 2016). Nesse contexto,

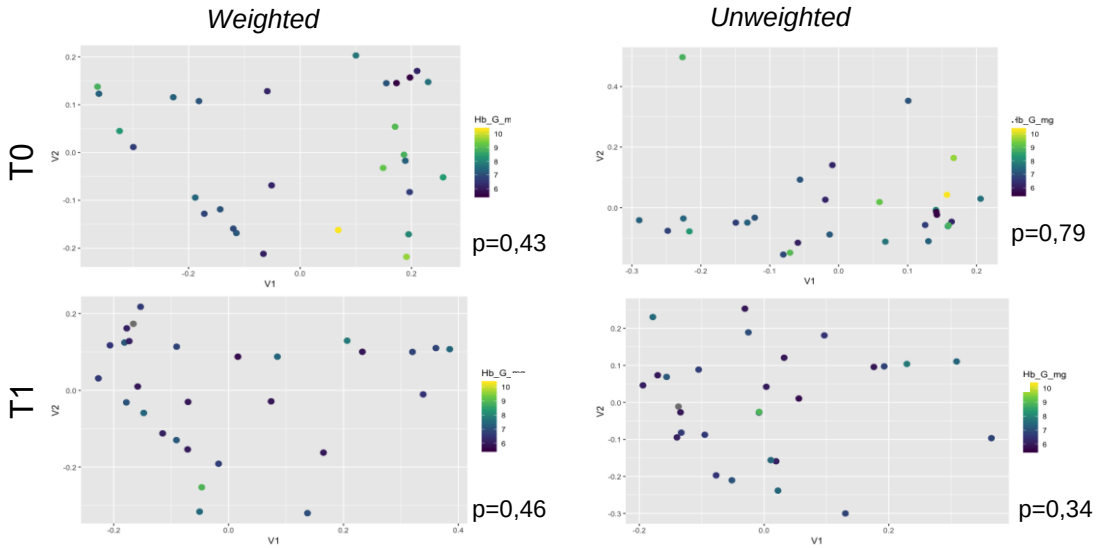
entende-se porque indivíduos apresentam respostas diferentes diante da mesma quantidade fornecida como suplementação.

Não foram observadas diferenças entre a composição da microbiota e a glicemia de jejum e atividade da GPX. No entanto, a PCoA nos permite observar um agrupamento dos indivíduos de acordo com o percentual de HbA_{1c} da distância *weighted* (p= 0,046), a qual indica que após a intervenção com a castanha-do-brasil houve redução do percentual de HbA_{1c}, aproximando os participantes em relação ao aumento da abundância dos gêneros, e reduzindo assim a distância *weighted* entre os participantes.

Tendência semelhante foi observada em relação à concentração de SELENOP, mas na distância *unweighted* (p=0,02). Neste caso, antes da intervenção não era possível observar distâncias, porque estavam todos muito similares em relação a concentração plasmática de SELENOP, mas após a ingestão da castanha-do-brasil, foi possível observar a presença de alguns gêneros que anteriormente não observados. Ressalta-se que a distância *weighted* refere-se a abundância e a *unweighted* é uma avaliação qualitativa, sobre presença de microorganismos.

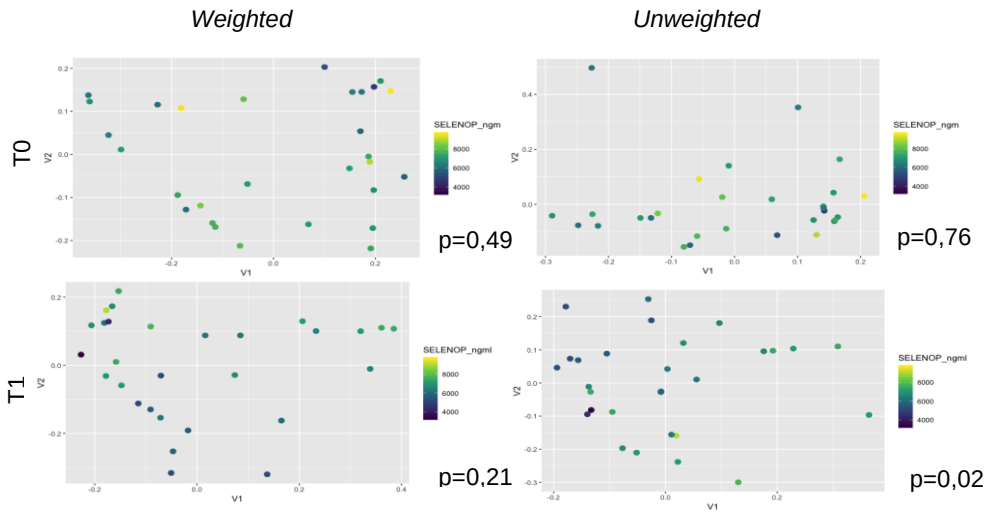
Os participantes desse estudo foram distribuídos segundo a β diversidade, e os parâmetros que observamos diferença foram inseridos em gráficos de coordenada principal (PCoA). Resultados apresentados nas **Figuras 20 e 21**

Figura 20. Distribuição dos indivíduos segundo composição da microbiota intestinal e o percentual de $HbA_{1c.}$ São Paulo, 2019



Legenda: $HbA_{1c:}$ hemoglobina glicada. T0: Tempo 0; T1: Tempo 1.

Figura 21. Distribuição dos indivíduos segundo composição da microbiota intestinal e SELENOP (ng/ml). São Paulo, 2019



Legenda: SELENOP: selenoproteína P; T0: Tempo 0; T1: Tempo 1. Teste Wilcoxon para amostras pareadas, p<0,05.

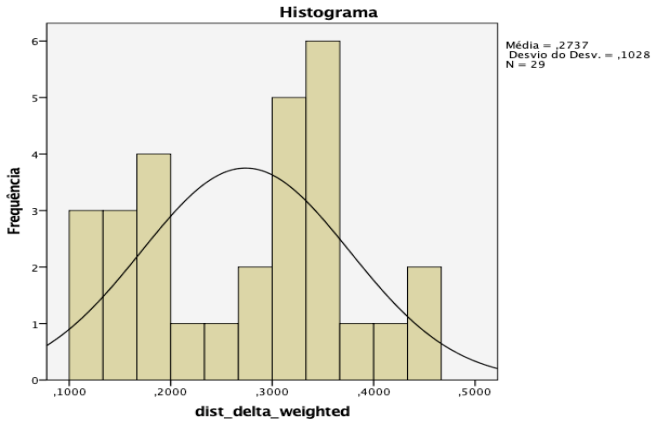
7.6.5. Distribuição dos indivíduos segundo variação das distâncias

Verificamos uma segregação significante dos participantes de acordo com a variação das distâncias UniFrac *Weighted* entre os tempos. Sendo assim, distribuímos os participantes, segundo o valor de delta, em 2 grupos: grupo com menor variação denominado Distância 1 (D1) e o grupo com maior variação Distância 2 (D2)

As distâncias foram significantemente diferentes entre os grupos (p<0,0001). As pessoas classificadas no D1 tiveram menor variação da distância UniFrac *Weighted* (0,12 a 0,30) (n=15) e no grupo D2 tiveram maior variação (0,31 a 0,46) (n=14).

Esse grupamento foi utilizado para comparar diferentes respostas da microbiota intestinal frente à intervenção. Observamos diferença significativa nas concentrações de SELENOP entre os grupos (p<0,001). A distância em relação ao delta está apresentada na **Figura 22**.

Figura 22. Histograma da distância UniFrac *Weighted* em relação ao delta. São Paulo, 2019.



Legenda: Dist_delta_unweighted: Distância Unweighted Delta; Teste Mann-Whitney p<0,0001.

Visto que há segregação segundo a distância encontrada, ou seja, os indivíduos apresentaram respostas diferentes da microbiota em relação à distância UniFrac *weighted* frente à intervenção, avaliamos quais variáveis foram influenciadas por essa distância. Dados apresentados na **Tabela 11.**

Tabela 11. Delta dos parâmetros avaliados segundo a distância *Weighted* (D1 x D2). São Paulo, 2019.

	D1		**D2**		***p***
	Média	DP	Média	DP	
Erit_Se	431,31	171,59	337,09	132,78	0,159
Fezes_Se	254,80	246,60	182,46	270,19	0,085
Plasm_Se	95,40	76,36	77,09	87,90	0,425
GPX	12,21	30,308	15,07	39,90	0,683
SELENOP	-1173,33	1401,56	-222,73	1387,43	0,033
HbA_{1c}	-0,8	0,67	-0,8	2,05	0,715
Glicose	19,33	40,21	2,07	88,87	0,949

Legenda: D1: Distância 1; D2: Distância 2; Erit: Eritócitos; Plasm: Plasma; GPX: glutationa peroxidase; Se: selênio; SELENOP: selenoproteína P; HbA_{1c} Hemoglobina glicada. Teste Mann-Whitney para amostras independentes, p< 0,05.

Houve uma correlação positiva entre a variação na concentração de SELENOP e na distância interpessoal com o tratamento com castanha-do-brasil (p=0,008, r=0,48). Portanto, quanto mais resistente for a microbiota, menor a

variação de SELENOP após a intervenção. Para os demais marcadores de *status* de selênio, perfil glicêmico e permeabilidade intestinal avaliados, não foram observadas correlações significativas. Apresentamos também os resultados encontrados nos demais parâmetros avaliados, entretanto, nenhuma das diferenças foi mantida após a correção do valor de *p*.

Tabela 12. Correlação das variações das distâncias UniFrac e parâmetros bioquímicos. São Paulo, 2019.

	Weighted			*Unweighted*		
	R	pvalor	FDR	R	pvalor	FDR
HbA_{1c}	0,151	0,435	0,916	0,106	0,585	0,938
Glucose_mg	0,032	0,871	0,975	-0,106	0,585	0,938
GPX	-0,115	0,553	0,935	0,269	0,157	0,758
SELENOP_ngm	**0,485**	**0,008**	**0,133**	0,100	0,604	0,940
Eritr_Se_ug	-0,321	0,089	0,622	-0,058	0,766	0,953
Plasm_Se_ug	-0,114	0,557	0,936	0,201	0,296	0,884
Fezes_Se_ug	-0,243	0,204	0,794	0,283	0,137	0,738
LBP_ngml	0,285	0,134	0,731	0,202	0,292	0,884

Legenda: Erit: Eritócitos; Plasm: Plasma; GPX: glutationa peroxidase; Se:selênio; SELENOP: selenoproteína P; HbA_{1c} Hemoglobina glicada; Teste Mann-Whitney para amostras independentes, $p < 0,05$.

A microbiota tende a se manter estável. Isso devido ao fato da resiliência e resistência que a microbiota possui em relação a mudanças. A manutenção da microbiota saudável depende do equilíbrio entre os microorganismos e da interface intestinal do hospedeiro. Dessa forma, a microbiota atua como proteção contra doenças relacionadas a disbiose ou distúrbios metabólicos (SOMMER *et al.,* 2017). Segundo a dinâmica ecológica da microbiota, após uma perturbação ou intervenção, pode-se determinar se a microbiota é resistente, e assim, não será alterada, ou, não resistente quando após um evento muda em nível de espécies, gêneros e funções. Diante das três rotas plausíveis para alteração da microbiota, quais sejam: pequenas alterações passíveis de retorno ao estado anterior sem dificuldades, alterações

intermediárias, na qual microorganismos diferentes ao meio podem se estabelecer e a terceira quando as alterações são grandes e irreversíveis (MOYA; FERRER, 2016).

Propriedades como resistência, resiliência e redundância funcional estão presentes em microbiotas robustas, com capacidade de restaurar a função diante de alguma perturbação. Essa caracterização é complexa. No entanto, já foi observado que espécies próximas podem ter grandes diferenças genômicas, assim como respostas distintas a fatores ambientais (KELLER *et al.,* 2014)

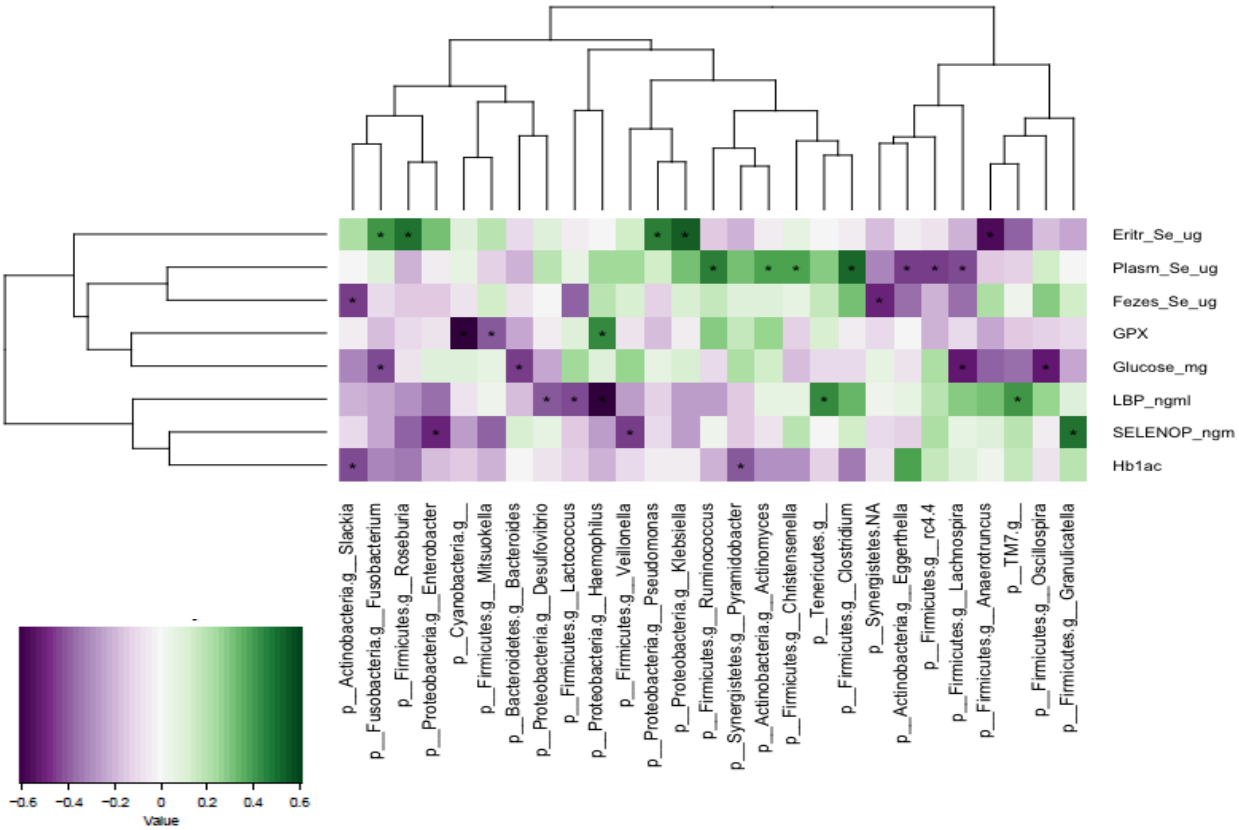
É necessário uma explicação funcional e mecanicista sobre composição da microbiota intestinal que confira fenótipos metabólicos estáveis, ou mesmo transferíveis, quando submetidos a doenças específicas ou a fatores ambientais (MOYA; FERRER, 2016). Nesse contexto, entende-se porque indivíduos apresentam respostas diferentes diante da mesma quantidade fornecida como suplementação

7.6.6. Associação entre a microbiota intestinal e os parâmetros de selênio, glicêmicos e LBP

Com propósito de analisar a relação entre microbiota e as variáveis bioquímicas medidas conduzimos as análises de correlação e regressão linear, sendo possível observar correlações entre gêneros e parâmetros bioquímicos.

A análise específica dos grupos taxonômicos foi primeiramente realizada utilizando a variação (delta) da abundância de gêneros e dos marcadores bioquímicos de *status* de selênio, parâmetros glicêmicos e permeabilidade intestinal entre os tempos. Assim, possibilitou-se estipular quais relações gêneros-bioquímicos ocorreram no período do estudo. Desta forma, foram selecionados os gêneros que apresentaram correlação com o delta dos parâmetros de status de selênio, marcadores glicêmicos e LBP. Dados apresentados na **Figura 23**.

Figura 23. Correlação entre a variação (delta) da abundância de gêneros e biomarcadores avaliados entre os tempos. São Paulo, 2019.



Legenda: Erit_Se_ug: Concentração de selênio nos eritrócitos; Plasm_Se_µg: Concentração de selênio no plasma; GPX: glutationa peroxidase; LBP: proteína ligadora de lipopolissacarídeo; HbA_{1c}: Hemoglobina glicada. p<0,05.

Observou-se correlação negativa entre a concentração de SELENOP com os gêneros *Veillonella* (r=-0,42; p=0,020) *e* positiva com gênero *Granulicatella* (r=-0,45; p=0,012), ambos do filo Firmicutes. A concentração de selênio nos eritrócitos foi correlacionada positivamente com *Fusobacterium* (r=-0,38; p=0,03); *Roseburia* (r=0,47; p=0,008) e negativamente com *Anaerotruncus* (r=-0,53; p=0,002), pertencentes ao filo Firmicutes.

Foi observada correlação positiva entre selênio plasmático e os gêneros *Actinomyces do* filo Actinobacteria (r=0,36; p=0,049) e *Clostridium* (r=0,50; p=0,005);

Christensenella (r=0,37; p=0,04); e *Ruminococcus* (r=0,45; p=0,013) do filo Firmicutes. Além disso, foi correlacionado negativamente com os gêneros *rc44* (r=-0,40; p=0,027) e *Lachnospira* (r=-0,39; p=0,025) do filo Firmicutes e *Eggerthella* (r=-0,42; p=0,022) do filo Actinobateria.

As fezes são o compartimento onde é possível estudar com maior precisão a interação entre microbioma e o selênio, porque trata-se da disponibilidade desse mineral após a utilização pelo hospedeiro. Houve correlação negativa com o gênero *Slackia* do filo Actinobacteria (r=-0,42; p=0,021).

O selênio em diferentes compartimentos apresentou correlações tanto positivas quanto negativas. Entre as correlações negativas, estavam gêneros comensais, como *Lachnospira, Veillonella, Anaerotruncus, rc44, Eggerthella* e *Slackia* que foram associados à infecção, maior ingestão calórica, aumento na concentração de glicose sérica, resistência à insulina, assim como disfunções metabólicas, doença inflamatória do intestino, obesidade e diabetes (CIUBOTARU *et al.,* 2015; SANTORU *et al.,* 2017; KAMEYAMA; ITOH, 2014).

Entre os correlacionados negativamente com a concentração de selênio destacam-se os gêneros *Lachnospira* e *Veillonella.* O gênero *Lachnospira* uma bactéria comensal que apresenta menor abundância em pacientes com doenças crônicas. Está associado à maior ingestão calórica, ao aumento da concentração de glicose sérica, redução dos níveis de insulina plasmática, assim como disfunções metabólicas, obesidade e diabetes. (CIUBOTARU *et al.,* 2015; KAMEYAMA; ITOH, 2014). Em relação ao gênero *Veillonella*, os resultados foram divergentes, foi observada tanto menor abundância em indivíduos com DM2 (KAMEYAMA; ITOH, 2014), assim como maior abundância em pacientes com DM1 (MURRI *et al.,* 2013).

Em relação as correlações positivas com as concentrações de selênio estavam os gêneros *Granulicatella, Fusobacterium, Roseburia, Actinomyces, Clostridium, Christensenella, Ruminococcus. Fusobacteria*, que apresentam menor abundância em indivíduos com DM2. Além disso, o gênero *Roseburia* está associado com a melhora da motilidade intestinal e proteção da barreira intestinal (KAMEYAMA; ITOH, 2014). No entanto, estudos também encontraram maior abundância dos gêneros *Clostridium e Ruminococcus* no grupo DM quando comparado ao controle (CIUBOTARU *et al.,* 2015. MURRI *et al.,* 2013).

Esses resultados mostram que o estado nutricional adequado de selênio se correlaciona com gêneros relacionados a microbiota de indivíduos saudáveis, tais como *Roseburia* e *Ruminococcus* produtores de AGCC, auxiliando na melhora funcional da microbiota.

Entre os marcadores glicêmicos, observou-se correlação negativa entre HbA_{1c} e o gênero *Slackia,* do filo e Actinobacteria (r=-0,25; p=0,014). E entre glicose sérica e os gêneros *Fusobacterium,* (Fusobacteria) (r=-0,38; p=0,031); *Bacteroides (Bacteroidetes)* (r=-040; p=0,028); *Oscillospira* (r=-0,49; p=0,005) *e Lachnospira* (r=-0,49; p=0,006) ambos do filo Firmicutes foi observada correlação negativa. Houve correlação negativa entre LBP e *Lactococcus* (Firmicutes) (r=-0,25; p=0,014).

Houve correlação negativa entre o gênero *Oscillospira* e a concentração de glicose, mas não houve correlação com os parâmetros de selênio. No entanto, após a intervenção com a castanha-do-brasil, a redução da concentração sérica de glicose foi significativa (% HbA_{1c} Δ -0,8 p< 0,001). Sendo assim, o consumo da castanha-do-brasil pode atuar como fator positivo na modulação da microbiota intestinal.

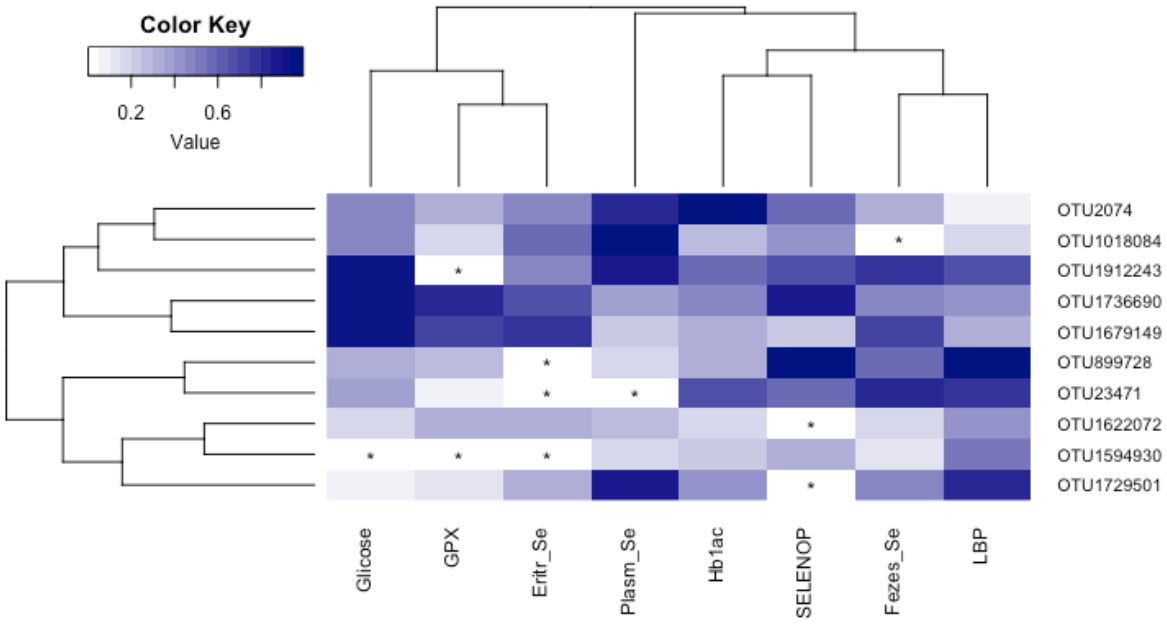
O gênero *Oscillospira* apresenta menor abundância em doenças inflamatórias, e maior abundância após consumo da dieta do mediterrâneo (HARO *et al.,* 2016), sendo, portanto, associado à uma microbiota saudável. Estudo conduzido em ratos observou aumento significativo (20%) da abundância de *Oscillospira* após a ingestão de 0,234 mg de selênio, no período de 11 a 20 semanas (SANTORU *et al.,* 2017).

Das análises de correlação realizadas neste estudo, aproximadamente 80% dos gêneros que se correlacionaram com biomarcadores de selênio são do Filo Firmicutes. Todos os gêneros correlacionados com selênio nas fezes participam do metabolismo bacteriano de selênio. A correlação do delta pós suplementação de selênio sugere que a intervenção foi positiva para disponibilizar mais selênio para microbiota, sem inibir o fornecimento para o hospedeiro.

A fim de avaliar a variação da microbiota intestinal, selecionamos as OTUs a partir dos três gêneros mais abundantes: *Bacteroides, Prevoltella e Sutterella*, em relação a variação dos parâmetros de *status* de selênio, perfil glicêmico e permeabilidade intestinal. Porém, como não foi observada relação entre Prevotella e

os parâmetros avaliados, não consideramos as OTUs desse gênero. Resultados apresentados na **Figura 24.**

Figura 24. Regressão linear entre os parâmetros glicêmicos, de permeabilidade intestinal, *status* de selênio e OTU relacionadas. São Paulo, 2019.



Legenda: os fatores das linhas explicam os das colunas. Heatmap construído com os valores de p. *p<0,05.

Todas as associações observadas foram negativas, ou seja, a presença das OTUs foi negativamente associada aos parâmetros avaliados.

A menor concentração de selênio nas fezes influencia a presença da OTU 1018084 *[Bacteroides]*. As OTUs 1729501 e OTU 1622072 *[Bacteroides]* influenciam a concentração de SELENOP no plasma, assim como a presença da OTU 899728 *[Bacteroides]* influencia a concentração de selênio nos eritrócitos e a OTU 23471 *[Bacteroides]* influencia tanto a concentração de selênio nos eritrócitos quanto no plasma e a atividade da GPX. Outra OTU relacionada à atividade da GPX foi 1912243 *[Sutterella].* A função do gênero *Sutterella* ainda não está totalmente elucidada, mas foi observada maior abundância em indivíduos com DM e sua presença foi associada à alguns casos de infecção.

Em relação aos marcadores glicêmicos, a presença da OTU 1594930 *[Bacteroides]* influencia a concentração de glicose sérica. Não foi observada relação entre as presenças das OTU e o percentual de hemoglobina glicada.

Até o momento, não foram encontrados estudos comparativos entre parâmetros glicêmicos, *status* de selênio, permeabilidade intestinal e OTUs. Esses resultados sugerem resistência desses microorganismos diante da intervenção com a castanha, não favorecendo o metabolismo de selênio. Nesse sentido, a presença de determinados microorganismos está relacionada à menor concentração de selênio no plasma e nos eritrócitos, menor concentração de SELENOP e menor atividade da GPX, mesmo diante da suplementação.

Este estudo apresentou algumas limitações. A adesão dos participantes em realizar todas as etapas propostas no estudo. Assim como, o uso de um alimento para suplementação inviabiliza o desenho de estudo do tipo simples ou duplo cego.

No entanto, a suplementação com castanha-do-brasil por um período maior, ajustando a quantidade de selênio fornecida, seria eficiente para avaliar a modulação da microbiota em relação à resistência e resiliência diante da intervenção.

7. CONCLUSÃO

A ingestão da castanha-do-brasil foi eficaz em melhorar o *status* de selênio e o controle glicêmico dos indivíduos com DM2. Porém sem alterar o grau de inflamação e de permeabilidade intestinal.

A composição global da microbiota não foi alterada pela suplementação com castanha-do-brasil, mas a variação da β diversidade indica diferentes comportamentos, sugerindo relativa resistência da microbiota diante da intervenção.

8. REFERÊNCIAS

AKSOY, N.; VURAL, H.; SABUNCU, T.; ARSLAN, O.; AKSOY, S. Benefical effects of vitamins C and E against oxidative stress in diabetic rats. **Nutrition Research**, v. 25, p. 625-630, 2005.

ALASALVAR, C.; KARAMAĆ, M.; AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Antioxidant and antiradical activities in extracts of hazelnut kernel (Corylus avellana L.) and hazelnut green leafy cover. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 54, n. 13, p. 4826-4832, 2006.

ALLIN, K.H.; TREMAROLI, V.; CAESAR, R.; JENSEN, B.A.H.; DAMGAARD, M.T.F.; *et al*. Aberrant intestinal microbiota in individuals with prediabetes. **Diabetologia**, v. 61, n. 4, p. 810-820, 2018.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes *Mellitus*. **Diabetes Care**, v. 42, 2019.

AOAC. Official Methods of Analysis. **Association of Official Analytical Chemist**, 2002-02. Washington DC, USA. 2002.

ARUMUGAM, M.; RAES, J.; PELLETIER, E.; LE PASLIER, D.; YAMADA, T.; MENDE, D. R. *et al*. Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, v. 473, n. 7346, p. 174-180, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA. **Diretrizes Brasileiras de Obesidade**, 4 ed, São Paulo, 2016.

AW, W.; FUKUDA, S. Understanding the role of the gut ecosystem in diabetes *mellitus*. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 9, n. 1, p. 5–12, 2018.

AZIZ, J. D. *et al*. Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 25, n. 1, p. 4–15, 2013.

BÄCKHED, F.; DING, H.; WANG, T.; HOOPER, L. V.; KOH, G. Y.; NAGY, A.; Semenkovich, C. F.; Gordon, J. I. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceeding of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 101, n. 44, p. 15718-15723, 2004.

BAHMANI, F.; KIA, M.; SOLEIMANI, A.; ASEMI, Z.; ESMAILLZADEH, A. Effect of selenium supplementation on glycemic control and lipid profiles in patients with diabetic nephropathy. **Biological Trace Element Research**, v. 172, n. 2, p. 282-9, 2016.

BALASUBASHINI, M. S.; RUKKUMANI, R.; VISWANATHAN, P.; MENON, V. P. Ferulic acid alleviates lipid peroxidation in diabetic rats. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 310-314, 2004.

BATISTA, B.L.; RODRIGUES, J.L.; NUNES, J.A.; SOUZA, V.C.; BARBOSA, F. J.R. Exploiting dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS) for sequential determination of trace elements in blood using a dilute-and-shoot procedure. **Analytica Chimica Acta**, v. 639, n. 1-2, p. 13-8, 2009.

BLASR, M.J. The microbiome revolution. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 10, p. 4162-5, 2014.

BOUCHER, J. L. Mediterranean Eating Pattern. **Diabetes Spectrum**, v. 30, n. 2, p. 72-76, 2017.

BRENT L.; W.M.; PAREKH, WT.; LIPKIN. I. Application of Novel PCR-Based Methods for Detection, Quantitation, and Phylogenetic Characterization of *Sutterella* Species in Intestinal Biopsy Samples from Children with Autism and Gastrointestinal Disturbances. **mBio**, v. 3, n. 1, 2012.

BURK, R. F.; LEVANDER, O. A. Selenium. In: Modern Nutrition in Health and Disease (Shils, M. E., Olson, J. A., Shike, M. & Ross, A. C., eds.), 9 ed., p. 285–302. Williams & Wilkins, Baltimore, MD. 2006.

BURK, R. F.; OLSON, G. E.; HILL, K. E.; WINFREY, V. P.; MOTLEY, A. K.; KUROKAWA, S. Maternal-fetal transfer of selenium in the mouse. **The FASEB Journal**, v. 27, n. 8, 2013.

CAMPBELL, A. P. DASH Eating Plan: An Eating Pattern for Diabetes Management. **Diabetes Spectrum**, v. 30, n. 2, p. 76-81, 2017.

CANDELA, M. *et al*. Inflammation and colorectal cancer, when microbiota-host mutualism breaks. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 4, p. 908-922, 2014.

CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, n. 5, p. 335-336, 2010.

CARABOTTI, M.; SCIROCCO, A.; SEVERI, C.; SEVERI, C. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. **Annals of Gastroenterology**, v. 28, n. 2, p. 203-209, 2015.

CARDOSO, B. R.; BUSSE, A. L.; DOMINIC, J. H.; COMINETTI, C.; HORST, M. A.; McCOLL, G.; MAGALDI, R. M.; JACOB-FILHO, W.; COZZOLINO, S. M. F. Pro198Leu polymorphism affects the selenium *status* and GPx activity in response to Brazil nut intake. **Food and Function**, v. 7, n. 2, p. 825-833, 2016.

CARDOSO, B.R.; ROBERTS, B.R.; BUSH, A.I.; HARE, D.J. Selenium, selenoproteins and neurodegenerative diseases. **Metallomics**, v. 7, n. 8, p. 1213-28, 2015.

CARICILLI, A. M.; PICARDI, P. K.; DE ABREU, L. L.; UENO, M.; PRADA, P. O.; ROPELLE, E. R.; HIRABARA, S.M.; CASTOLDI, A.; VIEIRA, P.; CAMARA, N. O. S.; CURI, R.; Carvalheira, J. B.; SAAD, M. J. A. Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice. **PLoS Biology**, p. 9-12, 2011.

CARVALHO, B.M.; GUADAGNINI, D.; TSUKUMO, D.M.L.; SCHENKA, A.A.; LATUF-FILHO, P.; *et al*. Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signalling in high-fat fed mice. **Diabetologia**, v. 55, n. 10, p. 2823-2834, 2012.

CERIELLO, A. Oxidative stress and glycemic regulation. **Metabolism**, v. 49, p. 27–29, 2000.

ASTHA CHAWLA, RAJEEV CHAWLA, AND SHALINI JAGGI. Microvasular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? **Indian J Endocrinol Metab**. V.20, n. 4, p.546–551, 2016.

CHEN, W.; LI, Y.; YANG, S.; YUE, L.; JIANG, Q.; XIA, W. Synthesis and antioxidant properties of chitosan and carboxymethyl chitosan-stabilized selenium nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, p. 574-81, 2015.

CHO, N. H.; SHAW, J. E.; KARURANGA, S.; HUANG, Y.; DA ROCHA FERNANDES, J. D.; OHLROGGE, A. W.; MALANDA, B. IDF Diabetes Atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 138, p. 271-281, 2018.

CHRISTENSEN, K.; WERNER, M.; MALECKI, K. Serum selenium and lipid levels: Associations observed in the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2011–2012. **Environmental Research**, v. 140, p. 76-84, 2015.

CIUBOTARU, I.; GREEN, S. J.; SUBHASH KUKREJA, S.; BARENGOLTS, E. Significant differences in fecal microbiota are associated with various stages of glucose tolerance in African American male veterans. **Translational Research**, v. 166, n. 5, p. 401-411, 2015.

COLPO, E.; DALTON, D. A. V. C.; REETZ, L. G. *et al*. Brazilian nut consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters. **Nutrition**, v. 30, p. 459-465, 2014.

COMBS JR, G. F. Biomarkers of Selenium Status. **Nutrients**, v. 7, n. 4, p. 2209-2236, 2015.

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

CONCANNON, P.; ERLICH, H.A.; JULIER, C.; MORAHAN, G.; NERUP, J.; POCIOT, F.; *et al*. Type 1 Diabetes Genetics Consortium. Type 1 diabetes: evidence for susceptibility loci from four genome-wide linkage scans in 1,435 multiplex families. **Diabetes**, v. 54, n. 10, p. 2995-3001, 2005.

CORNIER, M. A.; DESPRES, J. P.; DAVIS, N. Assessing adiposity: a scientific statement from the American Heart Association. **Circulation**, v. 124, n. 18, p.1996-2019, 2011.

COSKUN, O.; KANTER, M.; KORKMAZ, A.; OTER, S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β-cell damage in rat pancreas. **Pharmacological Research***,* v. 51, p. 117-123, 2005.

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

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

DONADIO, J. L. S.; ROGERO, M. M.; SHINOHARA, E. M. G.; DESMARCHELIER, C.; BOREL, P.; COZZOLINO, S. M. F. SEPP1 polymorphisms modulate serum glucose and lipid response to Brazil nut supplementation. **European Journal of Nutrition**, v. 57, n. 5, p. 1873-1882, 2018.

DONADIO, J.L.S.; ROGERO, M.M.; GUERRA-SHINOHARA, E.M.; BARBOSA, F.J.R.; DESMARCHELIER, C.; *et al*. Genetic variants in selenoprotein genes modulate biomarkers of selenium status in response to Brazil nut supplementation (the SU.BRA.NUT study). **Clinical Nutrition**, v. 38, n. 2, p. 539-548, 2019.

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

EGSHATYAN, L.; KASHTANOVA, D.; POPENKO, A.; TKACHEVA O.; TYAKHT, A.; ALEXEEV, D.; KARAMNOVA, N.; KOSTRYUKOVA, E.; BABENKO, V.; VAKHITOVA, M.; BOYTSOV, S. Gut microbiota and diet in patients with different glucose tolerance. **Endocrine Connections**, v. 5, n. 1, p. 1–9, 2016.

ELIASSON, L.; ABDULKADER, F.; BRAUN, M.; GALVANOVSKIS, J.; HOPPA, M. B.; RORSMAN, P.; FAINSTEIN, M. K. Nrf2: La historia de un nuevo factor detranscripción que responde a estrés oxidativo. **Revista de Educación Bioquímica**, v. 26, p. 18-25, 2007.

EMADIAN, A.; ANDREWS, R. C.; ENGLAND, C. Y.; WALLACE, V.; THOMPSON, J. L. The effect of macronutrients on glycemic control: a systematic review of dietary randomized controlled trials in overweight and obese adults with type 2 diabetes in which there was no significant difference in weight loss between treatment groups. **British Journal of Nutrition**, v. 114, p. 1656–1666, 2015.

FAGHIHI, T.; RADFAR, M.; BARMAL, M.; AMINI, P.; QORBANI, M.; ABDOLLAHI, M. *et al*. A randomized, placebo-controlled trial of selenium supplementation in patients with type 2

diabetes: effects on glucose homeostasis, oxidative stress, and lipid profile. **American Journal of Therapeutics**, v. 21, n. 6, p. 491-495, 2014.

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

FAIRWEATHER-TAIT, S. J.; COLLINGS, R.; HURST, R. Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 91, p. 1484S–91S, 2010.

FANGMANN, D.; THEISMANN, E. M.; TÜRK, K.; SCHULTE, D. M.; RELLING, I.; HARTMANN, K.; KEPPLER, J. K.; KNIPP, J. R.; REHMAN, A.; HEINSEN, F. A.; FRANKE, A.; LENK, L.; FREITAG-WOLF, S.; APPEL, E.; GORB, S.; BRENNER, C.; SEEGERT, D.; WAETZIG, G. H.; ROSENSTIEL, P.; SCHREIBER, S.; SCHWARZ, K.; LAUDE, M. Targeted Microbiome Intervention by Microencapsulated Delayed-Release Niacin Beneficially Affects Insulin Sensitivity in Humans. **Diabetes Care**, v. 41, n. 3, p. 398-405, 2018.

FENG, W.; CUI, X.; LIU, B.; LIU, C.; XIAO, Y.; LU, W.; *et al*. Association of urinary metal profiles with altered glucose levels and diabetes risk: a population-based study in china. **PLoS One**, v. 10, n. 4, e0123742, 2015.

FERNANDES, J.; SU, W.; RAHAT-ROZENBLOOM, S.; WOLEVER, T. M.; COMELLI, E. M. Adiposity, gut microbiota and faecal short chain fatty acids are linked in adult humans. **Nutrition & Diabetes**, v. 4, n. 6, 2014.

FERREIRA, K.S.; GOMES, J.C.; BELLATO, C.R.; JORDÃO, C.P. Selenium concentration in food consumed in Brazil. **Revista Panamericana de Salud**, v. 11, p. 172-177, 2002.

FESTA, A.; D'AGOSTINO, R. J. R.; HOWARD, G.; MYKKANEN, L.; TRACY, R. P.; HAFFNER, S. M. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). **Circulation**, v. 102, n. 1, p. 42-47, 2000.

FINUCANE, M. M.; SHARPTON, T. J.; LAURENT, T. J.; POLLARD, K. S. A taxonomic signature of obesity in the microbiome? Getting to the guts of the matter. **PloS One**, v. 9, e84689, 2014.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

FONTELA, P. C.; WINKELMANN, E. R.; VIECILI, P. R. N. Study of conicity index, body mass index and waist circumference as predictors of coronary artery disease. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v.36, n.5, p.333-408, 2017.

FONTENELLE, L. C.; FEITOSA, M. M.; MORAIS, J. B. S.; SEVERO, J. S.; FREITAS, T. E. C.; BESERRA, J. B.; HENRIQUES, G. S.; MARREIRO, D.N. The role of selenium in insulin resistance. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. 1, e00139, 2018.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO)/WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)/UNITED NATIONS UNIVERSITY (UNU). Human Energy Requirements. Rome: FAO, 2004. (Food and Nutrition Technical Report Series, 1).

FORSLUND, K.; HILDEBRAND, F.; NIELSEN, T.; FALONY, G.; CHATELIER, E.; SUNAGAWA, S.; PRIFTI, E.; VIEIRA-SILVA, S.; GUDMUNDSDOTTIR, V.; PEDERSEN, H. K.; ARUMUGAM, M.; KRISTIANSEN, K.; VOIGT, A. Y.; VESTERGAARD, H.; HERCOG, R.; COSTEA, P. I.; KULTIMA, J. R.; LI, J.; JØRGENSEN, T.; LEVENEZ, F.; DORE, J.; METAHIT CONSORTIUM, NIELSEN, H.B.; BRUNAK, S.; RAES, J.; HANSEN, T.; WANG, J.; EHRLICH, S. D.; BORK, P.; PEDERSEN, O. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. **Nature**, v. 528, n. 7581, p. 262–266, 2015.

FRÖHLICH, M.; IMHOF, A.; BERG, G.; HUTCHINSON, W.L.; PEPYS, M.B.; *et al*. Association between C-reactive protein and features of the metabolic syndrome: a population-based study. **Diabetes Care**, v. 23, n. 12, p. 1835-9, 2000.

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

FUGMANN, M.; BREIER, M.; ROTTENKOLBER, M.; BANNING, F.; FERRARI, U.; SACCO, V.; GRALLERT, H.; PARHOFER, K. G.; SEISSLER, J.; CLAVEL, T.; LECHNER, A. The stool microbiota of insulin resistant women with recent gestational diabetes, a high risk group for type 2 diabetes. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, 2015.

FUKUDA, S.; TOH, H.; HASE, K.; OSHIMA, K.; NAKANISHI, Y.; YOSHIMURA, K.; *et al*. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. **Nature**, v. 469, n. 7331, p. 543-7, 2011.

GAO, H.; HÄGG, S.; SJÖGREN, P.; LAMBERT, P.C.; INGELSSON, E.; *et al*. Serum selenium in relation to measures of glucose metabolism and incidence of Type 2 diabetes in an older Swedish population. **Diabetic Medicine**, v. 31, n. 7, p. 787-793, 2014.

GARCIA-ALOY, M.; HULSHOF, P. J. M.; ESTRUEL-AMADES, S.; OSTÉ, M. C. J.; LANKINEN, M.; GELEIJNSE, J.M.; GOEDE, J.D. *et al*. Biomarkers of food intake for nuts and vegetable oils: an extensive literature search. **Genes & Nutrition**, v. 14, p. 7, 2019.

GARRETT, W.S. Cancer and the microbiota. Science, v. 348, n. 6230, p. 80-6, 2015.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative Stress and Diabetic Complications. **Circulation Research**, v. 107, p. 1058-1070, 2010.

GLADYSHEV, V. N.; ARNÉR, E. S.; BERRY, M.J.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; BRUFORD, E.A.; BURK, R. F.; CARLSON, B. A.; CASTELLANO, S.; CHAVATTE, L.; CONRAD, M. COPELAND, P. R.; DIAMOND, A. M.; DRISCOLL, D. M. et al.. Selenoprotein Gene Nomenclature. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 46, 9. 14026-14040, 2016.

GOLDIN, A.; BECKMAN, J.A.; SCHMIDT, A.M.; CREAGER, M.A. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation**, v. 114, n. 6, p. 597-605, 2006.

GOMES, J. M. G.; COSTA, J. A.; ALFENAS, R. C. G. Metabolic endotoxemia and diabetes *mellitus*: A systematic review. **Metabolism**, v. 68, p. 133–144, 2017.

GOODGE, K. A.; HUTTON, J. C. Translational regulation of proinsulin biosynthesis and proinsulin conversion in the pancreatic β-cell. **Seminars in Cell and Development Biology**, v. 11, n. 4, p. 235-242, 2000.

GRAY, N.; PICONE, G.; SLOAN, F.; YASHKIN, A. Relation between BMI and diabetes *mellitus* and its complications among US older adults. **Southern Medical Journal**, v. 108, n. 1, p. 29-36, 2015.

GRAVES LE; DONAGHUE KC. Management of diabetes complications in youth. Ther Adv Endocrinol Metab. 2019

GURUNG, P; JIALAL, L. Plasma Glucose. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**. 2019.

HARO, C.; MONTES-BORREGO, M.; RANGEL-ZÚÑIGA, O. A.; ALCALÁ-DÍAZ, J. F.; GÓMEZ-DELGADO, F.; PÉREZ-MARTÍNEZ, P.; DELGADO-LISTA, J.; QUINTANA-NAVARRO, G. M.; TINAHONES, F. J.; LANDA, B. B.; LÓPEZ-MIRANDA, J.; CAMARGO, A.; PÉREZ-JIMÉNEZ, F. Two Healthy Diets Modulate Gut Microbial Community Improving Insulin Sensitivity in a Human Obese Population. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 101, n. 1, p. 233-242, 2016.

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

HOLLISTER, E.B.; GAO, C.; VERSALOVIC, J. Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. **Gastroenterology**, v. 146, n. 6, p. 1449-58, 2014.

HOLZER, P.; REICHMANN, F.; FARZI, A. Neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide in the gut-brain axis. **Neuropeptides**, v. 46, n. 6, p. 261-274, 2012.

HRDINA, J. *et al*. The gastrointestinal microbiota affects the selenium status and selenoprotein expression in mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, n. 8, p. 638-648, 2009.

HU, Y.; MCINTOSH, G. H.; LE LEU, R. K.; SOMASHEKAR, R.; MENG, X. Q.; GOPALSAMY, G.; BAMBACA, L. Supplementation with Brazil nuts and green tea extract regulates targeted biomarkers related to colorectal cancer risk in humans. **British Journal of Nutrition**, v. 116, n. 11, p.1901-1911, 2016.

HUGHES, D.; KUNICKÁ, T.; SCHOMBURG, L.; LIŠKA, V.; SWAN, N.; SOUČEK, P. Expression of Selenoprotein Genes and Association with Selenium Status in Colorectal Adenoma and Colorectal Cancer. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1812, 2018.

HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 207-14, 2012.

HUTTENHOWER, C. *et al*. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 207-214, 2012.

HYBSIER, S.; SCHULZ, T.; WU, Z.; DEMUTH, I.; MINICH, WB.; RENKO, K.; RIJNTIES, E. *et al*. Sex- specific and inter-individual differences in biomarkers of selenium status identified by a calibrated ELISA for selenoprotein P. **Redox Biology**, v. 11, p. 403-414, 2017.

INSTITUTE OF MEDICINE (US) Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds. Washington (DC): **National Academies Press** (US); 2000.

INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. **The National Academies Press**, 2005.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERETION. **Diabetes Atlas–Diabetes by region**, p. 1-3, 2017.

IWAI, S.; WEINMAIER, T.; SCHMIDT, B.L.; ALBERTSON, D.G.; *et al.* Piphillin: Improved Prediction of Metagenomic Content by Direct Inference from Human Microbiomes. **PLoS One**, v. 11, n. 11, e0166104, 2016.

JANDHYALA, S. M.; MADHULIKA, A.; DEEPIKA, G.; RAO, G. V.; REDDY, D. N.; SUBRAMANYAM, C.; SASIKALA, M.; TALUKAR, R. Altered intestinal microbiota in patients with chronic pancreatitis: implications in diabetes and metabolic abnormalities. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

JAYASHREE, B.; BIBIN, Y. S.; PRABHU, D.; SHANTHIRANI, C. S.; GOKULAKRISHNAN, K.; LAKSHMI, B. S.; MOHAN, V.; BALASUBRAMANYAM, M. Increased circulatory levels of lipopolysaccharide (LPS) and zonulin signify novel biomarkers of proinflammation in patients with type 2 diabetes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 388, n. 1-2, p. 203, 2014.

JUMPERTZ, R.; LE, D. S.; TURNBAUGH, P. J.; TRINIDAD, C.; BOGARDUS, C.; GORDON, J. I.; KRAKOFF, J. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans**. American Journal of Clinical Nutrition**, v. 94, p. 58-65, 2011.

KAMEYAMA, K.; ITOH, K. Intestinal Colonization by a Lachnospiraceae Bacterium Contributes to the Development of Diabetes in Obese Mice. **Microbes and Environments**, v. 29, n. 4, p. 427-430, 2014.

KARLSSON, F.; TREMAROLI, V.; NOOKAEW, I.; BERGSTRO, M, G.; BEHRE, C. J.; FAGERBERG, B.; NIELSEN, J.; BACKHED, F. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. **Nature**, v. 498, n. 7452, p. 99-105, 2013.

KASAIKINA, M. V. *et al*. Dietary selenium affects host selenoproteoma expression by influencing the gut microbiota. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 7, p. 2492-2499, 2011.

KELLER, A.; HORN, H.; FÖRSTER, F.; SCHULTZ, J. Computational integration of genomic traits into 16S rDNA microbiota sequencing studies. **Gene**, v. 549, p. 186–191, 2014.

KIPP, A. P.; STROHMB, D.; BRIGELIUS-FLOHÉA, R.; SCHOMBURGC, L.; BECHTHOLDB, A.; LESCHIK-BONNET, E.; HESEKER, H; GERMAN NUTRITION SOCIETY (DGE). Revised reference values for selenium intake. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 32, p. 195–199, 2015.

KOLA B. Role of AMP-activated protein kinase in the control of appetite. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, n. 7, p. 942-951, 2008.

KRITTAPHOL, W.; MCDOWELL, A.; THOMSON, C. D.; MIKOV, M.; FAWCETT, J. P. Biotransformation of L-selenomethionine and selenite in rat gut contents. **Biological Trace Element Research**, v. 139, n. 2, p. 188-196, 2011.

KUROKAWA, S.; HILL, K. E.; MCDONALD, W. H.; BURK, R. F. Long isoform mouse selenoprotein P (Sepp1) supplies rat myoblast L8 cells with selenium via endocytosis mediated by heparin binding properties and apolipoprotein E receptor-2 (ApoER2). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 34, p. 28717–28726, 2012.

LABUNSKYY, V. M.; HATFIELD, D. L.; GLADYSHEV, V. N. Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. **Physiologicals Reviews**, v. 94, n. 3, p. 739-777, 2014.

LAND, W. G. The Role of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) in Human Diseases. Part II: DAMPs as diagnostics, prognostics and therapeutics in clinical medicine. **Sultan Qaboos University Medical Journal**, v. 15, n. 2, p. 157–170, 2015.

LARSEN, N.; VOGENSEN, F. K.; VAN DEN BERG, F. W. J.; NIELSEN, D. S.; ANDREASEN, A. S.; PEDERSEN, B. K.; AL-SOUD, W. A.; SORENSEN, S. J.; HANSEN, L. H.; JAKOBSEN, M. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. **PloS one**, v. 5, n. 2, e. 9085, 2010.

LE CHATELIER, E.; NIELSEN, T.; QIN, J.; PRIFTI, E.; HILDEBRAND, F.; FALONY, G.; ALMEIDA, M.; *et al.* Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. **Nature**, v. 500, n. 7464, p. 541-6, 2013.

LEE, H. C.; YU, S. C.; LO, Y. C.; LIN, I. H.; TUNG, T. H.; HUANG, S. Y. A high linoleic acid diet exacerbates metabolic responses and gut microbiota dysbiosis in obese rats with diabetes *mellitus.* **Food & Function**, v. 10, n. 2, p. 786-798, 2019.

LEY, R. E.; TURNBAUGH, P. J.; KLEIN, S.; GORDON, J. I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1022–1023, 2006.

LEY, S. H.; HAMDY, O.; MOHAN, V.; HU, F. B. Prevention and management of type 2 diabetes: dietary components and nutritional strategies. **Lancet**, v. 383, n. 9933, p. 1999–2007, 2014.

LI, J. *et al*. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. **Nature** Biotechnology, v. 32, p. 834–841, 2014.

LIN, B. Y.; LIN, W. D.; HUANG, C. K.; HSIN, M. C.; LIN, W. Y.; PRYOR, A. D. Changes of gut microbiota between different weight reduction programs. **Surgery for Obesity Related Diseases**, 2019.

LIN, J.; PENG, T.; JIANG, L.; NI, J.Z.; LIU, Q.; CHEN, L. *et al.* Comparative genomics reveals new candidate genes involved in selenium metabolism in prokaryotes. **Genome Biology and Evolution**, v. 7, p. 664–676, 2015.

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. UniFrac: A New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8228–8235, 2005.

MACCAFERRI, S.; BIAGI, E.; BRIGIDI, P. Metagenomics: Key to human gut microbiota. **Digestive Diseases**, v. 29, n. 6, p. 525-530, 2011.
MARIN, I.A.; GOERTZ, J.E.; REN, T.; RICH, S.S.; ONENGUT-GUMUSCU, S.; FARBER, E.; *et al.* Microbiota alteration is associated with the development of stress-induced despair behavior. **Scientific Reports**, v. 7, p. 43859, 2017.

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

MARTELLI, F.; NUNES, F.M.F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 3, p. 54-57, 2014.

MAYER, J. P.; ZHANG, F.; DIMARCHI, R. D. Insulin structure and function. **Biopolymers**, v. 88, n. 5, p. 687-713, 2007.

MCMACKEN, M.; SHAH, S. A plant-based diet for the prevention and treatment of type 2 diabetes. **Journal of Geriatric Cardiology**, v. 14, n. 5, p. 342-354, 2017.

McPHEE, J. B.; SCHERTZER, J. D. Immunometabolism of obesity and diabetes: microbiota link compartmentalized immunity in the gut to metabolic tissue inflammation. **Clinical Science**, v. 129, p.1083–1096, 2015.

MEDINA-VERA, I.; SANCHEZ-TAPIA, M.; NORIEGA-LÓPEZ, L.; GRANADOS-PORTILLO, O.; GUEVARA-CRUZ, M.; FLORES-LÓPEZ, A.; AVILA-NAVA, A.; FERNÁNDEZ, M. L.; TOVAR, A. R.; TORRES, N. A dietary intervention with functional foods reduces metabolic endotoxaemia and attenuates biochemical abnormalities by modifying faecal microbiota in people with type 2 diabetes. **Diabetes and Metabolism**, v. 45, n. 2, p. 122-131, 2019.

MOYA, A.; FERRER, M. Functional Redundancy-Induced Stability of Gut Microbiota Subjected to Disturbance. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 5, p. 402–413, 2016.

MUELLER, A. S.; MUELLER, K.; WOLF, N. M.; PALLAUF, J. Selenium and diabetes: an enigma? **Free Radical Research**, v. 43, n. 11, p. 1029-1059, 2009.

MULCAHY, K.; MARYNIUK, M.; PEEPLES, M.; PEYROT, M.; ROMKY, D.; WEAVER, T *et al*. Diabetes self-management education core outcomes measures. **The Diabetes Educator**, v. 29, n. 5, p. 768-70, 2003.

MURRI, M.; LEIVA, I.; GOMEZ-ZUMAQUERO, J. M.; TINAHONES, F. J.; CARDONA, F.; SORIGUER, F.; QUEIPO-ORTUÑO, M. I. Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. **BMC Medicine**, v. 11, p. 46, 2013.
MURROW, B. A.; HOEHN, K. L. Mitochondrial regulation of insulin action. **International Journal of Biochemistry Cell Biology**, v. 42, p. 1936–1939, 2010.

NAVAB-MOGHADAM, F.; SEDIGHI, M.; KHAMSEH, M.E.; ALAEI-SHAHMIRI, F.; TALEBI, M.; *et al*. The association of type II diabetes with gut microbiota composition. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 630-636, 2017.

NAVIA, B.; ORTEGA, R.M.; PEREA, J.M.; APARICIO, A.; LÓPEZ-SOBALER, A.M.; *et al*. Selenium status in a group of schoolchildren from the region of Madrid, Spain. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 27, suppl. 2, p. 239-246, 2014.

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

NYMARK, M.; PUSSINEN, P. J.; TUOMAINEN, A. N.; FORSBLOM, C.; PER-HENRIK, GROOP.; LEHTO, M. Serum Lipopolysaccharide Activity Is Associated With the Progression of Kidney Disease in Finnish Patients With Type 1 Diabetes. Diabetes Care, v. 32, n. 9, 2009.

OBBERGHEN, E. V. Surfing the insulin signaling web. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 31, p. 966–977, 2001.

OLSON, G. E.; WINFREY, V. P.; HILL, K. E.; BURK, R. F. Megalin mediates selenoprotein P uptake by kidney proximal tubule epithelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 11, p. 6854–6860, 2008.

OMI, R.; KUROKAWA, S.; MIHARA, H.; HAYASHI, H.; GOTO, M.; MIYAHARA, I.; KURIHARA, T.; HIROTSU, K.; ESAKI, N. Reaction Mechanism and Molecular Basis for Selenium/Sulfur Discrimination of Selenocysteine Lyase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 16, p. 12133-12139, 2010.

OO S. M.; MISU, H.; SAITO, Y.; TANAKA, M.; KATO, S.; KITA, Y.; TAKAYAMA, H.; TAKESHITA, Y.; KANAMORI, T.; NAGANO, T.; NAKAGEN, M.; URABE, T.; MATSUYAMA, N.; KANEKO, S.; TAKAMURA, T. Serum selenoprotein P, but not selenium, predicts future hyperglycemia in a general Japanese population. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 16727, 2018.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 70, n. 1, p. 158-69, 1967.

PATTERSON, A. M.; MULDER, I. E.; TRAVIS, A. J.; LAN, A.; CERF-BENSUSSAN, N.; GABORIAU-ROUTHIAU, V.; GARDEN, K.; LOGAN, E.; DELDAY, M. I.; COUTTS, A. G. P.; MONNAIS, E.; FERRARIA, V. C.; INOUE, R.; GRANT, G.; AMINOV, R. I. Human Gut Symbiont Roseburia hominis Promotes and Regulates Innate Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1166, 2017.

PATTERSON, E.; RYAN, P.M.; CRYAN, J.F.; DINAN, T.G.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. Gut microbiota, obesity and diabetes. **Postgraduate Medical Journal**, v. 92, n. 1087, p. 286-300, 2016.

PAUN, A.; DANSKA, J. S. Modulation of type 1 and type 2 diabetes risk by the intestinal microbiome. **Pediatric Diabetes**, v. 17, n. 7, p. 469-477, 2016.

PAWLAK, R. Vegetarian Diets in the Prevention and Management of Diabetes and Its Complications. **Diabetes Spectrum**, v. 30, n. 2, p. 82-88, 2017.

PENG, T.; LIN, J.; XU, Y.Z.; ZHANG, Y. Comparative genomics reveals new evolutionary and ecological patterns of selenium utilization in bacteria. **The ISME Journal**, v. 10, n. 8, p. 2048–2059, 2016.

PFLUGHOEFT, K. J.; VERSALOVIC, J. Human microbiome in health and disease. **Annual Review of Pathology**, v. 7, p. 99-122, 2012.

PIRES, L. V. Efeito da suplementação com castanha-do-brasil (Bertholletia excelsa H.B.K.) na expressão gênica de citocinas inflamatórias e sua relação com o estresse oxidativo em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1. 2012. 165 p. Tese (Doutorado em Ciência dos

Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

POSSEMIERS, S. *et al*. The Intestinal Environment in Health and Disease – Recent Insights on the Potential of Intestinal Bacteria to Influence Human Health. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 18, p. 2051-2065, 2009.

POUNIS, G.; COSTANZO, S.; PERSICHILLO, M.; CURTIS, A.; SIERI, S.; VINCETI, M. *et al*. Mushroom and dietary selenium intakes in relation to fasting glucose levels in a free-living Italian adult population: The Moli-sani Project. **Diabetes & Metabolism**, v. 40, n. 1, p. 34-42, 2014.

QIN, J.; LI, Y.; CAI, Z.; LI, S.; ZHU, J.; ZHANG, F.; LIANG, S. *et al*. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 55–60, 2012.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P; PEPLIES J.; GLÖCKNER, FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, (Database issue): D590–D596, 2013.

QUESADA, I. *et al*. Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. **The Journal of Endocrinology**, v. 199, n. 1, p. 5–19, 2008.

RAYMAN, M. P.; INFANTE, H. G.; SARGENT, M. Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. **British Journal of Nutrition**, v. 100. p. 238-253, 2008.

REHMAN, K.; AKASH, M. S. H. Mechanism of Generation of Oxidative **Stress** and Pathophysiology of Type 2 **Diabetes Mellitus**: How Are They Interlinked? Journal of Cellular Biochemistry, v. 118, n. 11, p. 3577-3585, 2017.

ROBERFROID, M.; GIBSON, G. R.; HOYLES, L.; MCCARTNEY, A. L.; RASTALL, R.; ROWLAND, I. *et al*. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, v. 104, suppl. 2, p. 1-63, 2010.

SANTORU, M. L.; PIRAS, C.; MURGIA, A.; PALMAS, V.; CAMBONI, T.; LIGGI, S.; IBBA, I.; LAI, M. A.; ORRÙ, S.; BLOIS, S.; LOIZEDDA, A. L.; GRIFFIN, J. L.; USAI, P.; CABONI, P.; ATZORI, L.; MANZIN, A. Cross sectional evaluation of the gut-microbiome metabolome axis in an Italian cohort of IBD patients. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 9523, 2017.

SBD, Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes, 2014-2015.

SCHOMBURG, L.; SCHWEIZER, U. Hierarchical regulation of selenoprotein expression and sex-specific effects of selenium. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, n. 11, p. 1453-62, 2009.

SCHWIERTZ, A.; TARAS, D.; SCHÄFER, K.; BEIJER, S.; BOS, N. A.; DONUS, C. *et al*. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. **Obesity**, v. 18, p. 190-195, 2010.

SEALE, L. A.; HA, H. Y.; HASHIMOTO, A. C.; BERRY, M. J. Relationship between selenoprotein P and selenocysteine lyase: Insights into selenium metabolism. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 127, p. 182-189, 2018.

SHAW, J. E.; SICREE, R. A.; ZIMME, P. Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 87, p. 4-14, 2010.

SHETTY, S. P.; COPELAND, P. R. The Selenium Transport Protein, Selenoprotein P, Requires Coding Sequence Determinants to Promote Efficient Selenocysteine Incorporation. **Journal of Molecular Biology**, v. 430, n. 24, p. 5217-5232, 2018.

SHETTY, S.; MARSICANO, J. R.; COPELAND, P. R. Uptake and Utilization of Selenium from Selenoprotein P. **Biological Trace Element Research**, v. 181, n. 1, p. 54–61, 2017.

SHOELSON, S. E.; LEE, J.; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 7, p. 1793-801, 2006.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180–183, 2015.

SILVA JUNIOR, E. C.; WADT, L. H. O.; SILVA, K. E.; LIMA, R. M. B.; BATISTA, K. D.; GUEDES, M. C.; CARVALHO, G. S. *et al*. Natural variation of selenium in Brazil nuts and soils from the Amazon region. **Chemosphere**, v. 188, p. 650–658, 2017.

SINDHU, R. K.; KOO, J. R.; ROBERTS, CK.; VAZIRI, N. D. Dysregulation of hepatic superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in diabetes: response to insulin and antioxidant therapies. **Clinical Experimental Hypertension**, v. 26, p. 43-53, 2004.

SMITH, U. Abdominal obesity: a marker of ectopic fat accumulation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 5, p. 1790-1792, 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. VI Diretriz de Dislipidemia, v. 109, n. 2, Suppl. 1, 2017.

SOMMER, F.; ANDERSON, J.M.; BHARTI, R.; RAES, J.; ROSENSTIEL, P. The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 10, p. 630-638, 2017.

STEINBRENNER, H.; AL-QURAISHY, S.; DKHIL, M. A.; WUNDERLICH, F.; SIES, H. Dietary selenium in adjuvant therapy of viral and bacterial infections. **Advances in Nutrition**, v. 6, n. 1, p. 73–82, 2015.

STEINBRENNER, H. Interference of selenium and selenoproteins with the insulin-regulated carbohydrate and lipid metabolism. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 1538-47, 2013.

STOCKLER-PINTO, M.B.; MALM, O.; AZEVEDO, S.R.; FARAGE, N.; DORNELES, P.R.; *et al.* Selenium plasma levels in hemodialysis patients: comparison between North and Southeast of Brazil. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 36, n. 4, p. 490-5, 2014.

STOFFANELLER, R.; MORSE, N. L. A Review of Dietary Selenium Intake and Selenium Status in Europe and the Middle East. **Nutrients**, v. 7, n. 3, p. 1494-1537, 2015.

STRUNZ, C. C.; OLIVEIRA, T. V.; VINAGRE, J. C.; LIMA, A.; COZZOLINO, S. M. F.; MARANHÃO, R. C. Brazil nut ingestion increased plasma selenium but had minimal effects on lipids, apolipoproteins, and high-density lipoprotein function in human subjects. **Nutrition Research**, v. 28, n. 3, p. 151-5, 2008.

TARASOVA, A; DUSONCHET, J.; ASHCROFT, F. Metabolic regulation of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K+ channel: a pas de deux. **Diabetes**, v. 53, suppl. 3, p. 113-122, 2004.

TEISSIER, T.; BOULANGER, É. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is an important pattern recognition receptor (PRR) for inflammaging. **Biogerontology**, 2019.

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

TILVES, C. M.; ZMUDA, J. M.; KUIPERS, A. L.; NESTLERODE, C. S.; EVANS, R. W.; BUNKER, C. H.; PATRICK, A. L.; MILJKOVIC, I.; Association of Lipopolysaccharide-Binding Protein With Aging-Related Adiposity Change and Prediabetes Among African Ancestry Men. **Diabetes Care**, v. 39, n. 3, p. 385-391, 2016.

TRASANDE, L.; BLUSTEIN, J.; LIU, M.; CORWIN, E.; COX, L. M.; BLASER, M. J. Infant antibiotic exposures and early-life body mass. **International Journal of Obesity**, v. 37, p. 16–23, 2013.

TÓBON-VELASCO, J.C.; CUEVAS, E.; TORRES-RAMOS, M.A. Receptor for AGEs (RAGE) as mediator of NF-kB pathway activation in neuroinflammation and oxidative stress. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 13, n. 9, p. 1615-1626, 2014.

TURNBAUGH, P. J.; HAMADY, M.; YATSUNENKO, T.; CANTAREL, B. L.; DUNCAN, A.; LEY, R. E. *et al*. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, v. 457, p. 480–484, 2009.

TURNBAUGH, P.J.; RIDAURA, V.K.; FAITH, J.J.; REY, FE.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. **Science Translational Medicin**e, v. 1, n. 6, 2009.

UDAYAPPAN, S.D.; HARTSTRA, A.V.; DALLINGA-THIE, G.M.; NIEUWDORP, M. Intestinal microbiota and faecal transplantation as treatment modality for insulin resistance and type 2 diabetes *mellitus*. **British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology**, v. 177, p. 24–29, 2014.

ULVEN T. Short-chain free fatty acid receptors FFA2/GPR43 and FFA3/GPR41 as new potential therapeutic targets. **Frontier Endocrinology**, v. 3, p.111, 2012.

VALDEZ, R. A simple model-based index of abdominal adiposity. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 44, n. 9, p. 955-956, 1991.

VASQUES, A.C.J.; PRIORE, S.E.; ROSADO, L.E.F.P.L; FRANCESCHINI, S.C.C. The use of anthropometric measures to assess visceral fat accumulation**. Revista de Nutrição**, v. 23, n. 1, p. 107-118, 2010.

VERDAM, F. J.; FUENTES, S.; DE JONGE, C.; ZOETENDAL, E. G.; ERBIL, R.; *et al*. Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity. **Obesity (Silver Spring)**, v. 21, n. 12, p. E607-15, 2013.

VUNTA, H.; DAVIS, F.; PALEMPALLI, U. D.; BHAT, D. *et al*. The anti-inflammatory effects of selenium are mediated through 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in macrophages. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p.17964–17973, 2007.

WALKER, J. N. *et al*. Regulation of glucagon secretion by glucose: paracrine, intrinsic or both? **Diabetes, obesity and metabolism**, v. 13, suppl. 1, p. 95-105, 2011.

WANG, R.; LU, Y.; CICHA, MZ.; CHAPLEAU, MW.; Abboud, F.M. Lipopolysaccharide Induced Activation of VRAC (LRRC8) in Nodose Neurons Is Dependent on TLR4 Receptor Mediated ROS Generation. **The FASEB Journal**, 2017.

WANG, Z.; SAHA, S.; HORN, S. V.; THOMAS, E.; TRAINI, C.; SATHE, G.; RAJPAL, D.K.; BROWN, J.R. Gut microbiome differences between metformin- and liraglutide-treated T2DM subjects. **Endocrinology, Diabetes & Metabolism**, v. 1, n. 1, e00009, 2017.

WATSON, J. D. Type 2 diabetes as a redox disease. **Lancet**, v. 383, n. 9919, p. 841–843, 2014.

WHITE, M. F. IRS proteins and the common path to diabetes. **American Journal Physiology-Endocrinology and Metabolism,** v. 283, p. 413–422, 2002.

WILLETT, W.C. Nutritional epidemiology. 2. ed. New York: **Oxford University Press**; 1998.

WOODS, S.C.; LUTZ, T.A.; GEARY, N.; LANGHANS, W. Pancreatic signals controlling food intake; insulin, glucagon and amylin. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1471, p. 1219-35, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION AND FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Vitamin and Mineral Requirement in Human Nutrition. **World Health Organization**, p. 194–216, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a World Health Organization Consultation. **World Health Organization Technical Report Series**, p. 252, 2000.

WU, G. D.; CHEN, J.; HOFFMANN, C.; BITTINGER, K.; CHEN, Y. Y.; KEILBAUGH. S. A.; BEWTRA, M. *et al*. Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. **Science**, v. 334, n. 6052, p. 105-108, 2011.

WU, H. J; WU, E. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. **Gut Microbes**, v. 3, n. 1, p. 4-14, 2012.

WU, N.; YANG, X.; ZHANG, R.; LI, J.; XIAO, X.; HU, Y.; CHEN, Y. *et al*. Dysbiosis signature of fecal microbiota in colorectal cancer patients. **Microbial Ecology**, v. 66, n. 2, p. 462-470, 2013.

ZHANG, X.; SHEN, D.; FANG, Z.; JIE, Z.; QIU, X.; ZHANG, C.; CHEN, Y.; JI, L. Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance. **PloS one**, v. 8, e71108, 2013.

ZHAO, Y.; BARRERE-CAIN, R. H.; YAN, X. Nutritional systems biology of type 2 diabetes. **Genes e Nutrition**, v. 10, p. 31, 2015.

ZHOU, J.; HUANG, K.; LEI, X. G. Selenium and diabetes—evidence from animal studies. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 1548–1556, 2013.

ANEXOS

ANEXO 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1. Informações do Sujeito da Pesquisa

Nome: .....

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

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

Endereço: ..... nº ..... Compl.....

Bairro: ..... Cidade: ..... Estado: .....

CEP: ..... Telefones: .....

2. Informações do Responsável Legal

Nome: .....

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

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

Endereço: ..... nº ..... Compl.....

Bairro: ..... Cidade: ..... Estado: .....

CEP: ..... Telefones: .....

Titulo do Projeto de Pesquisa: ***"Efeitos da castanha-do-brasil (Bertholletia excelsa H.B.K.), sobre o status de selênio, biomarcadores inflamatórios e a composição da microbiota fecal de adultos com diabetes mellitus tipo 2"***

3. Duração da pesquisa: 70 dias
4. Nome do Pesquisador Responsável: Silvia Maria Franciscato Cozzolino

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

Nº do Registro do Conselho Regional: CRN3 / 0621

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

Meu nome é Silvia Maria Franciscato Cozzolino, sou Prof.ª Titular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP gostaria de convidar você para participar do nosso projeto de pesquisa intitulado ***"Efeitos da castanha-do-brasil (Bertholletia excelsa H.B.K.), sobre o status de selênio, biomarcadores inflamatórios e a composição da microbiota fecal de adultos com diabetes mellitus tipo 2)",*** *com a pós-graduanda Luciane Luca de Alencar. Esta pesquisa terá a duração de 70 dias e é considerada de risco mínimo.*

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

A castanha-do-brasil é um alimento muito rico em selênio, os participantes do estudo deverão consumir 1 noz de castanha por dia, fornecida pela pesquisadora, durante dois meses.

A pesquisa contará com 100 voluntários com diabetes *mellitus* tipo 2 com idade entre 30 e 50 anos, tanto do sexo masculino quanto do feminino, atendidos no ambulatório de endocrinologia do Hospital das Clínicas.

Serão realizadas análises, no sangue para avaliar o mineral selênio e também nas fezes para avaliar composição da microbiota. Além disso, serão avaliadas substâncias que indicam o aumento do risco para o desenvolvimento das complicações tardias do diabetes *mellitus.* Para isso, serão necessárias no início do acompanhamento e após o término do consumo das castanhas-do-brasil: uma (1) coleta de sangue (20 mL), estando o (a) participante em jejum de 8 – 10 horas; coletas de fezes, em um pote fornecido pela pesquisadora, o participante deverá guardar este frasco em geladeira até o momento de ser entregue a pesquisadora.

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

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

Além da avaliação nutricional completa que o participante receberá, se houver necessidade receberá orientação quanto à alimentação que deverá ser seguida para a melhora do quadro, sem nenhum custo financeiro. Esta pesquisa trará benefícios para a população com diabetes *mellitus* tipo 2, pois existem evidências de que os minerais exercem um efeito protetor ao organismo, equilibrando e contribuindo para bom funcionamento do mesmo.

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

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

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

CONTATO

Profa Silvia Cozzolino (pesquisadora responsável) ou
Luciane Luca de Alencar (colaboradora - aluna de doutorado)
Telefone: (11) 3091-3625

ANEXO 2. Parecer Consubstanciado – CEP/FCF/USP

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO

PlataForma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Efeitos da castanha-do-brasil (Bertholletia excelsa H.B.K.), sobre o status de selênio, biomarcadores inflamatórios e a composição da microbiota fecal de adultos com diabetes mellitus tipo 2.

Pesquisador: Silvia Maria Franciscato Cozzolino

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 42093515.6.0000.0067

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

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.757.364

Apresentação do Projeto:

O diabetes é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia e apresenta estado inflamatório crônico. O selênio, cuja sua principal fonte é a castanha-do-brasil, além de participar do sistema de defesa antioxidante, possui propriedades anti-inflamatórias, por meio da inibição do NF-kB,reduzindo a expressão de genes que codificam proteínas envolvidas na expressão deste elemento. Cabe destacar que a composição da microbiota pode influenciar tanto no status nutricional quanto no inflamatório. Assim, o objetivo deste trabalho será avaliar a influência da ingestão de castanhado-brasil(Bertholletia excelsa H.B.K.), sobre o estado nutricional relativo ao selênio, biomarcadores inflamatórios, atividade e expressão da

glutationa peroxidase, assim como a composição da microbiota intestinal de adultos com diabetes mellitus tipo 2. Este estudo será de natureza longitudinal, composto de 4 etapas (T0,T1, T2 e T3) e distribuídas pelo período de 120 dias. No início do estudo (T0), os participantes serão submetidos a uma coleta de sangue para análises de concentração de selênio, biomarcadores glicêmicos, lipídicos e inflamatórios, além da atividade e expressões gênica e proteica da GPx1. Realizarão também uma coleta de fezes para caracterização da microbiota fecal. Após 30 dias (T1), será realizada a segunda coleta do material biológico para comparar os parâmetros avaliados. A partir disto, os participantes serão orientados a consumir diariamente a castanha-do-brasil durante 60

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã CEP: 05508-000
UF: SP Município: SÃO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3031-8586 E-mail: cepfcf@usp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.757.364

dias, sendo oferecida pela pesquisadora, a quantidade de noz equivalente a aproximadamente 200 µg do mineral. Após a suplementação (T2), os participantes realizarão nova coleta do material biológico para verificar os efeitos da castanha-do-brasil. Após 30 dias (T3), os participantes serão submetidos a última coleta de material biológico para acompanhamento do período de washout. Além da coleta de material biológico, também será realizada avaliação da composição corporal, que consistirá de aferições de peso, estatura, circunferência da cintura e de bioimpedância. E avaliação da ingestão alimentar, que serão obtidas por meio de recordatório alimentar de 3 dias, destes, um dia será referente ao final de semana (sábado ou domingo). A análise dos dados da ingestão alimentar será feita por meio do software NutWin, da Escola Paulista de Medicina/UNIFESP. A identificação da comunidade bacteriana fecal será feita através do sequenciamento em larga escala de um fragmento do gene do rRNA ribossomal 16S (rDNA 16S), utilizando a plataforma Illumina MiSeq®. Os dados de sequenciamento serão processados e analisados utilizando o software QIIME. A análise de efeitos globais no microbioma será realizada utilizando distâncias UNIFRAC e testes não paramétricos, como a Permanova. A análise dos dados será realizada com auxílio do Centro de Estatística Aplicada – CEA, do Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar os efeitos da ingestão de castanha-do-brasil (Bertholletia excelsa H.B.K.) sobre estado nutricional relativo ao selênio, perfil glicêmico e lipídico, biomarcadores inflamatórios e a composição da microbiota fecal de adultos com diabetes mellitus tipo 2.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Esta pesquisa oferece risco mínimo aos participantes. No momento da coleta de sangue, poderá ocorrer um pequeno desconforto, devido à dor da picada da agulha, podendo surgir uma mancha arroxeada no local, que logo passa.

Benefícios:

Esta pesquisa trará benefícios para a população com diabetes mellitus tipo 2, pois existem evidências de que os minerais exercem um efeito protetor no organismo, equilibrando e contribuindo para bom funcionamento do organismo. Todos os participantes passarão por uma

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã CEP: 05508-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3091-8996 E-mail: cepfcf@usp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.757.364

avaliação nutricional completa, sem nenhum custo financeiro para a família. Será dada uma orientação quanto à alimentação que deverá ser seguida para a melhora do quadro. Além disso, alguns dos exames realizados nesta pesquisa não são realizados rotineiramente pelo sistema de saúde.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa tem bom embasamento científico, sendo um assunto bem estudados nos últimos anos. Os objetivos são claros e bem definidos. Serão utilizados 50 pessoas com idades entre 19 e 50 anos que apresentem quadro de diabetes tipo2.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos necessários de anuência e participação estão presentes, apenas faltando a oficialização das UBS participantes, segundo carta explicativa da pesquisadora.

O TCLE está claro, descrevendo tanto a pesquisa como os procedimentos com linguagem simples. É feito sob forma de convite com as devidas indicações de riscos, benefícios e participação voluntária.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considero o projeto dentro dos padrões éticos necessários para aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Sem considerações adicionais.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_780862_E2.pdf	01/09/2016 14:54:51		Aceito
Outros	Solicitacao_Inclusao_Instituicao_Coparticipante.pdf	31/08/2016 17:41:32	Silvia Maria Franciscato Cozzolino	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_UBS_Doutorado.pdf	31/08/2016 17:39:47	Silvia Maria Franciscato Cozzolino	Aceito
Outros	Declaracao_Instituicao_Co_participan	24/08/2016	Silvia Maria	Aceito

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã CEP: 05508-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3091-8986 E-mail: cepfcf@usp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.757.364

Outros	te.pdf	15:57:28	Franciscato Cozzolino	Aceito
Outros	Declaração de Anuência HC.pdf	23/02/2015 14:55:06		Aceito
Outros	Declaração de Participação - Dr. Simão.pdf	23/02/2015 14:54:57		Aceito
Outros	Declaração de Participação Luciane.PDF	23/02/2015 14:33:17		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDoutoradoLuciane.pdf	23/02/2015 14:21:57		Aceito
Outros	Declaração de Anuencia FC USP.pdf	23/02/2015 13:56:58		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto.PDF	23/02/2015 13:56:10		Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 03 de Outubro de 2016

Assinado por:
Cristina Northfleet de Albuquerque
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8386 **E-mail:** cepfcf@usp.br

ANEXO 3. Questionário de Caracterização da População

Efeitos da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) sobre o *status* de selênio, biomarcadores inflamatórios e a composição da microbiota intestinal de adultos com diabetes *mellitus* tipo 2.

QUESTIONÁRIO

DADOS PESSOAIS

Nome:		ID:
Documento de Identidade (tipo)	Nº:	Sexo: [ ] M [ ] F
Naturalidade:		DN: / /
Endereço:		Nº:
Complemento:	Bairro:	
Cidade:		Estado:
CEP:	Telefones:	
Tempo de diagnóstico DM		

DADOS SÓCIO-ECONÔMICOS

1. Estado Civil:
1.[ ] Solteiro(a) 3.[ ] Separado(a)
2.[ ] Casado(a) 4.[ ] Viúvo(a)

2. Você se considera (etnia):
1.[ ] Branco(a) 4.[ ] Mulato(a)
2.[ ] Negro(a) 5.[ ] Amarelo (de origem oriental)
3.[ ] Pardo(a) 6.[ ] Indígena

3. Grau de Instrução:
1.[ ] Nenhuma escolaridade 5.[ ] Ens. Médio Compl.
2.[ ] Até o Primário 6.[ ] Ens. Médio Incompl.
3.[ ] Ens. Fund. Incompl. 7.[ ] Ens. Superior Compl.
4.[ ] Ens. Fund. Compl. 8.[ ] Ens. Superior Incompl.

4. Profissão: _____

5. Renda Familiar (SM = salário mínimo R$ 788,00):
1.[ ] <1 SM 4.[ ] De 3 a 5 SM
2.[ ] De 1 a 2 SM 5.[ ] De 5 a 10 SM
3.[ ] De 2 a 3 SM 6.[ ] >10 SM

6. Tabagismo: 1.[ ] Nunca fumou 2.[ ] Exfumante Tempo:_____

7. Ingestão de bebida alcóolica: 1.[ ] Não 2.[ ] Sim
Frequência: [ ] Até 1 a 2 vezes/mês [ ] 1 vez/semana [ ] 2 a 3 vezes/semana ou mais

8. Nível de Atividade Física:
1.[ ] Sedentário 3.[ ] Ativo
2.[ ] Pouco ativo 4.[ ] Muito ativo
Qual:_____ Frequência/Duração: _____

Efeitos da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) sobre o *status* de selênio, biomarcadores inflamatórios e a composição da microbiota intestinal de adultos com diabetes *mellitus* tipo 2.

9. Histórico de doenças na família: 1.[ ] Obesidade 5.[ ] Câncer 2.[ ] Diabetes 6.[ ] Insuficiência Renal 3.[ ] HAS 7.[ ] Outro: _____ 4.[ ] DCV
10. Uso de medicamentos: 1.[ ] Não 2.[ ] Sim Quais:_____
_____
_____
11. Uso de antibióticos nos últimos 4 meses: 1.[ ] Não 2.[ ] Sim
12. Uso de suplemento vitamínico-mineral: 1.[ ] Não 2.[ ] Sim
13. Ingestão de prebióticos e/ou probióticos industrializados: 1.[ ] Não 2.[ ] Sim
14. Hábito intestinal: 1.[ ] Normal 2.[ ] Constipação 3.[ ] Diarreia Frequência: _____
15. Intercorrências nos últimos meses: 1.[ ] Não 2.[ ] Sim Quais:_____
16. Tipo de parto: 1.[ ] Normal 2.[ ] Cesária 3.[ ] Não sabe informar
17. Tipo de alimentação infantil: 1.[ ] Aleitamento materno 2.[ ] Fórmulas infantis Duração: _____ 3.[ ] Não sabe informar
18. Se mulher, teve filhos: 1.[ ] Não 2.[ ] Sim Quantos:_____ Quando: _____
19. Possui animal de estimação: 1.[ ] Não 2.[ ] Sim Qual:_____
20. Observações: _____ _____ _____

ANEXO 4. Registro Alimentar

Registro Alimentar

Nome:_____ **ID:**_____

Tempo:_____

Data de Nascimento: _____/_____/_____ **Peso:**_____ **Altura:**_____

( ) Seg ( ) Ter ( ) Qua ( ) Qui ( ) Sex ( ) Sáb ( ) Dom (___/___/_____)

REFEIÇÃO – LOCAL/HORÁRIO	ALIMENTO	MEDIDAS