

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Nutrição Experimental

Efeito do consumo de castanhas-do-brasil (*Bertholettia excelsa*
H.B.K.) sobre os biomarcadores inflamatórios e o estado nutricional
relativo ao selênio de mulheres obesas

VERSÃO ORIGINAL

Graziela Biude Silva

SÃO PAULO

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Área de Nutrição Experimental

Efeito do consumo de castanhas-do-brasil (*Bertholettia excelsa*
H.B.K.) sobre os biomarcadores inflamatórios e o estado nutricional
relativo ao selênio de mulheres obesas

Graziela Biude Silva

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientador:

Prof^a. Tit. Dra. Silvia M. F. Cozzolino

Co-orientador:

Prof. Dr. Marcelo Macedo Rogero

SÃO PAULO

2018

Graziela Biude Silva

**Efeito do consumo de castanhas-do-brasil (*Bertholettia excelsa* H.B.K.)
sobre os biomarcadores inflamatórios e o estado nutricional relativo ao
selênio de mulheres obesas**

Comissão Julgadora

da

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Prof. Tit. Dra. Silvia Maria Franciscato Cozzolino
orientador/presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, maio de 2018.

DEDICATÓRIA

Às pessoas mais importantes da minha vida:

*Meus pais, **Claudia** e **Salvador**, e minha irmã **Isabela** que me apoiaram em todos os momentos da minha vida. Sem vocês não sou nada!*

*Ao meu amado marido **Mauricio Duarte**, por ser minha fortaleza e um ser humano incrível! Obrigada por fazer parte da minha vida! Te Amo!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço muito aos meus queridos e amados pais, **Claudia e Salvador**, que SEMPRE me apoiaram desde a graduação até este momento tão importante da minha vida. Vocês são e sempre serão a minha maior inspiração de pessoas íntegras, honestas, humildes e de família para minha vida. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, me dando o carinho e o amor necessário para que eu pudesse, a cada dia, superar as minhas dificuldades. Meu amor por vocês é infinito! Mais uma vez, obrigada, obrigada!

À minha irmã **Isabela Biude** que também sempre esteve ao meu lado na torcida pela chegada deste momento e que com certeza faz dos meus dias os mais alegres. Que sempre enxerga um lado positivo em qualquer situação. Obrigada minha mana, por existir na minha vida! Te Amo!

Ao meu marido, meu amor, **Mauricio Duarte**, que sempre esteve ao meu lado em todos momentos me apoiando, torcendo e me escutando mesmo não entendendo absolutamente nada sobre o que eu estava falando. Viver ao seu lado torna meus dias mais leves, mais felizes e com certeza me ajudaram muito nesses quatro anos de doutorado. Obrigada meu amor pelas conversas de todos dias, pelos momentos de distração, por me fazer rir e me sentir tão bem depois de um dia em que tudo deu errado...pelo seu abraço, pelo seu carinho! Obrigada por me ajudar a realizar esse sonho! Amo você!

À minha querida orientadora, **Prof. Silvia M.F. Cozzolino** com quem tive a oportunidade e a honra de conviver durante 10 anos...desde a iniciação científica até o doutorado. Foram muitos momentos que ficarão guardados com muito carinho em minha memória e que com certeza sentirei saudade. Obrigada professora, por me dar tantas oportunidades, principalmente de continuar a fazer o que mais gosto, ciência. Agradeço pelas inúmeras conversas, confiança e ensinamentos que você me deu e que me fizeram crescer tanto como pessoa como profissional. Espero poder ser um dia para meus alunos tudo o que você foi para mim. Você sempre terá um lugar muito especial em meu coração! Obrigada por tudo!

Ao querido co-orientador, **Prof. Marcelo Macedo Rogero** que me recebeu de braços abertos como sua aluna e que foi essencial para que este trabalho fosse concluído. Obrigada professor por acreditar no meu trabalho, pelos incentivos em todas

as nossas reuniões, por sempre estar por perto me ajudando a resolver e, solucionando várias questões durante todo o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço por me proporcionar tantos momentos e oportunidades de aprendizado, de conversas científicas que com certeza foram fundamentais para o meu crescimento profissional e pessoal durante todo esse tempo. Tenho uma grande admiração pelo profissional que é! Com certeza será sempre uma inspiração para que eu possa seguir em frente na minha carreira acadêmica. Muito obrigada pela orientação e amizade!

À minha grande amiga e super parceira de trabalho **Bruna Zavarize Reis**. É muito difícil para mim expressar em palavras meus sentimentos de amizade e de agradecimento a você. Nos momentos de alegria, ter você ao meu lado para compartilhá-las tornou estes momentos ainda mais especiais. Mas, também tiveram muitos obstáculos e tristezas em nosso caminho, e que conseguimos superá-los da melhor maneira com apoio uma da outra. Aprendemos muito juntas! Obrigada minha amiga por fazer parte da minha história, da minha trajetória, por me ensinar tanto durante todos esses anos. Com certeza, a nossa convivência diária deixará muita saudade! Mas a amizade, essa, eu sei que é para a vida toda. Enfim, digo com muito orgulho, que nós vencemos...chegamos lá! Você é muito especial para mim!

“Quem tem bons amigos nunca se sente desamparado, pois sabe que quando mais precisar de uma palavra sábia e um coração acolhedor terá um amigo com quem pode contar!”. Essa frase dedico aos meus queridos amigos: **Janaina Donadio, Amanda Romero, Mayara Miranda, Ernesto Vargas-Mendez, José Augusto, Luciana, Marina Nogueira, Bianca Scolaro, Juliana Ortega, Eduardo de Carli**...um presente lindo que a pós-graduação me proporcionou. Obrigada por todos os momentos de diversão, pelas boas conversas na copa, pela ajuda em inúmeros momentos em que precisei de apoio e de uma palavra de incentivo.

Aos colegas do **Laboratório de Nutrição e Minerais**. Aos que já foram e os que ainda estão presentes, obrigada!

Aos **colegas do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental** que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho...seja por uma ajuda nas análises ou, simplesmente, com uma boa conversa nos corredores do departamento.

Agradeço aos **amigos do Laboratório de Genômica Nutricional e Inflamação (GENUIN)** por me receberem e por me proporcionarem bons momentos de discussões científicas. Aprendi muito!

À **Ana Claudia Samsone** pela contribuição na validação e nas análises de citometria de fluxo. Com certeza você foi muito importante nesta etapa! Obrigada de coração!

À **Dra. Cintia Cercato**, que aceitou colaborar com nosso trabalho e nos ajudou com o recrutamento das participantes no ambulatório de Endocrinologia (HCFMUSP).

Ao **Prof. Fernando Barbosa Junior** do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas (FCFRP) pela realização das análises de selênio.

Aos **professores do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental** pelo aprendizado em todos esses anos de pós-graduação.

À **Lourdinha**, por todos os “Bom dia!” e aquele café que fazem nosso dia começar de forma mais alegre!

Ao pessoal da secretaria do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental: Edilson, Mônica, Cléo e Roberta.

Aos meus grandes amigos **Andreza, Bruno Juliano e Mário César** pela amizade sincera de tantos anos e por toda torcida durante todo esse meu percurso na pós-graduação. Obrigada pelas várias palavras de incentivo e por todas as comemorações por menores que elas sejam. Vocês com certeza fazem parte da minha família! Amo vocês meus queridos!

Às participantes da pesquisa que aceitaram contribuir de forma valiosa para este trabalho.

Ao CNPq pela concessão bolsa de doutorado.

À FAPESP pela concessão do auxílio financeiro deste projeto.

“Primeiro , lembrem-se de olhar para as estrelas lá no alto e não para seus pés lá embaixo. Dois: nunca desistam do seu trabalho. O trabalho lhe dá sentido e propósito, e a vida é vazia sem isso. Três: se você for afortunado a ponto de encontrar o amor, lembre-se de que ele está ali e nunca jogue fora.”

Stephen Hawking

RESUMO

SILVA, G.B. Efeito do consumo de castanhas-do-brasil (*Bertholettia excelsa* H.B.K.) sobre os biomarcadores inflamatórios e o estado nutricional relativo ao selênio de mulheres obesas. São Paulo, 2018. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

A inflamação e o estresse oxidativo são processos que ocorrem simultaneamente na obesidade e contribuem para o aumento da síntese de mediadores inflamatórios e de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. O mineral selênio (Se), cuja principal fonte alimentar é a castanha-do-brasil, possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Considerando a importância do processo inflamatório na obesidade e o potencial papel do Se como anti-inflamatório por meio da atuação de selenoproteínas, o estudo da influência deste micronutriente neste contexto é de grande relevância. Desse modo, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do consumo da castanha-do-brasil sobre os biomarcadores inflamatórios e o estado nutricional relativo ao Se de mulheres obesas. No total, foram recrutadas 72 participantes alocadas randomicamente no grupo que consumiu a castanha-do-brasil (BN) ou no grupo controle (CO) e, acompanhadas por um período de 2 meses. O grupo BN consumiu 1 unidade de castanha-do-brasil (~409,5 µg/Se) por dia e o grupo CO não recebeu nenhum tipo de intervenção. Antes e após o período da intervenção, foram realizadas as avaliações antropométrica e do consumo alimentar, e dos parâmetros bioquímicos relacionados ao Se, estresse oxidativo, perfil lipídico e biomarcadores inflamatórios. Completaram o estudo 29 participantes do grupo BN e 26 do grupo CO com idade média de 40,3 (9,0) e 39,4 (9,5) anos ($p=0,714$), respectivamente. No *baseline* do estudo, observou-se que a população estudada não apresentava deficiência de Se. No grupo BN, verificou-se um aumento de todos biomarcadores de Se avaliados. Após 8 semanas de intervenção, um aumento significativo foi observado na expressão gênica de diversos parâmetros pró-inflamatórios no grupo BN (IL-6, TNF- α , TLR2 e TLR4). Apesar de não ter havido mudanças nas concentrações plasmáticas referentes a estes parâmetros, o aumento significativo da expressão gênica pode ser um indicativo de estímulo pró-inflamatório induzido pelo consumo da castanha-do-brasil com altas concentrações de Se.

Palavras-chave: selênio, castanha-do-brasil, obesidade, inflamação.

ABSTRACT

SILVA, G.B. Effect of Brazil nut (*Bertholettia excelsa* H.B.K.) consumption on inflammatory biomarkers and nutritional status of selenium in obese women. São Paulo, 2018. Ph.D. Thesis – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo.

Inflammation and oxidative stress are processes that occur simultaneously in obesity and contribute to an increase in the synthesis of inflammatory mediators and reactive oxygen and nitrogen species. The mineral selenium (Se), whose main food source is the Brazil nut, has antioxidant and anti-inflammatory properties. Considering the importance of the inflammatory process in obesity and the potential role of Se as an anti-inflammatory by means of selenoproteins, the study of the influence of this micronutrient in this context is of great relevance. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of Brazil nut intake on inflammatory biomarkers and nutritional status of Se in obese women. In total, 72 participants randomly assigned to Brazil nut group (BN) or control group (CO) were recruited and followed up for 2 months. The BN group consumed 1 unit of Brazil nut (~ 409.5 µg/Se) per day and the CO group did not received any intervention. On baseline and after two months of follow-up, the evaluation of anthropometry and food consumption, and of the biochemical parameters related to Se, oxidative stress, lipid profile and inflammatory biomarkers were performed. Twenty-nine participants of BN group and twenty-six of the CO group completed the trial, with a mean age of 40.3 (9.0) and 39.4 (9.5) years ($p= 0.714$), respectively. At the baseline of the study, it was observed that this population did not present Se deficiency. In BN group, there was an increase in all Se biomarkers evaluated. After 8 weeks of intervention, a significant increase was observed in gene expression of several pro-inflammatory parameters in BN group (IL-6, TNF- α , TLR2 and TLR4). Although there have been no changes in plasma concentrations related to these parameters, a significant increase in gene expression may be an indicative of a pro-inflammatory stimulus induced by the intake of Brazil nuts with high Se concentrations.

Keywords: selenium, Brazil nut, obesity, inflammation.

SUMÁRIO

1.	REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1.	OBESIDADE E INFLAMAÇÃO.....	17
1.2.	SELÊNIO: ASPECTOS GERAIS, NUTRICIONAIS E SUA RELAÇÃO COM A INFLAMAÇÃO.....	24
1.3.	ESTADO NUTRICIONAL RELATIVO AO SELÊNIO NA OBESIDADE E A INTERVENÇÃO COM A CASTANHA-DO-BRASIL.....	28
2.	HIPÓTESES EXPERIMENTAIS	31
3.	OBJETIVOS	32
3.1.	GERAL.....	32
3.2.	ESPECÍFICOS.....	32
4.	CASUISTICA	33
4.1.	ASPECTOS ÉTICOS.....	33
4.2.	SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES.....	33
4.3.	PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	35
5.	MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1.	CARACTERIZAÇÃO DA CASTANHA-DO-BRASIL (<i>BERTHOLETTIA EXCELSA</i> H.B.K.).....	37
5.1.1.	Análise da composição centesimal e da concentração de Se.....	37
5.2.	AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA.....	38
5.2.1.	Peso.....	38
5.2.2.	Estatura.....	38
5.2.3.	Índice de Massa Corpórea (IMC).....	38
5.2.4.	Circunferência da Cintura (CC).....	38
5.2.5.	Bioimpedância elétrica.....	39
5.3.	AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR.....	39
5.4.	COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO E ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	39
5.4.1.	Sangue.....	39
5.4.2.	Concentração plasmática e eritrocitária de Se.....	40
5.4.3.	Atividade enzimática da GPx1.....	40
5.4.4.	Concentração plasmática da selenoproteína P (SELENOP).....	41
5.4.5.	Perfil lipídico e Glicemia.....	41
5.4.6.	Biomarcadores inflamatórios, Leptina e Insulina.....	41
5.4.7.	Cálculo do Índice de Resistência à Insulina – <i>Homeostasis Model Assessment</i> (HOMA-IR) e da Capacidade Funcional das células β -pancreáticas (HOMA-BETA).....	41
5.4.8.	Avaliação da razão GSH:GSSG.....	42
5.4.9.	Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> - PBMC).....	42

5.4.10.	Expressão Gênica.....	42
5.4.11.	Caracterização fenotípica e avaliação da expressão de proteínas de membrana TLR2 e TLR4 em PBMC.....	44
5.5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
6.1.	COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DA CASTANHA-DO-BRASIL	49
6.2.	CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DO ESTUDO	51
6.3.	EFEITO DA INTERVENÇÃO COM A CASTANHA-DO-BRASIL	55
6.3.1.	Avaliação antropométrica.....	55
6.3.2.	Avaliação do estado nutricional relativo ao Se.....	56
6.3.3.	Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo.....	62
6.3.4.	Avaliação dos parâmetros bioquímicos.....	65
6.3.5.	Avaliação do biomarcadores inflamatórios.....	69
7.	CONCLUSÃO	82
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
9.	ANEXOS	96

LISTA DE TABELA

- Tabela 1.** Descrição dos ensaios *Taqman*® utilizados para avaliação da expressão gênica. _____ 43
- Tabela 2.** Descrição dos anticorpos, fluorocromos e concentração dos mesmos utilizados na análise de citometria de fluxo. _____ 44
- Tabela 3.** Análise da composição centesimal e da concentração de selênio das castanhas-do-brasil utilizadas no estudo. _____ 49
- Tabela 4.** Concentração de selênio de diferentes estudos nacionais realizados com castanhas-do-brasil provenientes da região Amazônica. _____ 51
- Tabela 5.** Perfil das participantes dos grupos *Brazil nut* (BN) e Controle (CO) segundo os aspectos socioeconômicos e hábitos de vida. _____ 52
- Tabela 6.** Avaliação antropométrica dos grupos *Brazil nut* (BN) e Controle (CO) no *baseline* (T0) de estudo. _____ 53
- Tabela 7.** Determinação da concentração de selênio no plasma e no eritrócito dos grupos *Brazil nut* (BN) e Controle (CO) antes (T0) e após (T1) o período da intervenção. _____ 57
- Tabela 8.** Concentração plasmática da glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG) e determinação da razão GSH:GSSG dos grupos *Brazil nut* (BN) e Controle (CO). _____ 63
- Tabela 9.** Variação das concentrações séricas de glicemia, insulina, colesterol total e frações, AST, ALT, Gama-GT e albumina das participantes dos grupos *Brazil nut* e Controle(CO) antes (T1) e após (T1) a intervenção. _____ 66
- Tabela 10.** Avaliação das concentrações plasmáticas dos biomarcadores inflamatórios das participantes dos grupos *Brazil nut* (BN) e Controle(CO) antes (T1) e após (T1) o período da intervenção. _____ 70
- Tabela 11.** Correlação de *Spearman* entre a variação (Δ) dos biomarcadores de avaliação do *status* de selênio e o *fold change* do mRNA dos genes TNF- α , IL1- β , IL-6, IL-10, TLR2 e TLR4. _____ 75

Tabela 12. Expressão de TLR2 e TLR4 na membrana plasmática de monócitos do sangue periférico de mulheres obesas do grupo *Brazil nut* (BN) antes (T0) e após (T1) a intervenção. _____79

LISTA DE FIGURA

- Figura 1.** Porcentagem de adultos com excesso de peso (IMC $\geq 25\text{kg/m}^2$) nos estados brasileiros. _____ 18
- Figura 2.** Porcentagem de adultos com obesidade (IMC $\geq 30\text{kg/m}^2$) nos estados brasileiros. _____ 19
- Figura 3.** Selenoproteínas caracterizadas em mamíferos e suas principais funções. _____ 25
- Figura 4.** Mecanismo proposto para o papel do selênio na resposta inflamatória. _____ 28
- Figura 5.** Imagens da árvore da castanha-do-brasil, seu fruto e semente. _30
- Figura 6.** Fluxograma de seleção das participantes do estudo. _____ 35
- Figura 7.** Protocolo experimental do estudo. _____ 36
- Figura 8.** Gráficos *dot plot* com a seleção dos *gates* de uma amostra aleatória nos tempos T0 e T1 do grupo *Brazil nut*. _____ 45
- Figura 9.** Gráficos *dot plot* CD14+/TLR2+ e CD16+/TLR2+ de uma amostra aleatória nos tempos T0 e T1 do grupo *Brazil nut*. _____ 46
- Figura 10.** Gráficos *dot plot* CD14+/TLR4+ e CD16+/TLR4+ de uma amostra aleatória nos tempos T0 e T1 do grupo *Brazil nut*. _____ 47
- Figura 11.** Distribuição percentual da presença de alteração na glicemia e hipertensão nos grupos de estudo. _____ 53
- Figura 12.** Proporção de mulheres de acordo com a adequação dietética segundo as recomendações propostas pelo IOM (2006) e SBC (2013). _____ 54
- Figura 13.** Gráfico da distribuição das participantes de acordo com as concentrações plasmática (A) e eritrocitária (B) de Se, os grupos de estudo, os tempos de avaliação (T0 e T1) e os valores de referência adotados. _____ 58
- Figura 14.** Gráficos da avaliação dos índices HOMA-IR e HOMA-BETA antes (T0) e após (T1) a intervenção nos grupos *Brazil nut* (BN) e Controle (CO).__67

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Avaliação antropométrica dos grupos *Brazil nut* (BN) e Controle (CO) antes (T0) e após 2 meses de intervenção (T1)._____56
- Gráfico 2.** Concentração plasmática de SELENOP nos grupos *Brazil nut* (BN) e Controle (CO) antes (T0) e após (T1) a intervenção. _____60
- Gráfico 3.** Atividade eritrocitária da GPX1 nos grupos *Brazil nut* (BN) e Controle (CO) antes (T0) e após (T1) a intervenção. _____63
- Gráfico 4.** *Fold change* dos genes (comparação do pós-intervenção com o *baseline*) da GPx1, SELENOP, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, TLR2 e TLR4. ____72
- Gráfico 5.** Concentração plasmática de LPS das participantes do estudo no *baseline* e após 8 semanas de acordo com o tercil de selênio no plasma. ____77

1. REVISÃO DA LITERATURA

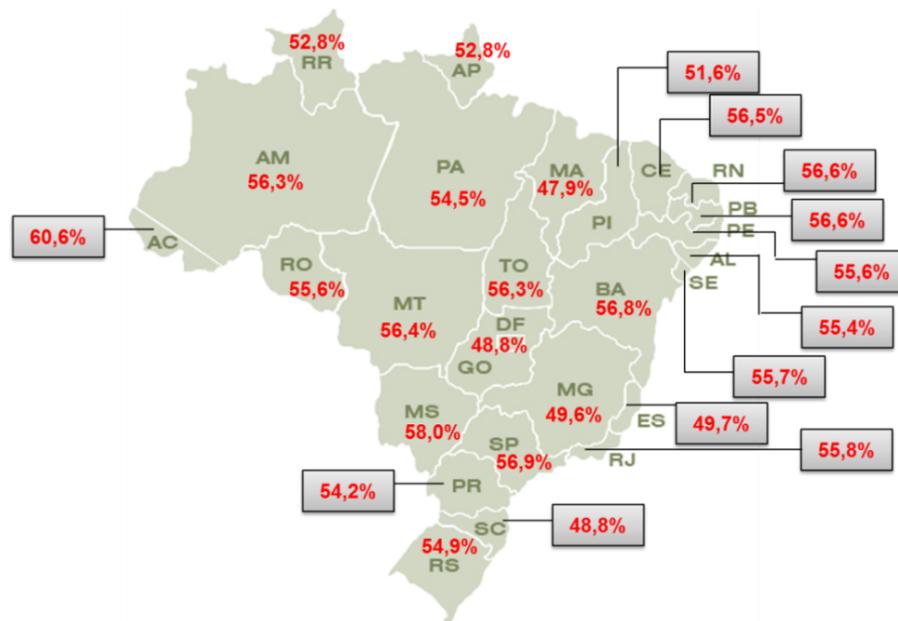
1.1. Obesidade e inflamação

A obesidade é uma doença crônica e de origem multifatorial, que pode ser definida como o aumento do peso corporal que resulta em um acúmulo de gordura excessiva decorrente de um desequilíbrio entre a ingestão e o gasto energético. Esta doença é considerada um problema de saúde pública mundial e está associada a várias doenças crônicas não transmissíveis como o diabetes mellitus tipo 2, a dislipidemia, a hipertensão arterial sistêmica (HAS), as doenças cardiovasculares (DCV), o câncer e as doenças hepáticas (BASTARD *et al.*, 2006; NGUYEN, EL-SERAG, 2010; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2011). O índice de massa corpórea (IMC) é o parâmetro mais utilizado para definição da obesidade, sendo o ponto de corte $\geq 30\text{kg/m}^2$ (WHO, 2018).

O peso corporal é determinado por uma variedade de fatores que atuam por meio de mediadores fisiológicos relacionados à ingestão e ao gasto energético e que podem contribuir para o desenvolvimento da obesidade. No caso dos fatores genéticos, por exemplo, vários polimorfismos de nucleotídeo único estão associados a complicações metabólicas, como aqueles presentes em genes envolvidos na termogênese e na regulação do apetite. As mudanças no estilo de vida das populações como diminuição da prática de atividade física e o consumo de alimentos com alto teor de açúcares e gorduras e lipídios, pobre em frutas e hortaliças, evidenciam como os fatores ambientais podem contribuir para o aumento dos casos de obesidade. Além disso, estudos que buscam explicar a etiologia da obesidade apontam que a má nutrição da mãe e o crescimento inadequado do feto durante o período intrauterino podem contribuir para o aumento dos fatores de risco relacionados ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, afetando a programação da estrutura corporal, da fisiologia e do metabolismo (KOPELMAN, 2000; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2011).

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2016, cerca de 1,9 bilhão de adultos apresentavam excesso de peso, dentre os quais, pelo menos 600 milhões eram obesos. Segundo estimativas da OMS, em 2025 estes números devem alcançar o valor de 2,3 bilhões de adultos com excesso de peso e 700 milhões com obesidade (WHO, 2018). No Brasil, dados do sistema de vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito

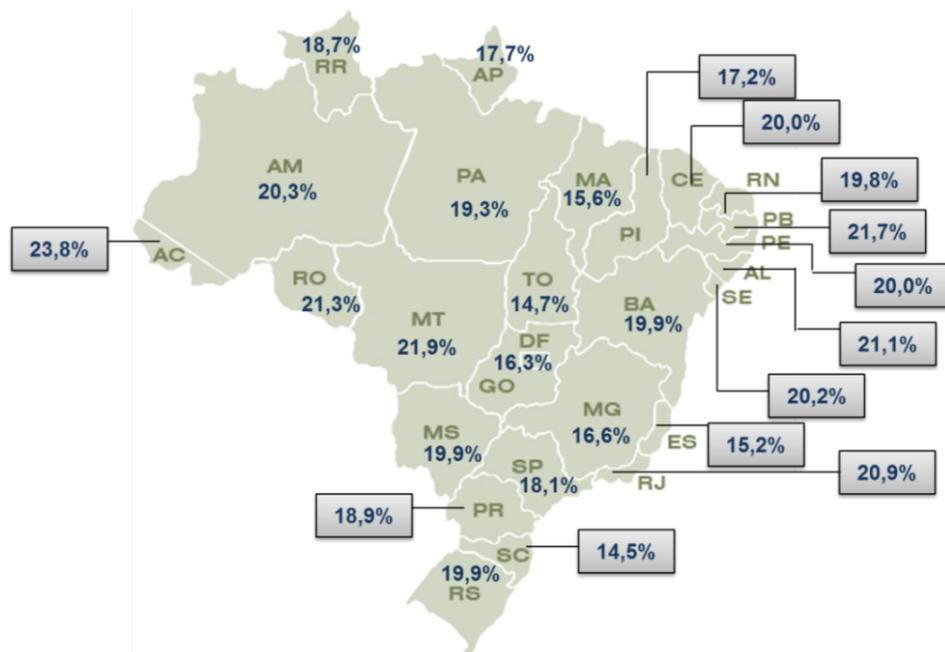
telefônico de 2016 (VIGITEL BRASIL 2016) indicam que houve um aumento de aproximadamente 23,3% de excesso de peso na população, e de 60% nos casos de obesidade. A prevalência destes índices por estado brasileiro está representada nas **figuras 1 e 2**, respectivamente. Como consequência, também observou-se que o número de indivíduos diagnosticados com diabetes melitos (61,8%) e hipertensão arterial (14,2%) aumentou e que foram maiores entre as mulheres (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).



Fonte: VIGITEL, 2016.

Legenda: AC: Acre; AL: Alagoas; AM: Amazonas; AP: Amapá; BA: Bahia; CE: Ceará; DF: Distrito Federal; ES: Espírito Santo; GO: Goiás; MA: Maranhão; MG: Minas Gerais; MS: Mato Grosso do Sul; MT: Mato Grosso; PA: Pará; PB: Paraíba; PI: Piauí; PE: Pernambuco; PR: Paraná; RJ: Rio de Janeiro; RN: Rio Grande do Norte; RO: Rondônia; RR: Roraima; RS: Rio Grande do Sul; SC: Santa Catarina; SE: Sergipe; SP: São Paulo; TO: Tocantins.

Figura 1. Porcentagem de adultos com excesso de peso ($IMC \geq 25 \text{kg/m}^2$) nos estados brasileiros.



Fonte: VIGITEL, 2016.

Legenda: AC: Acre; AL: Alagoas; AM: Amazonas; AP: Amapá; BA: Bahia; CE: Ceará; DF: Distrito Federal; ES: Espírito Santo; GO: Goiás; MA: Maranhão; MG: Minas Gerais; MS: Mato Grosso do Sul; MT: Mato Grosso; PA: Pará; PB: Paraíba; PI: Piauí; PE: Pernambuco; PR: Paraná; RJ: Rio de Janeiro; RN: Rio Grande do Norte; RO: Rondônia; RR: Roraima; RS: Rio Grande do Sul; SC: Santa Catarina; SE: Sergipe; SP: São Paulo; TO: Tocantins.

Figura 2. Porcentagem de adultos com obesidade ($IMC \geq 30 \text{kg/m}^2$) nos estados brasileiros.

A relação entre a obesidade e a inflamação, já estabelecida na literatura atual, foi proposta pela primeira vez por Hotamisligil e colaboradores em 1993, pela observação de que o tecido adiposo branco também é capaz de secretar uma citocina com papel pró-inflamatório, o fator de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$). Após a identificação e caracterização da leptina em 1994, o tecido adiposo foi considerado um órgão endócrino, que além de exercer a função de armazenamento de reservas energéticas — na forma de triacilgliceróis —, produz e/ou secreta diversos hormônios e moléculas de sinalização (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1993; GALIC *et al.*, 2010; CALDER *et al.*, 2011).

A resposta inflamatória é um componente importante da resposta imune que atua na proteção contra um determinado tipo de agressão por meio de mediadores que tornam-se ativos formando um complexo regulatório. Esse processo pode ser agudo, desencadeado por infecções ou lesão tecidual, ou crônico, observado em doenças autoimunes ou causado por estímulos exógenos que podem levar a um dano tecidual. No entanto, no caso da obesidade, o processo inflamatório não

envolve os sinais e sintomas clássicos da inflamação (dor, rubor, calor, edema e perda da função) e caracteriza-se por uma reação crônica, sistêmica e de baixa intensidade denominada metainflamação ou inflamação metabólica. O excesso de determinados nutrientes e metabólitos pode ativar vias de sinalização e moléculas relacionadas à inflamação clássica e então desencadear o processo de metainflamação (HOTAMISLIGIL, 2006; MASKREY *et al.*, 2011; ROGERO, CALDER, 2018).

A inflamação crônica e de baixo grau presente na obesidade, caracterizada por alterações na produção de adipocinas e aumento de biomarcadores inflamatórios, está associada a vários fatores relacionados ao tecido adiposo branco. Entre estes fatores estão a infiltração de macrófagos, ativação de células endoteliais, a presença de adipócitos hiperplásicos e hipertróficos e estresse oxidativo (NEELS, OLEFSKY, 2006; ELKS, FRANCIS, 2010; GALIC *et al.*, 2010; MAURY, BRICHARD, 2010).

O tecido adiposo produz uma variedade de citocinas com ação pró-inflamatória denominadas adipocinas, como a proteína quimiotática para monócitos (MCP)-1, a IL-1 β , o TNF- α e a IL-6. Nesse sentido, indivíduos obesos apresentam um aumento da síntese de biomarcadores pró-inflamatórios como a proteína C reativa (PCR), o MCP-1, o inibidor-1 do ativador do plasminogênio (PAI)-1, a molécula de adesão intercelular solúvel (sICAM)-1, a IL-1 β , o TNF- α , a IL-6 e a leptina. Por outro lado, as adipocinas com ação anti-inflamatória, como a adiponectina e a IL-10, encontram-se em concentrações reduzidas nestes indivíduos (SHAH *et al.*, 2008; BASTOS *et al.*, 2009). Os adipócitos são os responsáveis por expressar e secretar essa variedade de adipocinas que podem atuar tanto em nível local (autócrino/parácrino), como em nível sistêmico (endócrino). A partir dessas funções, os adipócitos podem influenciar a atividade metabólica de outros tecidos como o cérebro, o hipotálamo, o fígado, o músculo e as células β pancreáticas (GOOSSENS, 2008; GELONEZE *et al.*, 2015).

Na obesidade observa-se um aumento de macrófagos no tecido adiposo branco, principalmente no tecido adiposo visceral. Este processo ocorre em consequência a vários fatores como o aumento da síntese de adipocinas e citocinas, da hipertrofia dos adipócitos, da hipóxia no tecido adiposo e do aumento da concentração sanguínea de lipopolissacarídeos (LPS), sendo este último

responsável pelo quadro de endotoxemia metabólica (BASTOS *et al.*, 2009). Este processo de infiltração dos macrófagos tem origem a partir da migração de monócitos do sangue periférico para o tecido adiposo visceral, que, posteriormente, irão se diferenciar em macrófagos. A MCP-1 é a citocina responsável por mediar este processo, uma vez que sua expressão está altamente relacionada com a quantidade de macrófagos residentes. Além disso, a MCP-1 correlaciona-se positivamente com a adiposidade. A expressão gênica e secreção da MCP-1 são estimuladas pelo TNF- α , IL-6 e hormônios de crescimento em pré-adipócitos, e, pode ser influenciada por alterações na secreção de adipocinas (BASTOS *et al.*, 2009). Os macrófagos ativos podem ser classificados em M1 e M2. Os macrófagos M1 atuam na produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , as quais podem bloquear a ação da insulina nos adipócitos e levar ao desenvolvimento de um quadro de resistência à ação da insulina. Por outro lado, os macrófagos M2 secretam citocinas com ação anti-inflamatórias, como a IL-10 que atenua a intensidade da resposta inflamatória (GOOSSENS, 2008; ELKS, FRANCIS, 2010; BONDIA-PONS *et al.*, 2012; QUINTANILHA *et al.*, 2017). Macrófagos e produtos secretados por adipócitos (adipocinas), podem ainda ativar células endoteliais, as quais resultam na produção de uma variedade de moléculas de adesão, quimiocinas e citocinas, que por sua vez, irão direcionar leucócitos para tecidos subjacentes e estimulá-los a tornarem-se totalmente ativos (GOOSSENS, 2008; ELKS, FRANCIS, 2010; MAURY, BRICHARD, 2010).

A indução da resposta inflamatória oriunda da infiltração de macrófagos também está relacionada ao desenvolvimento da resistência à ação da insulina. Um dos mecanismos para que este fato ocorra é a fosforilação do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1), induzida por TNF- α ou ácidos graxos não esterificados, em resíduos de serina, cujo fato interfere na capacidade desta proteína atuar na sinalização da ação da insulina (QUINTANILHA *et al.*, 2017).

Neste contexto, existem duas importantes vias de sinalização da inflamação envolvidas nestes processos: a via do fator nuclear *kappa* B (NF- κ B) e da c-jun-N-terminal quinase (JNK). A via do NF- κ B pode ser ativada por meio da ligação de um ligante no receptor de superfície celular como o TNF-R (receptor para o TNF α) e o do tipo *Toll* (receptor para TLR4). Estes receptores, por sua vez, podem ser ativados tanto por ácidos graxos saturados como por LPS. Após estes estímulos, a

IKK- β é ativada e promove a fosforilação do inibidor do κ B (IKB)- α , o que favorece a sua poliubiquitinação e subsequente degradação pelo proteossoma 26S, localizado no citosol. Após esta etapa, o NF- κ B é liberado e translocado para o núcleo da célula, o que promove a ativação de genes que codificam proteínas envolvidas nas respostas imune e inflamatória. Já a via da JNK pode ser ativada por ácidos graxos, citocinas e espécies reativas de oxigênio (ERO). Esta via de sinalização promove a ativação do fator de transcrição designado ativador da proteína 1 (AP-1), que está relacionado com a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias e com a via de sinalização da insulina (VALLABHAPURAPU, KARIN, 2009; PAL *et al.*, 2016; ROGERO, CALDER, 2018).

A obesidade induz um quadro de estresse oxidativo sistêmico ao aumentar a quantidade de ERO nos adipócitos. O estresse oxidativo ocorre mediante um desequilíbrio entre a produção de ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN) e os mecanismos fisiológicos de defesa antioxidante. Em indivíduos obesos, os fatores que contribuem para o aumento deste processo são: a hiperglicemia, a hiperleptinemia, a concentração tecidual elevada de lipídios, a inflamação crônica e as defesas antioxidantes inadequadas (VINCENT, TAYLOR, 2006; PINTON, 2013).

Em condições de hiperglicemia, produtos finais de glicosilação avançada (AGE) são formados. Estes produtos se ligam a receptores específicos na superfície das células produzindo ERO. Além disso, os AGE e a proteína quinase C estimulam a produção de ERO/ERN por meio da ativação de NADPH oxidases e do NF- κ B. As enzimas NADPH oxidases irão catalisar a redução mono-eletrônica do oxigênio externo utilizando o NADPH como um doador de elétron interno, gerando assim o $O_2^{\cdot-}$. Já o NF- κ B é responsável por favorecer o processo de transcrição de moléculas de adesão, de citocinas pró-inflamatórias, das iNOS e de miRNA envolvidos na adipogênese, na inflamação e no estresse oxidativo (VINCENT, TAYLOR, 2006; SAVINI *et al.*, 2013).

A leptina é o hormônio que atua no controle da ingestão alimentar e do gasto energético no sistema nervoso central. Em indivíduos obesos, a hiperleptinemia aumenta a resposta inflamatória por meio de um mecanismo ainda pouco conhecido. Sugere-se que a leptina pode desencadear a produção de ERO e aumentar a quimiotaxia, a ativação de neutrófilos e a síntese de citocinas pró-

inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-12 (GREENBERG, OBIN, 2006; TILG, MOSCHEN, 2006; SHAH *et al.*, 2008; GALIC *et al.*, 2010).

O excesso de triacilgliceróis intracelulares observados em indivíduos obesos também favorece a produção de radicais livres por meio do aumento da produção de $O_2^{\bullet-}$ nas mitocôndrias. Os lipídeos podem atuar como substrato para reações de oxidação, podendo estimular a formação de radicais e aumentar o estoque de subprodutos oxidativos (VINCENT, TAYLOR, 2006).

O estresse oxidativo e a inflamação são processos que se encontram interligados na obesidade, embora a sequência temporal destes eventos ainda não tenha sido estabelecida. A presença de mediadores ativos como moléculas quimiotáticas, citocinas e adipocinas podem aumentar o estado inflamatório nestes indivíduos e resultar em maior produção de ERO. Ao estimular a infiltração de macrófagos e a síntese de citocinas pró-inflamatórias, o tecido adiposo aumenta a respiração celular e a produção de ERO como o $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} e o NO. Outra fonte importante de ERO neste caso é a NADPH oxidase (Nox), que é expressa tanto em fagócitos como em células endoteliais. Acredita-se que a Nox é capaz de aumentar a expressão do receptor designado *Toll-like receptor 4* (TLR4), cuja via associada a este receptor culmina na ativação do fator de transcrição NF- κ B. Indivíduos obesos apresentam uma maior contagem de leucócitos no sangue, com aumento de monócitos e uma tendência à elevação de neutrófilos. Estas células também são capazes de produzir radicais $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , $ONOO^{\bullet-}$, aumentando ainda mais o estresse oxidativo sistêmico na obesidade. Considerando o mecanismo de inflamação de baixo grau que ocorre na obesidade e as possíveis fontes de radicais livres decorrentes deste processo, é possível estabelecer um ciclo vicioso entre o início do recrutamento de macrófagos pelo tecido adiposo e a produção de citocinas pró-inflamatórias e ERO por estes macrófagos, que resultarão em dano oxidativo e desencadeará doenças como a aterosclerose (VINCENT, TAYLOR, 2006; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2011; ALFADDA, SALLAM, 2012).

As alterações no sistema de defesa antioxidante de indivíduos obesos podem ser atribuídas, além de outros fatores, à diminuição da ingestão de compostos antioxidantes como vitaminas e minerais, resultando na redução das

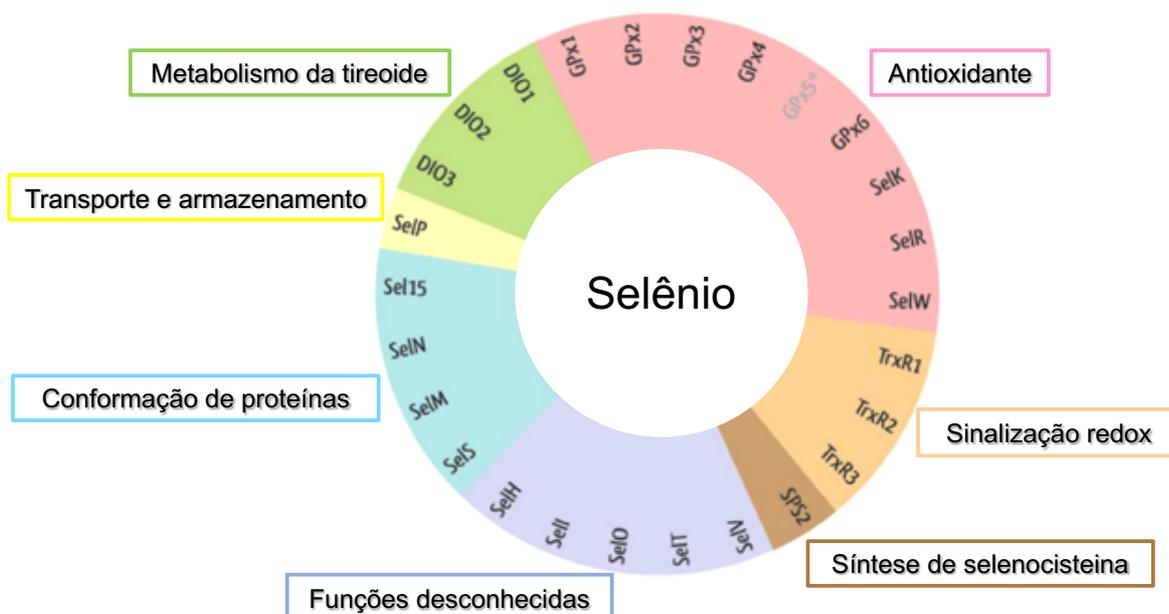
suas concentrações sanguíneas e na alteração de enzimas antioxidantes (VINCENT, TAYLOR, 2006; MARSEGLIA *et al.*, 2014).

1.2. Selênio: aspectos gerais, nutricionais e sua relação com a inflamação

O selênio (Se) é um elemento-traço que apresenta funções biológicas de grande importância para a saúde humana. A essencialidade do mineral para os seres humanos foi provada em 1979 quando o quadro de distrofia muscular em um paciente mantido em nutrição parenteral por um longo período foi revertido após a suplementação com Se. Além disso, a descoberta da doença de Keshan em uma área da China com solos pobres em Se, também contribuiu para estabelecer seu importante papel na saúde humana (BROWN, ARTHUR, 2001; COMINETTI, 2013).

O Se encontra-se biologicamente ativo na forma de um aminoácido denominado selenocisteína. Desse modo, proteínas que apresentam quantidades expressivas de Se são denominadas de selenoproteínas e estas são responsáveis por exercer as principais funções biológicas relacionadas a este micronutriente no organismo humano (Cominetti, 2013; Roman *et al.*, 2014). A incorporação da selenocisteína na sequência de aminoácidos das selenoproteínas ocorre mediante um mecanismo complexo que tem início durante a tradução com a codificação da proteína no códon UGA na região codificadora do mRNA. No entanto, para a incorporação da Sec, uma recodificação no *stop* códon UGA é feita por meio de uma estrutura *loop* específica denominada sequência de inserção de Se (SECIS) na região 3' não traduzida do mRNA (Cominetti, 2013; Labunskyy *et al.*, 2014). Nesse sentido, a síntese e a expressão de selenoproteínas podem ser influenciadas pela ingestão dietética de Se por meio de modificações na leitura do código genético (DUNTAS, BENVENGA, 2015).

Em mamíferos, 25 selenoproteínas já foram caracterizadas, dentre as quais estão as glutatona peroxidase (GPx), as tioredoxinas redutase (TR), as iodotironinas deiodinase (IDI), a selenofosfato sintetase 2 (SPS2), as selenoproteínas P, S, K, W, entre outras que ainda possuem função desconhecida (**Figura 3**) (PAPP, L. V. *et al.*, 2007; HESKETH, 2008; HUANG *et al.*, 2012).



Fonte: adaptado de (BENSTOEM *et al.*, 2015)

Figura 3. Selenoproteínas caracterizadas em mamíferos e suas principais funções.

Entre as principais funções deste micronutriente estão a capacidade antioxidante, o aumento da resistência do sistema imunológico, o papel na fertilidade e no sistema de reprodução, a participação na conversão do T4 (tiroxina) em T3 (tri-iodotironina), a proteção contra a ação nociva de metais pesados e xenobióticos, a redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis, a ação neuroprotetora e estabilidade genômica (PAPP, *et al.*, 2007; ROMAN *et al.*, 2014).

Ao constatar sua importância biológica, inúmeros estudos vêm buscando monitorar a ingestão de Se em populações de diferentes países. As variações de ingestão de Se encontradas em países como Venezuela, Brasil, Estados Unidos e na Europa podem ser atribuídas aos diferentes teores deste mineral no solo que, por sua vez, irão influenciar as concentrações nos alimentos provenientes destas regiões (RAYMAN, 2008; FAIRWEATHER-TAIT *et al.*, 2011). No Brasil, as concentrações de Se no solo podem variar inclusive entre os estados, sendo as menores concentrações observadas nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás, enquanto que as mais elevadas foram encontradas no Ceará, Pará e Amazonas (SHALTOUT *et al.*, 2011). Nos alimentos o Se está presente em diferentes formas químicas e este é um fator essencial a ser considerado em termos de biodisponibilidade. De modo geral, a absorção de compostos orgânicos de Se

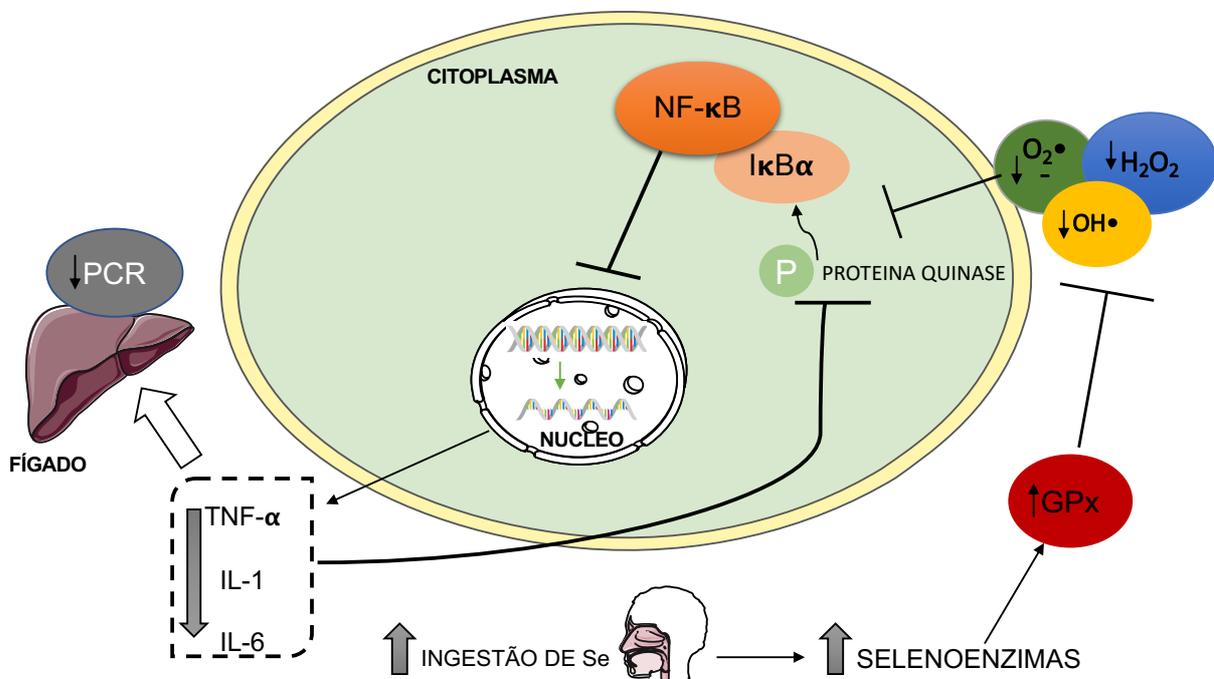
(selenometionina e selenocisteína) pelo nosso organismo é melhor quando comparado com o Se na forma de sais inorgânicos (selenito e selenato) (FAIRWEATHER-TAIT *et al.*, 2011).

Os valores de recomendação de ingestão diária para Se, abrangendo populações de diferentes países foi baseada nas necessidades para atingir a atividade máxima da GPx no plasma ou eritrócitos. Desse modo, tanto os valores de necessidade média estimada (*estimated average requirement* - EAR) como os de ingestão dietética recomendada (*recommended dietary allowance* - RDA) para adultos foram estabelecidas a partir das concentrações de glutathiona peroxidase otimizadas com base em dois estudos de intervenção. Após os cálculos, os valores de EAR e RDA para homens e mulheres (>18 anos) foram de 45µg/dia e 55µg/dia, respectivamente. A ingestão de altas concentrações de Se, tanto na forma orgânica como inorgânica do mineral, pode ser tóxica para o organismo humano. Os sinais clínicos observados nesta condição incluem desde queda de cabelo e unhas frágeis, até alterações gastrointestinais, erupções cutâneas, fadiga, odor de alho na respiração, irritabilidade e anormalidades no sistema nervoso. O valor estabelecido como limite máximo tolerável de ingestão (*tolerable upper intake level* - UL) para adultos é de 400µg/dia e foi baseado nos sinais comumente observados no quadro de selenose (redução de brilho e perda de unhas e cabelos) (IOM, 2006).

A avaliação do estado nutricional dos indivíduos relativos a este micronutriente tem por objetivo determinar se há uma deficiência nutricional, ou ainda, monitorar os riscos de efeitos adversos resultantes da alta ingestão. Além do consumo alimentar, outros biomarcadores são utilizados para esta avaliação, como a determinação das concentrações de Se no sangue (sangue total, soro, plasma ou eritrócito), na urina, nas unhas e no cabelo. A avaliação das concentrações plasmáticas reflete um estado nutricional a curto prazo, podendo detectar um quadro de deficiência de Se. A determinação da selenoproteína P (SELENOP) representa uma resposta ainda mais específica neste caso, pois esta selenoproteína abrange cerca de 40 a 60% do Se no plasma. Além disso, é a principal carreadora do Se para os tecidos periféricos. Já a determinação de Se nos eritrócitos, cabelos e unhas representa uma avaliação de longo prazo e os dois últimos, mais especificamente, são utilizados para avaliações de possíveis riscos de

toxicidade (FAIRWEATHER-TAIT *et al.*, 2011; COMBS, 2015; PIECZYŃSKA, GRAJETA, 2015).

Como mencionado anteriormente, o Se desempenha um papel importante no sistema imune. No entanto, no que diz respeito à resposta inflamatória, seu papel ainda é pouco explorado, mas alguns mecanismos já vêm sendo propostos para elucidar essa questão. Há evidências de que o papel no Se na resposta inflamatória esteja associado aos seus efeitos nas células imunes e, principalmente, nas vias de transdução de sinais de macrófagos. No entanto, grande parte desses resultados são provenientes de estudos *in vitro* (DUNTAS, 2009). Estudos realizados com cultura de células estimuladas com LPS mostram que a suplementação com Se, na forma de selenito de sódio, foi capaz de reduzir a expressão gênica de TNF- α e da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) por meio da modulação das vias da MAP quinase e do NF- κ B. Este processo ocorre de maneira dose-dependente (ZAMAMIRI-DAVIS *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2014). Outro aspecto relevante neste contexto é a do estresse oxidativo. Macrófagos e neutrófilos ativos produzem ERO que, em concentrações adequadas, são importantes para a atividade microbicida e para a sinalização intracelular adequada. Algumas selenoproteínas são responsáveis por regular a produção de ERO e do estado redox em células imunes. Nesse sentido, tanto a deficiência quanto a superexpressão dessas selenoproteínas podem desregular as funções dessas células podendo provocar a morte das mesmas ou ainda prejudicar o mecanismo oxidativo necessário às funções fagocíticas (HOFFMANN, 2007). Um dos principais mecanismos de ação *in vivo* está relacionado à via de ativação do NF- κ B. O aumento de ERO pode contribuir para a ativação da via do NF- κ B e desencadear o aumento da resposta inflamatória. Evidências mostraram que o aumento da expressão da GPx pode reduzir os níveis de ERO por meio da inibição da fosforilação da I κ B- α impedindo a translocação do NF- κ B para o núcleo (**Figura 4**). Além disso, observou-se aumento da meia vida da I κ B, preservando assim a sua degradação (KRETZ-REMY, ARRIGO, 2001; DUNTAS, 2009).



Adaptado de DUNTAS, 2009

Figura 4. Mecanismo proposto para o papel do selênio na resposta inflamatória.

Alguns estudos sugerem que o papel antioxidante da SELENOP no tecido adiposo possa estar relacionado com mecanismos celulares do estresse oxidativo ligados à inflamação e a resistência à insulina. Um estudo realizado em animais mostrou que a expressão gênica da SELENOP1 estava reduzida tanto em ratos obesos *ob/ob* como nos que foram submetidos a uma ração rica em lipídios. Este resultado também foi observado em células de adipócitos primários isoladas de ratos obesos Zucker. Além disso, observou-se que o silenciamento do gene da SELENOP ocasionou em redução da atividade da GPx e na regulação positiva de proteínas com ação pró-inflamatórias como MCP-1 e IL-6 em pré-adipócitos. Os resultados deste trabalho mostraram que a SELENOP exerce um papel importante na diferenciação de adipócitos por meio da modulação do estresse oxidativo e da resposta inflamatória (ZHANG, CHEN, 2011).

1.3. Estado nutricional relativo ao selênio na obesidade e a intervenção com a castanha-do-brasil

A deficiência de micronutrientes em indivíduos obesos é observada em diversos países e pode ter implicações metabólicas importantes contribuindo para o aumento do risco de comorbidades. Evidências mostraram que essas deficiências podem influenciar, por exemplo, o metabolismo da leptina e da insulina. A baixa ingestão alimentar para redução do peso corporal e as alterações fisiológicas

decorrentes da fisiopatologia da obesidade influenciam de forma direta o *status* corporal de vários micronutrientes (ASTRUP, BUGEL, 2010).

O papel do Se nas doenças crônicas está relacionado às funções das selenoproteínas que, como comentado anteriormente, atuam nos sistemas antioxidante e imune. Além disso, evidências também mostram a influência deste micronutriente em vias metabólicas associadas a algumas condições fisiológicas (ROMAN *et al.*, 2014).

No entanto, os estudos que avaliaram o papel do Se na fisiopatologia da obesidade e o estado nutricional relativo a este micronutriente nestes indivíduos não estão completamente esclarecidos e são escassos na literatura. Alguns estudos apontam que os obesos apresentam deficiência de Se concomitante a um elevado grau de estresse oxidativo (ALASFAR *et al.*, 2011; COMINETTI *et al.*, 2012). No entanto, outras evidências verificaram concentrações sanguíneas adequadas deste mineral, indicando um estado nutricional adequado (SANCHEZ *et al.*, 2010; YERLIKAYA *et al.*, 2013)

Pesquisas brasileiras demonstraram que indivíduos obesos apresentam deficiência em Se e que uma intervenção nutricional por meio de um alimento, a castanha-do-brasil, pode ser uma forma de contribuir para a melhora do estado nutricional relativo a este micronutriente destes indivíduos. Um destes estudos ainda indicou uma melhora no estresse oxidativo, processo importante na fisiopatologia da obesidade (MARANHÃO *et al.*, 2011; COMINETTI *et al.*, 2012). Outros estudos nacionais conduzidos com pacientes renais crônicos (STOCKLER-PINTO *et al.*, 2014), com declínio cognitivo leve (CARDOSO, *et al.*, 2016), com indivíduos dislipidêmicos e hipertensos (HUGUENIN *et al.*, 2015) e indivíduos saudáveis (DONADIO, *et al.*, 2017) também mostraram que o consumo diário de apenas 1 nóz (3 a 5g) por um período maior que 1 mês é eficaz na melhora dos biomarcadores do *status* de Se.

A castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*, H.B.K) é uma semente derivada da castanheira (**Figura 5**), uma espécie nativa da Amazônia que pertence à família Lecythidaceae mas que também pode ser encontrada em outros estados como Pará, Rondônia, Acre e uma parte do Maranhão e Tocantins (CARDOSO *et al.*, 2017).



Castanheira



Fruto (ourico)



Semente (castanha-do-brasil)

Figura 5. Imagens da árvore da castanha-do-brasil, seu fruto e semente.

Esta noz é considerada uma ótima fonte alimentar de Se por apresentar uma alta concentração e biodisponibilidade deste mineral. As concentrações de Se na castanha-do-brasil podem variar de 8 a 83 $\mu\text{g/g}$ dependendo da região onde é cultivada. A principal forma de Se encontrada nesta noz é a selenometionina, forma orgânica e biodisponível do mineral para o organismo humano. (THOMSON, *et al.*, 2008; YANG, 2009; CARDOSO *et al.*, 2017).

Nesse sentido, mais estudos nesta área são necessários para compreender melhor os efeitos deste micronutriente nos processos metabólicos envolvidos na fisiopatologia da obesidade. A ênfase por estudos na população brasileira se deve ao fato de que as diversidades regionais, incluindo os hábitos alimentares, possuem grande influência no *status* de Se.

Portanto, considerando a importância do processo inflamatório crônico na fisiopatologia da obesidade e o papel do Se como um nutriente com ação moduladora da resposta inflamatória por meio da sua participação na constituição de selenoproteínas, é de grande relevância avaliar a influência deste micronutriente neste contexto. Assim, este estudo se propôs a realizar um estudo de intervenção nutricional utilizando o Se proveniente da castanha-do-brasil, altamente biodisponível para o organismo humano.

2. HIPÓTESES EXPERIMENTAIS

- Indivíduos obesos apresentam deficiência de Se e o consumo da castanha-do-brasil é eficaz na melhora do estado nutricional relativo a este micronutriente.
- A ingestão de Se por meio do consumo da castanha-do-brasil é capaz de atenuar a inflamação crônica e de baixo grau presente em indivíduos obesos.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar o efeito do consumo de castanha-do-brasil sobre os biomarcadores inflamatórios e o estado nutricional relativo ao selênio de mulheres obesas.

3.2. Específicos

- Avaliar o estado nutricional geral das participantes do estudo, em especial quanto ao Se.
- Avaliar se a intervenção com Se proveniente da castanha-do-brasil influenciou os biomarcadores relacionados à inflamação.
- Avaliar a possível influência do Se na expressão das proteínas de membrana TLR2 e TLR4.

4. CASUÍSTICA

4.1. Aspectos éticos

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Nº Parecer 1.421.929) (**ANEXO 4**). Após todos os esclarecimentos sobre o estudo, todas as participantes que aceitaram participar receberam e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**ANEXO 5**) (Resolução CNS nº 196/96, itens III, IV e V). Foi informado também sobre o direito de desistir de participar da pesquisa em qualquer momento, sem constrangimentos.

4.2. Seleção dos participantes

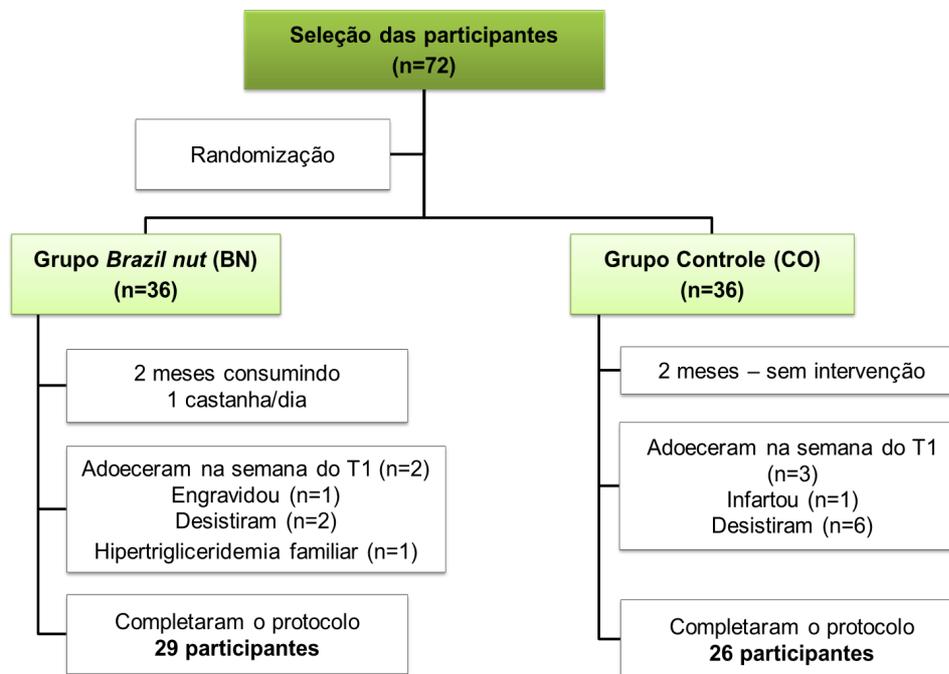
Este estudo é do tipo longitudinal, prospectivo e randomizado. O cálculo do tamanho da amostra foi estimado utilizando o *software* estatístico G*Power Versão 3.1.5 (FAUL *et al.*, 2007). Foi realizado o cálculo *a priori* para comparação de médias independentes utilizando o teste *t* unicaudal, considerando uma alocação de 1:1 entre os grupos.

A variável quantitativa selecionada para a estimativa do cálculo amostral foi a concentração de selênio plasmático ($\mu\text{g/L}$). Adotou-se uma probabilidade de erro alfa de 0,05 e um poder de teste de 0,95. O desvio padrão foi obtido do estudo de (Cominetti *et al.*, 2012) cujo objetivo foi avaliar o efeito do consumo de selênio sobre o risco aterogênico em mulheres obesas. A magnitude do efeito foi calculada baseada nos estudos de Thomson (2004) e Cominetti *et al.*, (2012), sendo obtido um valor de 0,9. Dessa forma, o tamanho da amostra foi estimado em 56 participantes, considerando uma alocação de 28 indivíduos em cada grupo. Entretanto, para prevenir eventuais perdas comuns em estudos longitudinais prospectivos, recomenda-se a correção do cálculo amostral em até 30% (MIOT, 2011). Assim, a amostra final foi composta por 72 participantes (considerando uma alocação de 36 indivíduos em cada grupo) recrutadas nas dependências do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HC-FMUSP).

Foram incluídas na pesquisa participantes do sexo feminino com idade entre 18 e 55 anos que atendiam aos seguintes critérios:

- IMC de 28,0 a 39,9 kg/m²;
- Não apresentar doenças como infecções recentes, inflamação de alto grau, doenças cardiovasculares e gastrointestinais crônicas (doença inflamatória intestinal, doença celíaca) e câncer;
- Não estar gestante e participando de outro estudo clínico;
- Não utilizar suplementos vitamínico-mineral;
- Não ser tabagista;
- Não fazer ingestão de álcool cronicamente;
- Não apresentar alergia alimentar a oleaginosas ou relatar um consumo regular de castanha-do-brasil;
- Não praticar atividade física intensa.

As 72 participantes recrutadas foram alocadas para o grupo *Brazil nut* (BN) ou para o grupo controle (CO). Durante o período do estudo, houve perdas no segmento e as razões da não continuidade no estudo estão descritas na **Figura 6**. No caso do grupo CO, é importante relatar que algumas desistências ocorreram no momento da abertura do envelope com a palavra “**sem castanha**”. Neste último caso, os envelopes foram descartados, pois já estavam com marcas por terem sido abertos e este fato poderia comprometer a randomização do estudo. Desse modo, o estudo foi finalizado com 29 participantes no grupo BN e 26 no grupo CO (**Figura 6**).



Legenda: n= número de participantes; T1= segunda coleta de sangue após 2 meses de suplementação ou sem intervenção.

Figura 6. Fluxograma de seleção das participantes do estudo.

4.3. Protocolo Experimental

As participantes foram alocadas randomicamente em um grupo que recebeu a castanha-do-brasil (Grupo BN) ou em um grupo controle (Grupo CO), que não consumiu a castanha. A randomização foi feita por meio de sorteio com a utilização de envelopes opacos e lacrados. No momento da primeira coleta de sangue, cada participante escolheu aleatoriamente um envelope contendo a palavra “**castanha**” ou “**sem castanha**”, definindo, assim, o seu respectivo grupo.

O grupo BN consumiu diariamente 1 nóz de castanha-do-brasil por um período de 60 dias. O grupo CO não recebeu nenhum tipo de intervenção nutricional durante este mesmo período e foi orientado a evitar a ingestão de outros tipos de alimentos ou preparações contendo castanha-do-brasil (**Figura 7**).

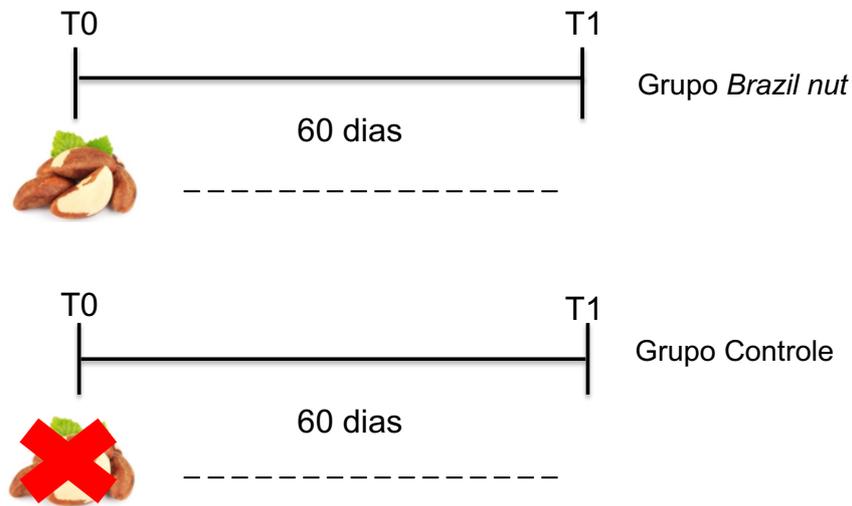


Figura 7. Protocolo experimental do estudo.

No dia da primeira coleta de sangue (T0), as participantes do grupo BN receberam um recipiente com a quantidade necessária de castanhas-do-brasil a ser consumida durante o estudo. No rótulo estavam disponíveis as informações nutricionais, bem como as instruções corretas para o armazenamento e o consumo deste alimento. O acompanhamento e controle do consumo da castanha foi feito por meio de contato telefônico durante os dois meses de suplementação. Ao final do estudo (T1) foi solicitado que as participantes que, por algum motivo, tivessem esquecido de comer a castanha retornassem com as mesmas no recipiente que foi entregue no início do estudo. O grupo CO, nesta mesma etapa, foi orientado a retornar ao ambulatório após 60 dias para uma nova avaliação. Neste dia também foi aplicado um questionário, a fim de obter informações socioeconômicas, uso de medicamentos e presença de doenças (**ANEXO 6**). Ao final do período de dois meses, para os dois grupos, foi realizada a segunda coleta de sangue (T1), encerrando o protocolo experimental.

Nos momentos T0 e T1, foram realizadas a coleta de sangue, antropometria, bioimpedância elétrica (**ANEXO 6**) e um recordatório alimentar de 24 horas (**ANEXO 7**), sendo que outros dois foram feitos por telefone.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Caracterização da castanha-do-brasil (*Bertholettia excelsa* H.B.K.)

5.1.1. Análise da composição centesimal e da concentração de Se

As castanhas-do-brasil utilizadas neste estudo são provenientes da região Amazônica e foram doadas pela empresa Agropecuária Aruanã S/A (Itacotiara – AM). As castanhas, após serem recebidas pelo Laboratório de Nutrição e Minerais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP, foram mantidas na própria embalagem fornecida pelo fabricante (embalagem a vácuo em latas metálicas protegidas da ação da luz e do ar) e imediatamente armazenados em freezer -20°C.

Para a determinação da composição centesimal e da concentração de Se, foi retirada uma amostra aleatória das castanhas do lote recebido. Em seguida, as castanhas foram trituradas e submetidas ao processo de liofilização para determinação da umidade da amostra. As amostras liofilizadas foram utilizadas para a determinação de cinzas, lipídeos, proteínas e da concentração de Se. O carboidrato (incluindo a fração fibra) foi estimado por diferença. A composição centesimal foi determinada de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (cinzas e lipídeos) e da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (proteínas).

A concentração de Se foi realizada por meio do método de espectrometria de absorção atômica por geração de hidretos acoplados a cela de quartzo (HGQTAAS). Em um tubo de micro Kjeldhal foram pesadas 50mg das amostras de castanha-do-brasil já liofilizadas com posterior adição de 5mL de ácido nítrico 68% P.A. (Merck®). Os tubos foram colocados em blocos digestores e mantidos *overnight* para o início da digestão das amostras. No dia seguinte, foi dada a continuidade da digestão das amostras com os blocos digestores a uma temperatura inicial de 50°C, a qual foi aumentada gradativamente até 150°C para digestão completa do material orgânico. Ao final desta etapa, as soluções foram reduzidas de Se (VI) para Se (IV) com a adição de 5mL de HCL 1,2N a uma temperatura de 100°C por duas horas. Após este procedimento, as soluções foram diluídas para 100mL com água nanopura e submetidas à leitura (FOSTER, SUMAR, 1996; HAO *et al.*, 1996). A análise foi realizada em triplicata e os resultados expressos em µg/100g de alimento *in natura*. O controle da metodologia

foi feito por meio da utilização dos materiais de referência *Wheat Flour Standart Reference Material 1567^a* e *Bovine Liver Material* certificados pelo *National Institute of Standart & Technology* (NIST). A análise seguiu os mesmos padrões realizados para as amostras. A curva de calibração utilizada na análise de Se foi preparada com Tritisol® *selenium standart solution* (1000 mg/L) - Merck®, nas seguintes concentrações: 0,0; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 10,0; 30,0 µg/L e com 10% de HCL 1,2 N.

5.2. Avaliação Antropométrica

5.2.1. Peso

Utilizou-se uma balança antropométrica com graduação de 100g, onde as participantes foram posicionadas no centro da balança, descalças, usando a menor quantidade de roupa possível, em posição ereta e com os braços estendidos ao longo do corpo (LOHMAN, 1992).

5.2.2. Estatura

Foi aferida utilizando um estadiômetro fixo na parede, estando as participantes descalças, 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° (LOHMAN, 1992).

5.2.3. Índice de Massa Corpórea (IMC)

Foi calculado dividindo-se o peso (kg) atual pela estatura (m) elevada ao quadrado: $IMC = \text{peso (kg)} / \text{estatura (m}^2\text{)}$.

O resultado foi analisado de acordo com a classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1998).

5.2.4. Circunferência da Cintura (CC)

A circunferência da cintura foi aferida com a paciente em pé, com os pés juntos e braços estendidos ao longo do corpo, utilizando uma fita métrica não extensível. A mesma deve circundar o indivíduo no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca. A leitura foi feita no momento da expiração e o resultado foi

analisado de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (LOHMAN, 1992; WHO, 1998).

5.2.5. Bioimpedância elétrica

Para realização deste procedimento foi utilizado o analisador de composição corporal InBody 720 (Ottoboni). As participantes foram orientadas a não ingerir álcool e bebidas cafeínadas, bem como não praticar exercícios físicos intensos nas últimas 24 horas. O exame era realizado logo após a coleta de sangue, com o indivíduo em jejum. No momento do procedimento, foi solicitado que o indivíduo retirasse todos os objetos metálicos, como brincos e relógios, e seguisse os procedimentos necessários indicados pela técnica do equipamento para a correta realização da bioimpedância.

5.3. Avaliação do consumo alimentar

O consumo alimentar foi avaliado por meio do recordatório alimentar de 24 horas. Foram aplicados três recordatórios durante o estudo (no período de 60 dias do protocolo), com a anotação de todos os alimentos consumidos em dois dias alternados durante a semana e um dia no final de semana. A análise dos alimentos consumidos pelos participantes da pesquisa foi feita por meio do software online Nutriquant (<http://www.nutriquant.com.br>) (GALANTE, 2007). Os nutrientes analisados foram carboidratos, lipídeos totais e suas sub-frações (saturados, monoinsaturados e poli-insaturados), proteínas e selênio. A avaliação da adequação das dietas foi realizada por meio das *Dietary Reference Intake* (DRI) (IOM, 2006) e para as sub-frações lipídicas e colesterol utilizou-se as recomendações da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) (FALUDI *et al.*, 2017). Para os macronutrientes foi realizada avaliação de acordo com a contribuição energética em percentual da ingestão calórica total, utilizando a recomendação da AMDR (*Acceptable Macronutrient Distribution Ranges*) proposta pelo *Institute of Medicine* (IOM, 2006) e os resultados são expressos em percentual do valor energético total (%VET).

5.4. Coleta do Material Biológico e Análises Bioquímicas

5.4.1. Sangue

A coleta de sangue foi realizada em um ambiente adequado por um profissional de enfermagem. Amostras de 25 mL foram colhidas em tubos com EDTA no período da manhã com as participantes em jejum de cerca de 10 a 12 horas. Após a coleta, o sangue foi transferido para tubos de 15 mL para separação do plasma e eritrócito. O plasma foi separado do sangue total por centrifugação a 3.000 rpm, durante 15 minutos a 4 °C, acondicionados em tubos de polipropileno e armazenados a -80 °C para posterior análise. Em seguida, a massa eritrocitária obtida do sangue total foi lavada três vezes com 5 mL de solução salina a 0,9%, homogeneizada lentamente por inversão e centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, sendo o sobrenadante descartado. Após a última centrifugação, a solução salina foi aspirada, e a massa de eritrócito foi cuidadosamente extraída com micropipeta e colocada em tubos de polipropileno, e armazenada a -80°C até o momento da análise.

5.4.2. Concentração plasmática e eritrocitária de Se

O Se plasmático e eritrocitário foi determinado por espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS, Perkin Elmer DRC II) de acordo com a metodologia descrita previamente (BATISTA *et al.*, 2009) no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto/SP).

5.4.3. Atividade enzimática da GPx1

A atividade da GPx1 foi determinada no eritrócito. Esta análise foi realizada de acordo com a metodologia proposta por (PAGLIA, VALENTINE, 1967), em um analisador bioquímico (Labmax 240), usando um kit disponível comercialmente (Ransel; Randox Laboratories, UK). Esta técnica baseia-se na oxidação da glutatona pelo peróxido de hidrogênio. Na presença da glutatona redutase e NADH, a glutatona oxidada é imediatamente convertida à forma reduzida com concomitante oxidação de NADH (reduzindo NADPH a NADH⁺). Também foi determinada a concentração de hemoglobina, uma vez que a atividade da enzima foi expressa em U/gHb.

5.4.4. Concentração plasmática da selenoproteína P (SELENOP)

A concentração plasmática da SELENOP foi determinada por ELISA por meio de kit disponível comercialmente (Abexxa, Ltd.) em um leitor de microplaca (Biotech Synergy H1, Biotek).

5.4.5. Perfil lipídico e Glicemia

A determinação da concentração destes parâmetros foi realizada em amostras de soro em um analisador bioquímico (Labmax 240, Labtest), utilizando kits disponíveis comercialmente (Labtest). Todas as dosagens foram realizadas no dia da coleta do material biológico.

5.4.6. Biomarcadores inflamatórios, Leptina e Insulina

Os biomarcadores inflamatórios selecionados para análise foram: MCP-1, IL-10, IL-13, IL-2, IL-6, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , proteína C reativa (PCR), fibrinogênio e lipopolissacarídeo (LPS). As dosagens desses biomarcadores, de leptina e da insulina foram realizadas em amostras de plasma pela técnica de Multiplex utilizando kits comerciais (Milliplex, Merck Millipore).

5.4.7. Cálculo do Índice de Resistência à Insulina – *Homeostasis Model Assessment* (HOMA-IR) e da Capacidade Funcional das células β -pancreáticas (HOMA-BETA)

Os índices HOMA-IR e HOMA-BETA foram calculados a partir das seguintes equações:

$$\text{HOMA-IR} = \text{Glicemia (mMol)} \times \text{Insulina } (\mu\text{U/mL}) / 22,5$$

$$\text{HOMA-BETA} = (20 \times \text{Insulina jejum}) / (\text{Glicemia jejum} \times 0,0555) - 3,5$$

Segundo as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (Milech *et al.*, 2016), pode-se definir que um paciente tem resistência à insulina quando ele se enquadra em um dos critérios propostos por (STERN *et al.*, 2005):

- HOMA-IR > 4,65
- IMC > 28,9 kg/m²
- HOMA-IR > 3,60 e IMC > 27,5 kg/m²

5.4.8. Avaliação da razão GSH:GSSG

Para avaliar a razão GSH:GSSG foram realizadas inicialmente as dosagens de glutationa total (GSH_{TOTAL}) e glutationa oxidada (GSSG) em amostras de plasma por ELISA utilizando kits comerciais (EnzyChrom™ GSH/GSSG Assay Kit (EGTT-100) em um leitor de microplaca (Biotek Synergy H1, Biotek). Em seguida, determinou-se os valores de glutationa reduzida (GSH) a partir da seguinte fórmula: **GSH = (GSH_{TOTAL}) - 2 x (GSSG)**. Após a obtenção dos dados o cálculo da razão GSH:GSSG foi realizado.

5.4.9. Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cell - PBMC*)

As PBMC foram isoladas no dia da coleta a partir de 10mL de sangue (contendo EDTA) com Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich®) à temperatura ambiente em um fluxo laminar. Foram separadas uma alíquota com 5 x 10⁶ células para posterior extração do RNA destinado às análises de expressão gênica, e o restante foi utilizado para a análise das proteínas de membrana TLR2 e TLR4 por citometria de fluxo.

5.4.10. Expressão Gênica

Os genes escolhidos para investigar a diferença de expressão em resposta ao consumo da castanha foram: GPx1, SELENOP, IL-6, IL-10, TNF- α , IL-1 β , TLR-2, TLR-4 (**Tabela 1**). O RNA foi extraído a partir das PBMC isoladas com Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich®) e armazenadas em Trizol a -80 °C. Após a extração do RNA (Direct-zol™ KNA Kit, Zymo Research), foi feita a leitura em espectrofotômetro (Nanodrop®) nos comprimentos de onda (λ) de 260nm (RNA) e 280nm (proteína). O RNA foi considerado íntegro e de boa qualidade quando a razão 260/280 foi maior que 1,8 e menor que 2,0. As amostras que apresentaram razão fora desse intervalo foram descartadas. A determinação da concentração de RNA foi realizada em espectrofotômetro (Nanodrop®). A transcrição reversa do RNA para cDNA foi realizada utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) em um termociclador. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C. As análises de expressão gênica foram realizadas por PCR em tempo real (qRT-PCR) no equipamento StepOne Plus (*Life*

Technologies, USA) utilizando ensaios específicos para cada gene (*Taqman® Gene Expression Assays, Life Technologies*). Os ensaios estão descritos na tabela 1. O gene de referência utilizado nas reações foi o GAPDH. Como controle de qualidade, todas as reações de qRT-PCR foram realizadas em triplicata, em placas específicas de 96 poços. Além disso, em cada placa foram analisados controles sem amostra (controle negativo) com a finalidade de avaliar possíveis contaminações dos reagentes com os produtos de PCR.

Tabela 1. Descrição dos ensaios *Taqman®* utilizados para avaliação da expressão gênica.

<u>Gene</u>	<u>Identificação do ensaio</u>
GPx1	Hs_00829989_gH
SEPP1	Hs_01032845_m1
TNF- α	Hs_00174128_m1
IL-6	Hs_00174131_m1
IL-1 β	Hs_01555410_m1
IL-10	Hs_00961622_m1
TLR2	Hs_02621280_s1
TLR4	Hs_00152939_m1
GAPDH	Hs_02758991_g1

Legenda: GPx1 = glutationa peroxidase 1; SEPP1 = selenoproteína P 1; TNF- α = fator de necrose tumoral alfa; IL-6= interleucina 6; IL-1 β = interleucina 1 beta; IL-10= interleucina 10; TLR2= *toll like receptor 2*; TLR4= *toll like receptor 4*; GAPDH= gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

Para cada reação foram utilizados 1 μ L de cDNA (ajustado para uma concentração de 25 ng/ μ L em todas as amostras), 5 μ L do *Taqman® Universal PCR Master Mix* e 0,5 μ L do *Taqman® Gene Expression Assay* específico para cada gene. O volume final foi completado com água autoclavada, totalizando 10 μ L em cada poço. As amostras foram submetidas à seguinte termociclagem: 50°C por 2 min; 95°C por 10 min seguidos de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 min.

Para a normalização dos resultados, adotou-se como referência a expressão de GAPDH. Para o cálculo do *fold change* utilizou-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK, SCHMITTGEN, 2001), considerando:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{pós-intervenção}} - Ct_{\text{referência}}) - (Ct_{\text{baseline}} - Ct_{\text{referência}}).$$

5.4.11. Caracterização fenotípica e avaliação da expressão de proteínas de membrana TLR2 e TLR4 em PBMC

No dia da coleta do material biológico, após o isolamento das PBMC, foi realizada a contagem dessas células em um contador de células automatizado (TC 10 BIO-RAD) e esses valores anotados. Em seguida elas foram armazenadas em criotubos estéreis em solução de DMSO 10% e congeladas em freezer -80°C. Após 24 horas, os criotubos foram transferidos para o nitrogênio líquido onde permaneceram até o momento da análise.

A quantidade relativa de proteínas de membrana TLR2 e TLR4 em monócitos foram obtidas por citometria de fluxo (FACSVerse™ – *BD Bioscience*). Na **tabela 2** estão descritos os anticorpos (*eBioscience™ - ThermoFisher Scientific, USA*) utilizados e seus respectivos fluorocromos e concentrações.

Tabela 2. Descrição dos anticorpos, fluorocromos e concentração dos mesmos utilizados na análise de citometria de fluxo.

<u>Anticorpo</u>	<u>Fluorocromo</u>	<u>Concentração</u>
CD14	APC-Cy7	5µL
CD16	PE-Cyanine7	1µL
TLR2	FITC	2µL
TLR4	PE	5µL
Live/Dead (Far Red)	RED	0,5µL

Legenda: TLR2= *toll like receptor 2*; TLR4= *toll like receptor 4*

As PBMC foram descongeladas no dia da análise em meio de cultura (RPMI) de acordo com protocolo padronizado no Laboratório de Nutrição e Minerais. Em seguida, foi realizada uma nova contagem dessas células para verificar o número de células viáveis e, posteriormente, realizar a marcação com os anticorpos. As análises foram realizadas com o número mínimo de 3×10^5 células. A viabilidade celular foi avaliada utilizando a marcação com o Live/Dead (Far Red). Após a marcação com os anticorpos, as células foram fixadas em solução de paraformaldeído 1% e armazenadas em geladeira até o momento da aquisição dos dados. As grades com tubos de citometria foram cobertos com papel alumínio para proteção contra a luz. No momento da análise no citômetro, um total de 100.000

eventos foram adquiridos por amostra. A análise dos dados e a compensação dos anticorpos foram feitos no software FlowJo versão X.0.7.

As **figuras 8, 9 e 10** ilustram um exemplo dos *gates* e as análises seguintes realizadas no software.

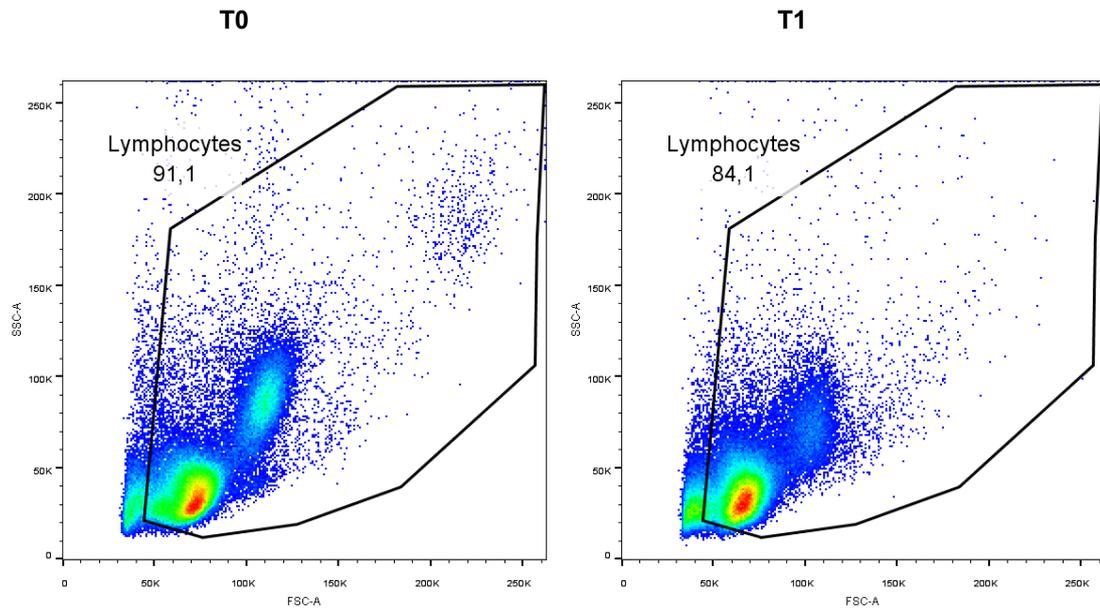


Figura 8. Gráficos *dot plot* com a seleção dos *gates* de uma amostra aleatória nos tempos T0 e T1 do grupo *Brazil nut*.

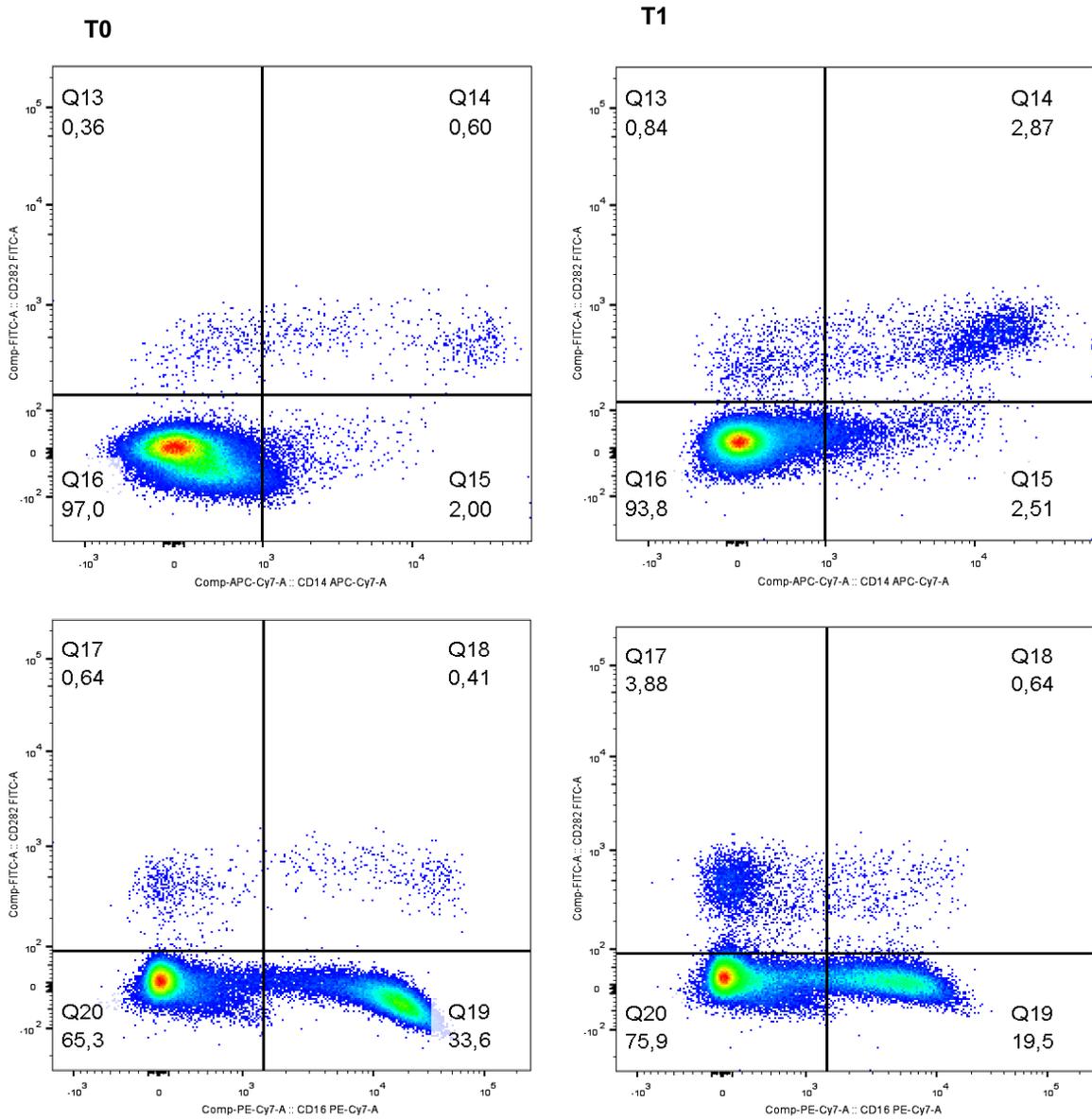


Figura 9. Gráficos *dot plot* CD14+/TLR2+ e CD16+/TLR2+ de uma amostra aleatória nos tempos T0 e T1 do grupo *Brazil nut*.

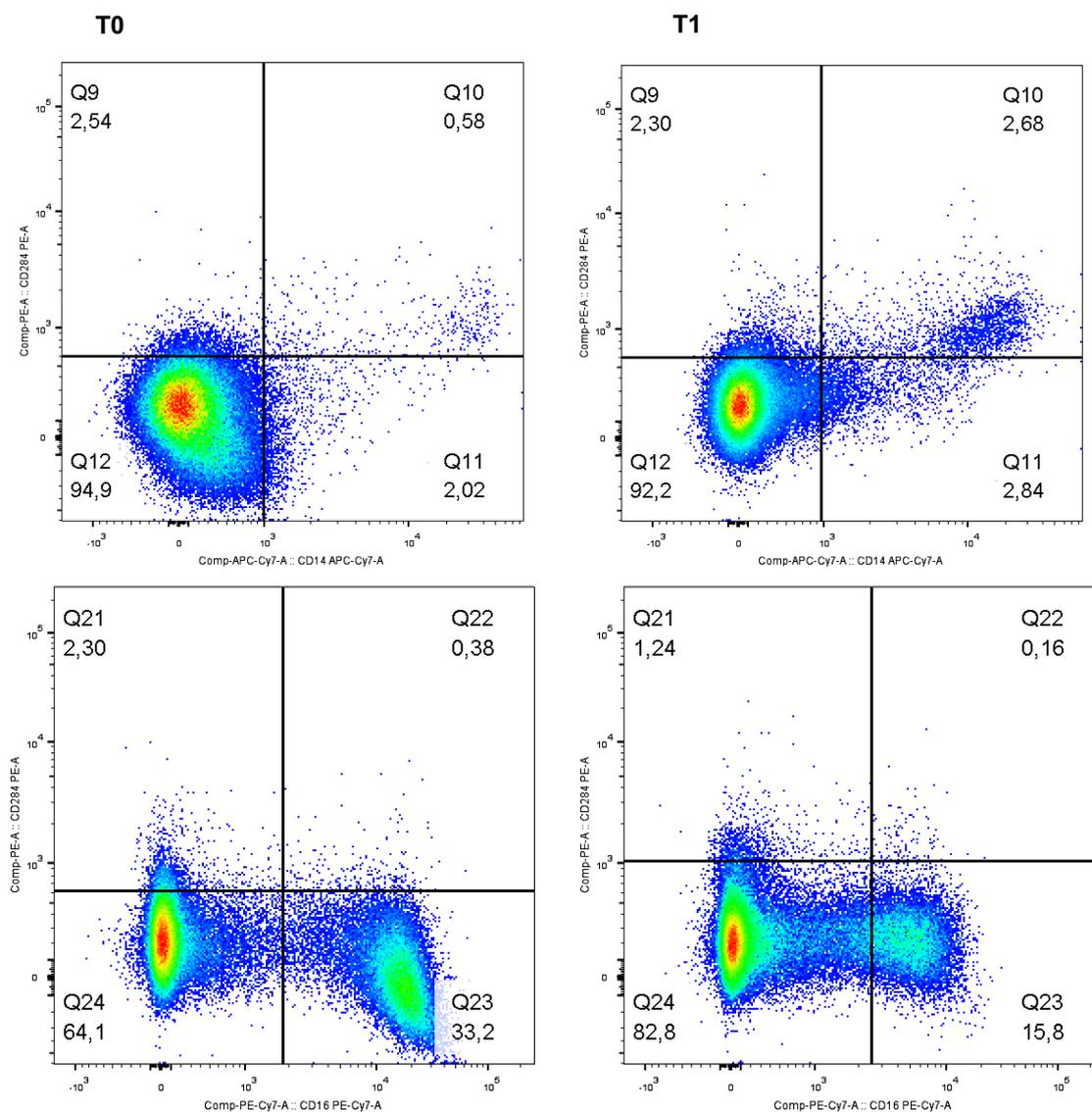


Figura 10. Gráficos *dot plot* CD14+/TLR4+ e CD16+/TLR4+ de uma amostra aleatória nos tempos T0 e T1 do grupo *Brazil nut*.

5.5. Análise Estatística

O banco de dados foi construído no software SPSS versão 22.0. As análises foram realizadas no software SPSS versão 22 e no GraphPad Prism versão 5.0. A presença de *outliers* foi avaliada de forma criteriosa para posterior decisão da exclusão da variável isoladamente ou a retirada do paciente do estudo. Em seguida foi realizado o teste de *Shapiro Wilk* para testar a normalidade das variáveis.

Na avaliação do consumo alimentar das pacientes os resultados foram ajustados pela energia por meio do método de resíduos (WILLETT *et al.*, 1997) e a ingestão habitual de nutrientes foi estimada por meio das técnicas de modelagem

estatística incorporadas na plataforma *online Multiple Source Method* (MSM). Essa técnica estatística permite a estimativa da ingestão habitual mesmo apresentando medida repetida do consumo alimentar em apenas uma subamostra (HAUBROCK *et al.*, 2011).

Para comparação das variáveis numéricas entre os grupos, quando os dados apresentaram distribuição normal utilizou-se o teste t de *Student* para amostras independentes. Para os dados não-paramétricos utilizou-se o teste de Mann-Whitney.

Para avaliar a relação entre variáveis numéricas foi realizado Teste de correlação de Spearman.

Para a avaliação da variação total dos parâmetros ao longo do estudo, foi realizado o cálculo do delta (Δ) por meio da subtração dos valores pós-intervenção (T1) e pré-intervenção (T0). Posteriormente, com a finalidade de investigar o efeito do tempo e da intervenção, realizou-se uma análise de variância (ANOVA *repeated measures*) para medidas repetidas.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5% ($p < 0,05$).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Composição nutricional da castanha-do-brasil

Para caracterizar as castanhas-do-brasil utilizadas neste estudo, foram realizadas as análises de composição centesimal e da concentração de Se. Os resultados destas análises estão descritos na **tabela 3**.

Tabela 3. Análise da composição centesimal e da concentração de selênio das castanhas-do-brasil utilizadas no estudo.

Energia e Nutrientes	Média (DP)	Concentração por unidade*
Energia (kcal)	706,13 (3,82)	35,31
Umidade (%)	1,65 (0,21)	0,08
Cinzas (g)	2,94 (0,08)	0,15
Lipídios (g)	64,90 (1,84)	0,79
Proteínas (g)	15,60 (0,95)	0,78
Carboidratos (g)	15,91 (0,65)	3,25
Selênio (µg/g)	81,89 (8,42)	409,45

Valores apresentados em média (desvio padrão). * Considerando: 1 unidade = ~ 5g.

Com relação à distribuição de macronutrientes, assim como outras nozes, a castanha-do-brasil apresenta um alto teor de lipídeos, seguido de proteínas e carboidratos. Do total de lipídeos, cerca de 25% são ácidos graxos monoinsaturados, 21% ácidos graxos poli-insaturados e 15% ácidos graxos saturados. Nozes, em geral, por essa característica, são consideradas benéficas para a saúde, principalmente na redução do risco para doenças cardiovasculares (YANG, 2009; CARDOSO *et al.*, 2017).

A concentração média de Se por grama nas castanhas utilizadas neste estudo foi de 81,89 µg/g. Considerando que o peso médio de uma unidade é de cerca de 5 g, o teor médio de Se oferecido às participantes, foi de 409,45 µg. Em termos de recomendação de ingestão de Se, este valor é superior ao estabelecido pela necessidade média estimada (EAR) para homens e mulheres adultos (45 µg/dia), ficando muito próximo ao valor máximo tolerável de ingestão (UL) que é de 400 µg/dia. É importante considerar que o teor de Se das castanhas utilizadas neste estudo não ultrapassou o valor da dose estabelecida na qual o menor efeito adverso

foi observado (LOAEL), que é de 900 µg/dia. É importante ressaltar que durante o período do estudo não foi observado ou relatado pelas participantes nenhum efeito adverso que pudesse ter sido causado pela ingestão de Se proveniente da castanha-do-brasil.

O teor de Se nos alimentos tem grande variabilidade pois depende da concentração do mineral nos solos, com impacto tanto para os alimentos de origem animal, como já relatado, como os de origem vegetal (COMINETTI *et al.*, 2017). As castanheiras são consideradas plantas acumuladoras secundárias e a sua capacidade de acumular Se é importante tanto para proteção contra insetos e mamíferos herbívoros, como para a redução da susceptibilidade a patógenos. Assim, os teores de Se presente nas castanhas-do-brasil também podem variar dependendo da região onde é cultivada ou ainda em uma mesma região em diferentes épocas do ano. As castanhas-do-brasil que foram doadas e utilizadas neste e em outros estudos do Laboratório de Nutrição e Minerais são provenientes da região Amazônica que possui um solo com altas concentrações de Se. Em outros estados brasileiros como Acre e Mato Grosso, por exemplo, as castanhas cultivadas nestes solos apresentam baixas concentrações de Se quando comparados com as da região Amazônica (CARDOSO *et al.*, 2017; SILVA JUNIOR *et al.*, 2017). A **tabela 4** mostra os resultados obtidos em outros trabalhos com castanhas-do-brasil (provenientes da região Amazônica) já realizados pelo nosso grupo de pesquisa, evidenciando as diferenças da concentração de Se tanto nas diferentes safras como em tempos diferentes.

Tabela 4. Concentração de selênio de diferentes estudos nacionais realizados com castanhas-do-brasil provenientes da região Amazônica.

População de estudo (n)	Concentração média de Se ($\mu\text{g}/\text{unidade}$)	Referência
Mulheres com obesidade mórbida (37)	~ 290,0	(Cominetti <i>et al.</i> , 2012)
Pacientes com diabetes <i>mellitus</i> 1 (35)	~288,8	(Pires, 2012)
Pacientes em hemodiálise (40)	~ 290,0	(Stockler-Pinto <i>et al.</i> , 2014)
Pacientes com artrite reumatóide (46)	~ 363,0	(Callou, 2014)
Pacientes idosos com declínio cognitivo leve (20)	~288,7	(Cardoso, <i>et al.</i> , 2016)
Adultos saudáveis (130)	~ 300,0	(Donadio, <i>et al.</i> , 2017)
Mulheres obesas (29)	~409,5	*(Duarte, 2018)

Legenda: n=numero de participantes. Se= selênio. *Tese em tela.

Na castanha-do-brasil o Se encontra-se, principalmente, nas formas de selenometionina e selenocisteína que são as formas orgânicas e mais biodisponíveis do mineral para o organismo humano. Desse modo, este alimento é considerado a melhor fonte alimentar deste micronutriente (DUMONT *et al.*, 2006; THOMSON, *et al.*, 2008; DA SILVA *et al.*, 2013).

6.2. Caracterização da população do estudo

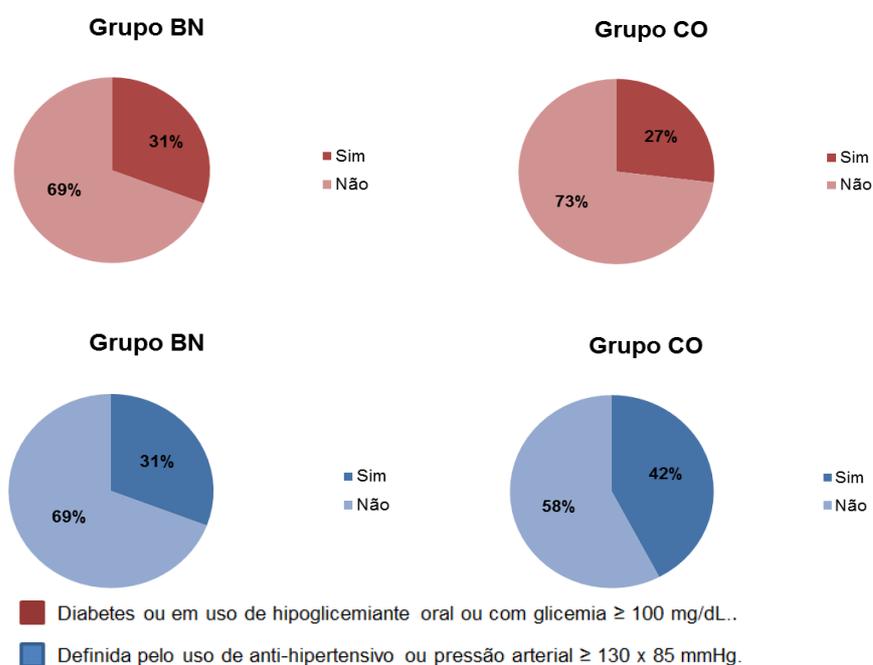
O protocolo experimental foi finalizado com 29 participantes no grupo BN e 26 no grupo CO com idade média (DP) de 40,4 (9,0) e 39,4 (9,5) anos ($p=0,714$), respectivamente. Como referido, no primeiro dia da coleta de sangue (T0) foi aplicado um questionário para obtenção de informações socioeconômicas e de hábitos de vida. A **tabela 5** refere-se ao perfil das participantes de cada grupo do estudo.

Tabela 5. Perfil das participantes dos grupos *Brazil nut* (BN) e Controle (CO) segundo os aspectos socioeconômicos e hábitos de vida.

Variáveis	Grupo BN (n=29)		Grupo CO (n=26)	
	N	%	N	%
<i>Características socioeconômicas</i>				
<u>Estado civil</u>				
Solteiro	9	31,0	13	50,0
Casado	17	58,6	10	38,5
Divorciado	2	6,9	2	7,7
Viúvo	1	3,4	1	3,8
<u>Etnia</u>				
Branco	11	37,9	6	23,1
Negro	6	20,7	6	23,1
Pardo/Mulato	12	41,4	13	50,0
Oriental	0	0,0	1	3,8
<u>Escolaridade</u>				
Fundamental incompleto	0	0,0	2	7,7
Fundamental completo	1	3,4	0	0,0
Médio incompleto	2	6,9	1	3,8
Médio completo	11	37,9	9	34,6
Superior incompleto	11	37,9	4	15,4
Superior completo	4	13,8	10	38,5
<u>Renda Familiar</u>				
>1 SM	0	0,0	2	7,7
1-2 SM	5	17,2	3	11,5
2-3 SM	9	31,0	6	23,1
3-5 SM	13	44,8	9	34,6
>5 SM	2	6,9	6	23,1
<i>Hábitos de Vida</i>				
<u>Menopausa</u>				
Sim	2	6,9	3	11,5
Não	27	93,1	23	88,5
<u>*Nível de Atividade Física</u>				
Sedentário	13	44,8	9	34,6
Insuficientemente ativo	8	27,6	16	61,5
Ativo	8	27,6	1	3,8
Muito ativo	0	0	0	0
<u>Tabagismo</u>				
Nunca fumou	23	79,3	24	92,3
Ex-fumante	6	20,7	2	7,7
<u>Ingestão de bebida alcoólica</u>				
Sim	11	37,9	8	30,8
Não	18	62,1	18	69,2

Legenda: N= numero de participantes; BN= *Brazil nut*; CO= controle. *Classificação do nível de atividade física pelo *International Physical Activity Questionnaire* (IPAQ).

Com relação à presença de doenças associadas, no grupo BN 31% das participantes apresentaram alteração na glicemia e hipertensão, enquanto no grupo CO essa porcentagem é de 27,0% e 42,0%, respectivamente (**Figura 11**).



Legenda: BN= Brazil nut; CO= controle

Figura 11. Distribuição percentual da presença de alteração na glicemia e hipertensão nos grupos de estudo.

Os resultados da avaliação antropométrica no *baseline* (T0) do estudo (**Tabela 6**) mostra que não houve diferença significativa nos parâmetros avaliados entre os grupos BN e CO.

Tabela 6. Avaliação antropométrica dos grupos *Brazil nut* (BN) e Controle (CO) no *baseline* (T0) de estudo.

Variável	Grupo BN (n=29)	Grupo CO (n=26)	p-valor
Peso (kg)	90,3 (85,3-101,6)	88,6 (81,7-103,5)	0,654 ^a
IMC (kg/m ²)	34,6 (30,8-37,4)	34,8 (33,1-40,2)	0,418 ^b
GC (%)	44,8 (39,9-50,9)	45,2 (41,9-50,7)	0,328 ^a
CC (cm)	100,5 (94,0-104,4)	99,8 (91,0-108,1)	0,780 ^a

Legenda: BN= *Brazil nut*; CO= controle; n=numero de participantes; IMC= índice de massa corpórea; GC= gordura corporal; CC= circunferência da cintura. *Valores apresentados em mediana e intervalo interquartilico entre parênteses. ^aTeste t-Student para amostras independentes. ^bTeste de Mann-Whitney.

A avaliação do consumo alimentar foi realizada por meio de três recordatórios alimentares de 24 horas durante o período da intervenção. A avaliação da adequação foi realizada para os seguintes nutrientes: carboidratos, proteínas, lipídios totais e suas sub-frações (saturados, monoinsaturados e poli-insaturados) e colesterol. A **figura 12** mostra a proporção das participantes de acordo com adequação segundo as recomendações das DRI e SBC.

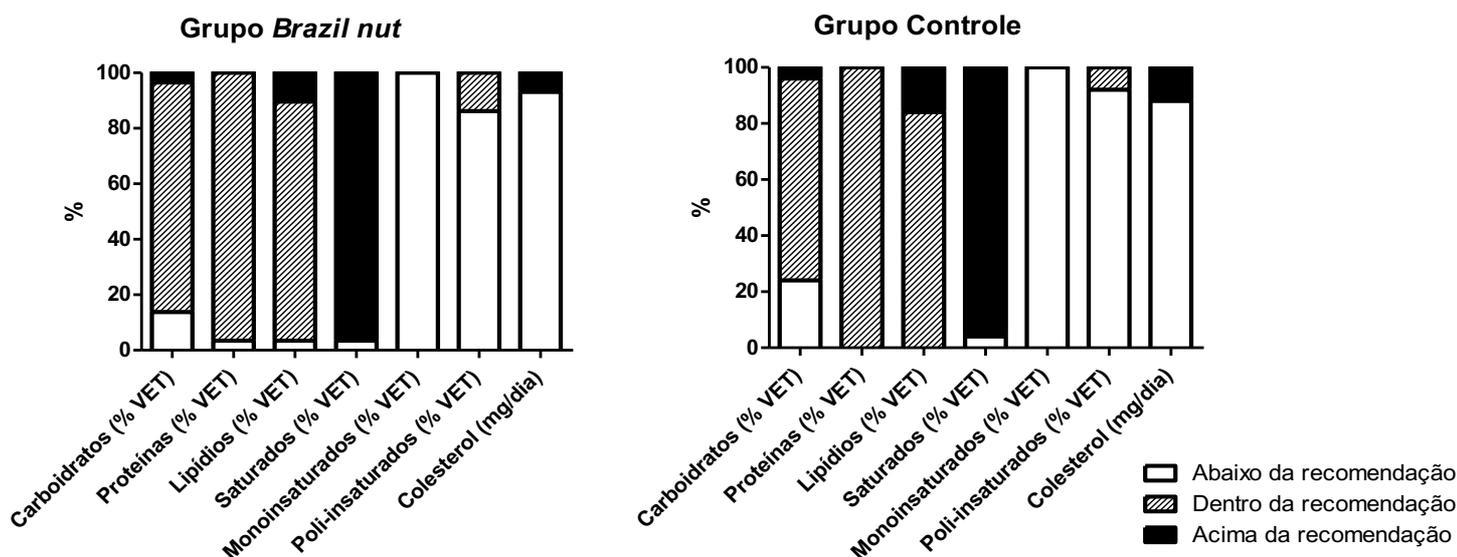


Figura 12. Proporção de mulheres de acordo com a adequação dietética segundo as recomendações propostas pelo IOM (2006) e SBC (2013).

As maiores inadequações foram observadas para o consumo de ácidos graxos saturados e monoinsaturados, tanto no grupo BN como no grupo CO. Ainda sim, o consumo de macronutrientes não foi diferente entre os grupos. É importante considerar que no caso de indivíduos obesos, esta avaliação tende a ser subestimada pelo fato do indivíduo sentir-se observado, o que pode levar a mudanças no seu relato para, por exemplo, demonstrar uma dieta idealizada ou para impressionar o entrevistador (GARCIA, 2004). Ao avaliar a presença de sub-retrato na população estudada, verificou-se que 65% das participantes relataram um consumo energético inferior a 70% das suas necessidades estimadas.

Em relação ao consumo de Se, a média de ingestão foi de 10,26 µg/dia, com uma prevalência de inadequação de 99,9%. Um importante fator a ser considerado no caso deste resultado está relacionado com a falta de dados da composição dos alimentos em relação aos micronutrientes. A concentração de Se nos alimentos é

dependente da origem geográfica do seu cultivo conforme discutido anteriormente. Desse modo, a escassez de dados referentes ao teor de Se de alimentos produzidos em solos brasileiros é um fator limitante na investigação do consumo alimentar deste micronutriente pela população brasileira. As tabelas nacionais, contém na realidade dados de alimentos de tabelas estrangeiras, que certamente possuem características diferentes. Grande parte destes dados são oriundos da tabela americana USDA (*U.S. Department of Agriculture*) cuja concentração de Se nos alimentos é superior quando comparado com os poucos dados disponíveis de alimentos nacionais. Assim, os dados obtidos desta avaliação não refletem de forma real o consumo de Se pela população estudada.

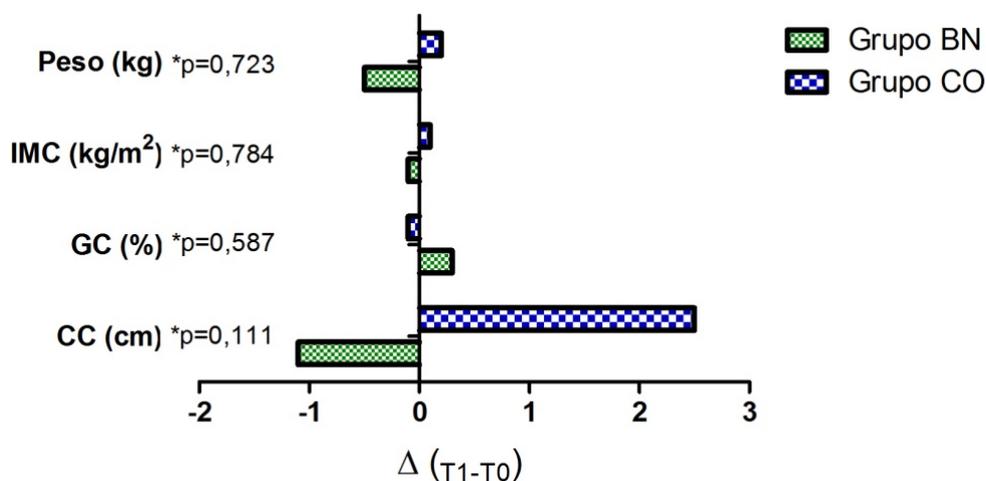
A partir dos resultados obtidos da avaliação antropométrica no *baseline* e do consumo alimentar, é possível afirmar que os grupos no início do estudo não eram diferentes.

6.3. Efeito da intervenção com a castanha-do-brasil

Para avaliar o efeito do tempo e da intervenção, foram realizadas análises de variância (ANOVA) para medidas repetidas para os parâmetros avaliados neste estudo. Os resultados estão demonstrados na forma de gráficos e tabelas a seguir.

6.3.1. Avaliação antropométrica

Em relação à avaliação antropométrica, o **gráfico 1** mostra que não houve diferença nas variações dos parâmetros avaliados entre os dois grupos durante o período da intervenção.



Legenda: BN= *Brazil nut*; CO= controle; IMC= índice de massa corpórea; GC= gordura corporal; CC= circunferência da cintura. Valores apresentados em média geométrica. $\Delta (T_1 - T_0)$ representa a variação média dos parâmetros avaliados após a intervenção. *valor de p calculado pela análise de variância para medidas repetidas: avaliação do efeito tempo e intervenção (ANOVA *repeated measures*).

Gráfico 1. Avaliação antropométrica dos grupos *Brazil nut* (BN) e Controle (CO) antes (T0) e após 2 meses de intervenção (T1).

Apesar dos efeitos benéficos (antioxidante, cardioprotetor e hipocolesterolêmico) do consumo de nozes para a saúde, ainda há questionamentos dos possíveis efeitos da ingestão diária no ganho de peso. Esta discussão ocorre principalmente em virtude do alto conteúdo de lipídeos presente neste alimento. Bes-Rastrollo e colaboradores (2009) a partir de dados do estudo *Nurses's Health Study II* realizado entre 1991 e 1999 avaliou os efeitos do consumo de nozes na variação de peso em 51.188 mulheres saudáveis com idade entre 20 e 45 anos. Os resultados indicaram que o alto consumo de nozes não foi associado com o aumento do ganho de peso durante os 8 anos do seguimento do estudo tanto nos indivíduos eutróficos como nos que tinham diagnóstico de sobrepeso e obesidade. Corroborando com outros trabalhos da literatura, este estudo não encontrou uma relação entre o consumo de nozes, neste caso a castanha-do-brasil, e o peso corporal. (SABATE, 2003; COMINETTI *et al.*, 2012; VADIVEL *et al.*, 2012; JACKSON, HU, 2014; EL-AMARI *et al.*, 2016).

6.3.2. Avaliação do estado nutricional relativo ao Se

Para avaliação do estado nutricional relativo ao Se, além da ingestão alimentar, utiliza-se biomarcadores sanguíneos que refletem o *status* de Se corporal a curto, médio e longo prazo. Os biomarcadores utilizados para esta avaliação nas duas fases do protocolo experimental deste estudo foram: as

concentrações de Se no plasma e no eritrócito, e a concentração plasmática de SELENOP. Na **tabela 7** estão os resultados das avaliações de Se no plasma e no eritrócito.

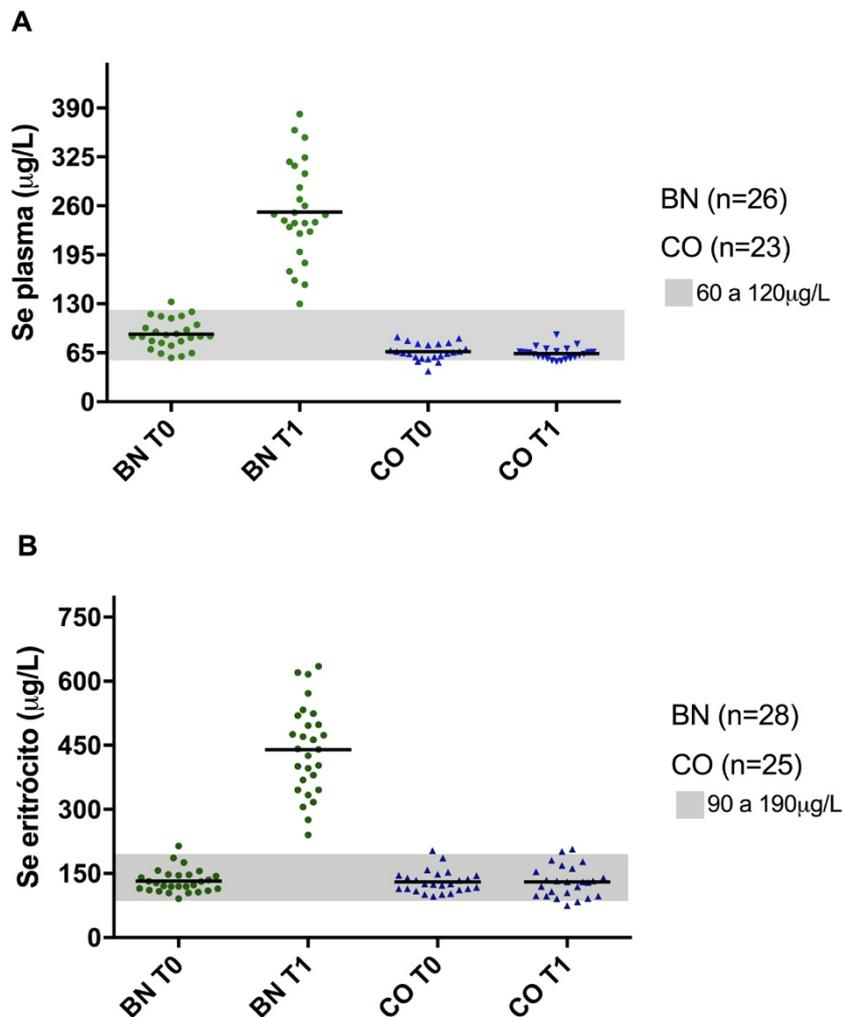
Tabela 7. Determinação da concentração de selênio no plasma e no eritrócito dos grupos *Brazil nut* (BN) e Controle (CO) antes (T0) e após (T1) o período da intervenção.

Variáveis	Grupo BN		$\Delta_{(T1-T0)}$	Grupo CO		$\Delta_{(T1-T0)}$	p-valor
	T0	T1		T0	T1		
Se plasma ($\mu\text{g/L}$)*	87 (82-98)	244 (226-278)	157,1	65 (61-71)	63 (60-67)	-2,5	<0,001
Se eritrócito ($\mu\text{g/L}$)**	125 (122-143)	351 (309-480)	225,9	125 (119-141)	130 (115-145)	4,7	<0,001

Legenda: BN= *Brazil nut*; CO= Controle; Se= selênio. *Grupo BN: n=26 e Grupo CO: n=23; **Grupo BN: n=28 e Grupo CO: n= 25. Valores apresentados em mediana e intervalo interquartilico entre parênteses. $\Delta_{(T1 - T0)}$ representa a variação média dos parâmetros avaliados após a intervenção. p-valor calculado pela análise de variância para medidas repetidas: avaliação do efeito tempo e intervenção (ANOVA *repeated measures*).

De acordo com os dados obtidos, o grupo BN apresentou concentrações significativamente maiores de Se no plasma e no eritrócito quando comparado com o grupo CO após o período da intervenção. Estes resultados são indicativos da boa adesão das participantes ao protocolo experimental e que o Se presente na castanha-do-brasil é de alta biodisponibilidade.

A **figura 13** mostra a distribuição das participantes de acordo com o grupo de estudo, o tempo de avaliação e a faixa com os valores de referência adotados.



Legenda: BN= *Brazil nut*; CO= Controle; Se= selênio. Valores apresentados em mediana e intervalo interquartilico entre parênteses. Valores de referência: Se plasmático= 60 a 120 $\mu\text{g/L}$; Se eritrocitário= 90 a 190 $\mu\text{g/L}$ (Van Dael e Deelstra, 1993).

Figura 13. Gráfico da distribuição das participantes de acordo com as concentrações plasmática (A) e eritrocitária (B) de Se, os grupos de estudo, os tempos de avaliação (T0 e T1) e os valores de referência adotados.

Conforme observado, tanto o grupo BN como o grupo CO apresentaram valores de concentrações plasmática e eritrocitária de Se dentro da faixa de normalidade no início do estudo (T0). Após o período da intervenção (T1), o consumo da castanha-do-brasil resultou em aumento significativo da concentração de Se nos dois compartimentos avaliados e de acordo com a referência, os valores estavam acima daqueles considerados como adequados. Para o grupo CO nenhuma alteração foi observada.

A avaliação do estado nutricional relativo ao Se de indivíduos obesos é pouco explorada e os resultados disponíveis ainda são controversos. Estudos

transversais e de caso-controle verificaram baixas concentrações de Se no plasma/soro ou ainda nos eritrócitos. No caso dos estudos de caso-controle, indivíduos obesos apresentam concentrações séricas de Se reduzidas quando comparado com o grupo controle saudável (KIMMONS *et al.*, 2006; ALASFAR *et al.*, 2011; COMINETTI *et al.*, 2012). Por outro lado, Yerlikaya *et al.* (2013) ao comparar as concentrações séricas de Se de mulheres obesas e eutróficas não observou diferença entre os grupos. Sánchez *et al.* (2010) também não encontraram diferenças entre as concentrações plasmáticas de Se e as variáveis antropométricas IMC, porcentagem de gordura corporal e circunferência da cintura. Corroborando com os dois últimos dados citados, os resultados deste estudo mostram que as mulheres obesas não encontravam-se deficientes em Se na fase inicial do estudo (T0) de acordo com os valores de referência adotados e propostos por Vandael e Deelstra (1993).

Conforme mencionado anteriormente, os estudos que avaliaram o *status* de Se em indivíduos obesos após o consumo da castanha-do-brasil são escassos na literatura. O estudo de Cominetti e colaboradores (2012) que foi realizado com mulheres obesas mórbidas mostrou que o consumo diário da castanha-do-brasil (290µg/Se) por 60 dias aumentou significativamente as concentrações plasmáticas e eritrocitárias de Se, bem como a atividade da enzima GPx nos eritrócitos. O consumo de 15-25 g/dia de castanha-do-brasil durante 16 semanas por adolescentes obesas também foi eficaz na melhora das concentrações séricas de Se (MARANHÃO *et al.*, 2011). Os resultados dos efeitos desta intervenção observados no presente trabalho estão de acordo com os estudos citados anteriormente.

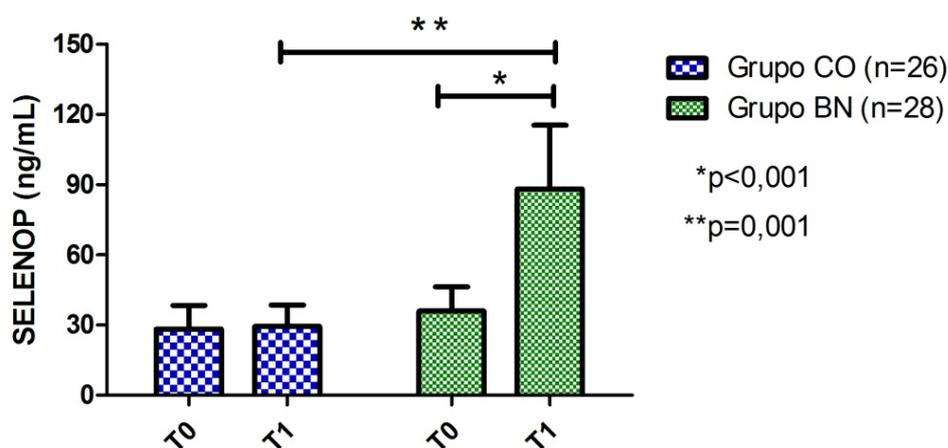
O Se pode ser armazenado em diferentes órgãos como fígado, rins, pâncreas e nos músculos esquelético e cardíaco. Devido ao fato deste micronutriente ser incorporado às proteínas de forma não específica, a ingestão de alimentos que apresentam em sua composição o Se predominantemente na forma de selenometionina (como a castanha-do-brasil), favorecem a ocorrência de maior acúmulo tecidual desse mineral quando comparado com a ingestão do Se nas formas inorgânicas (COMBS, 2015).

Nesse sentido, estudos recentes apontam que altas concentrações de Se podem acarretar efeitos adversos à saúde. Lu *et al.* (2016), por exemplo, observou

que altas concentrações de Se ($>104,5\mu\text{g/L}$) estavam relacionadas com o aumento da glicemia e das concentrações de insulina e triacilgliceróis resultando em um aumento do risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2. Em uma população de chineses verificou-se que concentrações plasmáticas de Se maiores que $176\mu\text{g/L}$ foram associadas ao aumento da glicemia de jejum e do risco de síndrome metabólica (YUAN *et al.*, 2015). Estudo conduzido em uma população de adultos britânicos verificou que altas concentrações de Se no plasma podem causar alterações no perfil lipídico destes indivíduos a partir do aumento das concentrações do colesterol total e do colesterol não-HDL (STRANGES *et al.*, 2010). No entanto, Burk *et al.* (2006) ao avaliar os efeitos da suplementação com diferentes formas químicas de Se, não observou efeitos adversos em indivíduos que ingeriram $>800\mu\text{g/dia}$ por um período de 16 semanas.

Em virtude do aumento significativo das concentrações plasmáticas e eritrocitárias de Se nas participantes deste estudo após a ingestão da castanha-do-brasil contendo alta concentração deste mineral, e ainda, considerando que estas que não apresentavam deficiência em Se, acredita-se que o consumo diário desta noz por períodos prolongados possa não ser recomendado.

Em relação à avaliação da SELENOP, o grupo BN apresentou um aumento significativo das concentrações plasmáticas comparado ao grupo controle ($\Delta_{T1-T0}=48,31$) ($\Delta_{T1-T0}=-0,73$) ($p<0,001$) após os dois meses de intervenção (**Gráfico 2**).



Legenda: BN= *Brazil nut*; CO= Controle, n= numero de participantes; SELENOP= Selenoproteína P. Valores apresentados em mediana e intervalo interquartilico entre parênteses. *p-valor calculado pelo teste de Wilcoxon.**p-valor calculado pela análise de variância para medidas repetidas: avaliação do efeito tempo e intervenção (ANOVA *repeated measures*).

Gráfico 2. Concentração plasmática de SELENOP nos grupos *Brazil nut* (BN) e Controle (CO) antes (T0) e após (T1) a intervenção.

A SELENOP é uma glicoproteína plasmática, produzida e secretada pelo fígado a qual atua como transportador primário de Se para os tecidos periféricos. É utilizada como um biomarcador do *status* de Se visto que suas concentrações tendem a reduzir conforme a deficiência é agravada. Uma vez que a ingestão de Se é adequada, a biossíntese desta selenoproteína é saturada e torna-se independente da ingestão alimentar (BURK, HILL, 2009; XIA *et al.*, 2010; COMBS, 2015).

Até o momento, apenas um estudo avaliou o efeito do consumo da castanha-do-brasil nas concentrações plasmáticas de SELENOP. O consumo diário de 1 nóz (300µg/Se) por indivíduos saudáveis durante 8 semanas foi suficiente para aumentar as concentrações plasmáticas de SELENOP, assim como o observado neste estudo (DONADIO, *et al.*, 2017).

Chen *et al.* (2017) encontraram correlações positivas entre as concentrações plasmáticas de SELENOP e o IMC mesmo após os ajustes por idade e gênero. Neste mesmo estudo, observou-se que indivíduos obesos apresentam concentrações plasmáticas de SELENOP maiores do que os indivíduos com sobrepeso e eutróficos ($p < 0,001$). Yang *et al.* (2011) mostraram um aumento das concentrações plasmáticas de SELENOP em indivíduos diagnosticados com diabetes do tipo 2 e pré-diabetes em relação àqueles os normoglicêmicos. Além disso, constatou ainda que destes participantes, os indivíduos obesos possuíam maiores concentrações de SELENOP do que os eutróficos.

Neste estudo, apesar do aumento das concentrações plasmáticas de SELENOP após o consumo da castanha-do-brasil, verificou-se correlação positiva moderada entre este biomarcador e as variáveis de peso ($r=0,467$; $p=0,021$) e de percentagem de gordura corporal ($r=0,494$; $p=0,017$) no T0 do grupo BN. Não foi observada correlação entre a SELENOP e o IMC nos grupos de estudo.

Como não há um valor de referência estabelecido para a SELENOP, no caso deste estudo não foi possível avaliar se as participantes apresentavam concentrações consideradas adequadas ou não em relação a este biomarcador. O conteúdo de Se no plasma consiste tanto na incorporação deste elemento de forma específica (SELENOP e GPx3) e não específica (albumina) a várias proteínas (COMBS, 2015). Nesse sentido, é importante considerar que estes dados seguem a mesma tendência da concentração de Se no plasma como um todo, ou seja,

aumento das concentrações destes biomarcadores mediante a um aumento da ingestão de Se por meio do consumo da castanha-do-brasil.

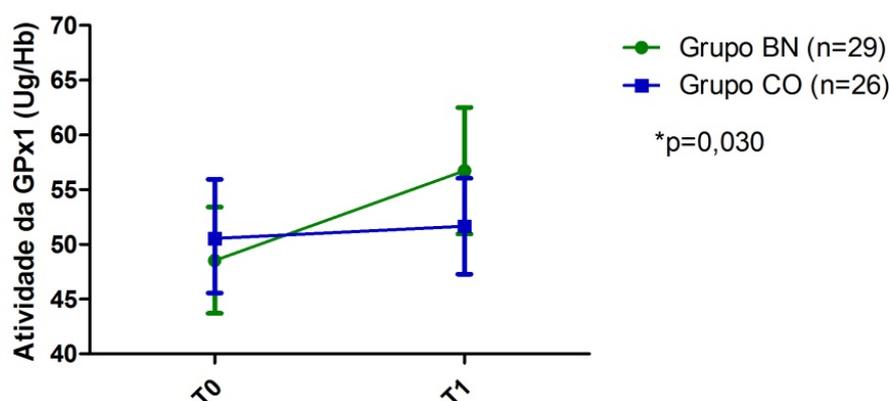
Mais especificamente, o papel da SELENOP na obesidade ainda não é esclarecido, mas alguns mecanismos estão sendo elucidados. Um estudo utilizando dois modelos experimentais encontrou uma redução na expressão gênica de SELENOP1 no tecido adiposo de ratos obesos *ob/ob* induzidos com uma ração rica em lipídeos e também em células adiposas primárias isoladas de ratos obesos Zucker. Células 3T3-L1 tratadas com TNF- α e H₂O₂ reduziram significativamente a expressão gênica de SELENOP1 de uma maneira dose e tempo dependente. Além disso, o silenciamento do gene da SELENOP1 resultou em uma diminuição da atividade da GPx e um aumento da regulação das citocinas pró-inflamatórias MCP-1 e IL-6 nos pré-adipócitos ocasionando uma inibição da adipogênese. Este estudo sugere que a SELENOP exerce um papel na diferenciação de adipócitos por meio da modulação do estresse oxidativo e da resposta inflamatória (ZHANG, CHEN, 2011).

A utilização de mais de um biomarcador para avaliação do estado nutricional de indivíduos relativo ao Se é importante para que a interpretação desta avaliação seja feita de forma mais ampla e criteriosa, e ainda para que seja possível verificar os efeitos de uma intervenção nutricional em determinadas condições de saúde ou de doença.

6.3.3. Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo

Os parâmetros utilizados para avaliação do estresse oxidativo das participantes deste estudo foram a atividade eritrocitária da GPx1 e a razão GSH:GSSG.

Após o período da intervenção, a atividade eritrocitária da GPx1 foi significativamente maior no grupo que consumiu a castanha-do-brasil ($\Delta_{T1-T0} = 9,29$) comparado ao grupo sem a intervenção ($\Delta_{T1-T0} = 1,57$) ($p=0,030$) (**Gráfico 3**).



Legenda: BN= *Brazil nut*; CO= Controle; n=numero de participantes; GPx1= glutaciona peroxidase 1. Valores apresentados em mediana e intervalo interquartilico entre parênteses. *p-valor calculado pela análise de variância para medidas repetidas: avaliação do efeito tempo e intervenção (ANOVA *repeated measures*).

Gráfico 3. Atividade eritrocitária da GPX1 nos grupos *Brazil nut* (BN) e Controle (CO) antes (T0) e após (T1) a intervenção.

A variação das concentrações plasmáticas de GSH e GSSG durante o período da intervenção foi significativa, sendo que para o grupo BN verificou-se uma redução destes biomarcadores. Entretanto, ao avaliar a razão GSH:GSSG observou-se que não houve efeito do tempo e da intervenção neste parâmetro conforme demonstrado na **tabela 8**.

Tabela 8. Concentração plasmática da glutaciona reduzida (GSH), glutaciona oxidada (GSSG) e determinação da razão GSH:GSSG dos grupos *Brazil nut* (BN) e Controle (CO).

Variáveis	Grupo BN (n=25)			Grupo CO (n=23)			p-valor
	T0	T1	$\Delta_{(T1-T0)}$	T0	T1	$\Delta_{(T1-T0)}$	
GSSG (μM)	1,3 (0,9-1,7)	1,0 (0,8-1,2)	-0,30	0,7 (0,6-0,7)	1,3 (1,1-1,5)	0,60	<0,001
GSH (μM)	3,1 (2,5-3,7)	3,0 (2,4-3,5)	-0,10	1,7 (1,2-2,1)	2,7 (2,0-3,4)	1,00	0,027
GSH:GSSG	3,2 (2,3-4,1)	3,3 (2,7-4,0)	0,10	2,8 (2,0-3,6)	1,9 (1,4-2,4)	-0,90	0,151

Legenda: BN= *Brazil nut*; CO= controle; n=numero de participantes; GSSG= glutaciona oxidada; GSH= glutaciona reduzida. Valores apresentados em média geométrica e intervalo de confiança e 95% entre parênteses. $\Delta_{(T1 - T0)}$ representa a variação média dos parâmetros avaliados após a intervenção. *p-valor calculado pela análise de variância para medidas repetidas: avaliação do efeito tempo e intervenção (ANOVA *repeated measures*).

A GPx1, ou também denominada de GPx clássica, é uma selenoproteína cujo Se é componente essencial, encontrada em grande quantidade nos mamíferos e presente no citosol das células. Esta enzima é utilizada como biomarcador do

status de Se, principalmente diante de um quadro de deficiência do mineral, por ser sensível às alterações de Se da dieta (COMBS, 2015).

Ao utilizar os valores de referência propostos pelo kit de avaliação, que varia de 27,5 a 73,6 U/gHb, tanto as participantes de grupo BN como do grupo CO não apresentaram uma baixa atividade enzimática nos dois tempos de avaliação do estudo. No entanto, o aumento significativo da atividade da GPx1 nas participantes do grupo BN foi dependente do aumento da quantidade de Se ingerida, assim como observado em outros estudos que utilizaram a castanha-do-brasil como fonte alimentar deste micronutriente (COMINETTI *et al.*, 2012; STOCKLER-PINTO *et al.*, 2014; CARDOSO, *et al.*, 2016; DONADIO, *et al.*, 2017). O resultado desta avaliação vai ao encontro do observado para o Se no eritrócito, demonstrado anteriormente, mesmo não havendo correlação significativa entre estes dois parâmetros. O estudo realizado por Thomson *et al.* (2008) observou aumento significativo na atividade da GPx no sangue total nos adultos saudáveis que consumiram a castanha-do-brasil comparado com o grupo que ingeriu apenas selenometionina e o grupo placebo. Estes resultados suportam as evidências de que o Se presente neste alimento é altamente biodisponível.

Em termos de funcionalidade, esta selenoproteína atua como antioxidante reduzindo H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos livres e transformando-os em água e álcool, respectivamente. Este processo ocorre a partir do metabolismo da glutathiona, um dos mecanismos de defesa mais importantes do sistema biológico. De forma sucinta, este ciclo catalítico ocorre em função da regeneração da GSH que precisa ser oxidada a GSSG para manter a sua atividade de redução de espécies reativas. Desse modo, uma molécula de H_2O_2 é reduzida a duas moléculas de água, enquanto duas moléculas de GSH são oxidadas a GSSG em uma reação catalisada pela GPx. A glutathiona redutase, por sua vez, é responsável pela regeneração de GSH a partir da GSSG na presença de NADPH (HUBER *et al.*, 2008; LUBOS *et al.*, 2011).

O papel da GSH no tecido adiposo e na obesidade ainda não são claros. Estudos realizados em animais mostram que há uma redução da atividade da GPx celular e um aumento do conteúdo de GSH no tecido adiposo de camundongos *ob/ob*. Dados provenientes de estudos *in vitro* mostram ainda que a quantidade de GSH e a razão GSH:GSSG em adipócitos podem ser regulados por um complexo

dependente de um tipo celular ou por fatores circulantes. Dessa forma, sugere-se que o metabolismo da GSH é regulado não apenas de forma compensatória pelo estresse oxidativo, mas também pelo estado fisiológico (KOBAYASHI *et al.*, 2009). Não foram encontrados dados na literatura a respeito dos efeitos do consumo da castanha-do-brasil ou da suplementação com Se nas concentrações de GSH, GSSH e na razão GSH:GSSH.

A atividade da GPx atinge um platô diante da alta ingestão de Se e este fato pode ter implicações diretas no metabolismo da glutatona. Diante de uma atividade enzimática da GPx considerada normal, o processo de oxidação da GSH em GSSH pode ocorrer de forma menos intensa indicando uma menor necessidade de ativação dessa via antioxidante. Além disso, é importante considerar que outras selenoproteínas também exercem função antioxidante e podem contribuir para o equilíbrio e manutenção do estado redox sistêmico.

6.3.4. Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Em relação à avaliação bioquímica, na **tabela 9** encontram-se os resultados das dosagens de glicose, de insulina, do colesterol sérico e frações, das enzimas hepáticas e de albumina, antes e após dois meses (T0 e T1) da intervenção nos grupos de estudo. A partir dos valores de insulina e glicemia foram realizados os cálculos dos índices HOMA-IR e HOMA-BETA para avaliação da resistência à insulina nos dois grupos (**Figura 13**).

Observou-se que entre os parâmetros avaliados, apenas as concentrações séricas de glicose e colesterol total apresentaram variação significativa ($p=0,042$; $p=0,022$; respectivamente) durante o período da intervenção. Nos dois casos, a variação do Δ foi menor no grupo que consumiu a castanha-do-brasil quando comparado com o grupo controle.

Tabela 9. Variação das concentrações séricas de glicemia, insulina, colesterol total e frações, AST, ALT, Gama-GT e albumina das participantes dos grupos *Brazil nut* e Controle(CO) antes (T0) e após (T1) a intervenção.

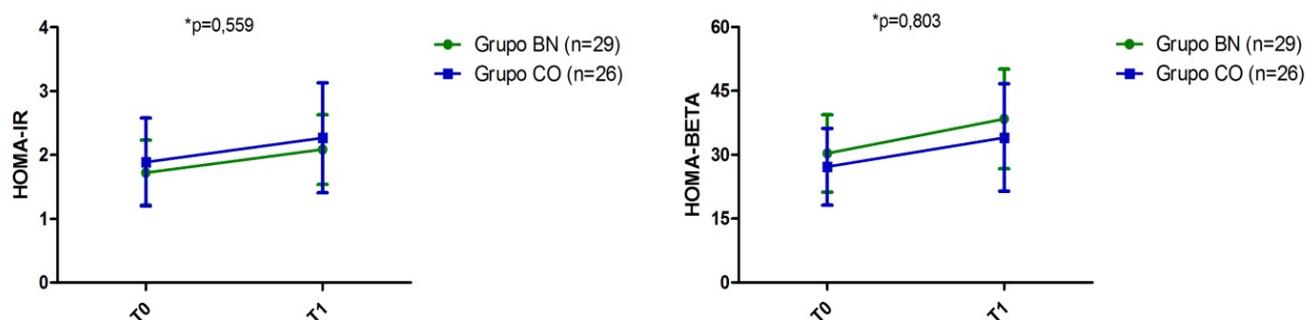
Variáveis	Grupo BN (n=29)		$\Delta_{(T1-T0)}$	Grupo CO (n=26)		$\Delta_{(T1-T0)}$	p-valor
	T0	T1		T0	T1		
Glicemia (mg/dL)	94,0 (83,8-104,2)	91,5 (82,3-100,7)	-2,50	82,0 (75,9-88,0)	94,0 (85,7-102,4)	12,00	0,042
Insulina (μ U/mL)	7,1 (5,3-8,9)	8,8 (6,7-10,9)	1,69	6,8 (4,5-9,1)	9,0 (5,7-12,3)	2,16	0,696
Colesterol total (mg/dL)	177,6 (162,9-192,3)	182,0 (167,0-197,0)	4,40	188,4 (175,2-201,6)	213,8 (199,5-228,2)	25,40	0,022
LDL-c (mg/dL)	116,0 (103,8-128,3)	111,6 (100,9-122,4)	-4,40	123,6 (112,1-134,9)	128,0 (117,6-138,4)	4,40	0,266
HDL-c (mg/dL)	52,8 (48,5-56,9)	51,3 (46,7-56,0)	-1,50	48,3 (43,8-52,9)	47,9 (44,2-51,5)	-0,40	0,769
Colesterol não-HDL (mg/dL)	124,9 (111,6-138,2)	130,0 (115,4-146,0)	5,10	140,0 (126,2-153,9)	160,0 (145,8-174,9)	20,00	0,098
Triglicérides (mg/dL)	109,9 (85,2-134,5) [‡]	121,5 (87,1-156,0) [‡]	11,60	108,2 (81,2-135,2)	135,5 (107,0-164,0)	27,30	0,286
AST (mg/dL)	26,0 (21,7-30,3)	23,5 (20,1-26,9)	-2,50	22,9 (20,6-25,2)	23,8 (21,1-26,6)	0,90	0,087
ALT (mg/dL)	22,6 (16,0-29,3)	22,5 (17,3-27,7)	-0,10	20,5 (16,6-24,4)	22,0 (17,0-27,1)	1,50	0,382
Bilirrubina D (mg/dL)	0,30 (0,26-0,33)	0,30 (0,27-0,35)	0,00	0,33 (0,29-0,37)	0,32 (0,29-0,36)	-0,01	0,324
Bilirrubina T (mg/dL)	0,55 (0,45-0,65)	0,60 (0,50-0,71)	0,05	0,67 (0,58-0,75)	0,64 (0,54-0,74)	-0,03	0,136
Gama GT (mg/dL)	35,0 (26,1-43,7)	32,7 (23,2-42,1)	-2,30	37,3 (27,3-47,3)	34,5 (24,5-44,5)	-2,80	0,972
Albumina (mg/dL)	4,4 (4,3-4,4)	4,3 (4,2-4,4)	-0,10	4,4 (4,3-4,5)	4,2 (4,1-4,3)	-0,20	0,079

Legenda: BN= *Brazil nut*; CO= controle; n=numero de participantes, ALT= alanina aminotransferase; AST= aspartato transaminase; GAMA-GT= *gama glutamil transferase*.

Valores apresentados em média geométrica e intervalo de confiança de 95% entre parênteses. $\Delta_{(T1 - T0)}$ representa a variação média dos parâmetros avaliados após a intervenção.

p-valor calculado pela análise de variância para medidas repetidas: avaliação do efeito tempo e intervenção (ANOVA *repeated measures*). [‡] n= 28 (após a exclusão de *outlier*).

Valores de Referência: Glicemia (< 100mg/dL) (**Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes**). Colesterol total (\leq 190 mg/dL); LDL-c (\leq 130 mg/dL); HDL-c (\geq 40 mg/dL); Triglicérides (<150mg/dL); Colesterol não-HDL (\leq 160mg/dL). (**Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017**).



Legenda: BN= *Brazil nut*; CO= Controle; n= número de participantes. Valores apresentados em média geométrica e intervalo de confiança de 95%. *p-valor calculado pela análise de variância para medidas repetidas: avaliação do efeito tempo e intervenção (ANOVA *repeated measures*).

Figura 14. Gráficos da avaliação dos índices HOMA-IR e HOMA-BETA antes (T0) e após (T1) a intervenção nos grupos *Brazil nut* (BN) e Controle (CO).

No caso da glicemia, apesar da variação ter sido significativa, os valores obtidos antes e após o período da intervenção dos dois grupos de estudo encontram-se dentro da faixa de normalidade segundo o valor de referência (<100 mg/dia) estabelecido pela Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD). Para o colesterol total, o grupo que recebeu a castanha-do-brasil os valores observados (antes e após a intervenção) são considerados desejáveis (≤ 190 mg/dL) segundo as novas diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC, 2017). Já o grupo CO, apresentou valores acima da referência na avaliação após os 2 meses. Neste último caso, investigou-se as possíveis causas destes resultados por meio da análise do consumo alimentar, do método analítico utilizado e nenhuma relação foi encontrada.

A relação entre o Se e o perfil lipídico ainda não foi totalmente esclarecida pois os estudos ainda são controversos em virtude de diversos fatores que envolvem o *status* de Se como o tempo e o tipo de intervenção utilizada, e a população estudada.

Um estudo realizado com 1159 adultos do estudo NHANES 2003-2004 verificou que altas concentrações séricas de Se foram associadas a um aumento do colesterol total e de LDL-c. Nos indivíduos que apresentaram baixas concentrações de Se sérico observou-se uma associação apenas com a HDL-c (LACLAUSTRA *et al.*, 2010). Outro estudo realizado em uma população adulta da Espanha observou que altas concentrações de Se foram positivamente relacionadas com o aumento do colesterol total e de LDL-c (GONZALEZ-ESTECHA *et al.*, 2017). No presente estudo, ao avaliarmos todas as

participantes (n=55) no *baseline* (T0) observamos uma correlação moderada entre as concentrações plasmáticas de Se e a concentração sérica de HDL-c ($r=0,310$; $p=0,022$). Entretanto, após a intervenção esta correlação não foi significativa.

Alguns estudos que avaliaram o efeito da suplementação de Se no perfil lipídico encontraram resultados divergentes. Jamilian et. al. (2015) avaliaram o efeito da suplementação de Se ($200\mu\text{/dia}$) no formato de tabletes por 8 semanas no perfil lipídico de mulheres diagnosticadas com síndrome do ovário policístico. Após o período da intervenção, observou-se redução das concentrações séricas de triacilgliceróis e de VLDL-c. Em outro trabalho realizado com pacientes que apresentavam nefropatia diabética e receberam suplementação de Se em cápsula ($200\ \mu\text{g/Se}$) por 12 semanas, não houve alterações no perfil lipídico (BAHMANI, et al., 2016).

Poucos estudos avaliaram os efeitos do consumo da castanha-do-brasil no perfil lipídico. No estudo realizado por Cominetti e colaboradores (2012) realizado com mulheres obesas mórbidas, o consumo de uma noz de castanha-do-brasil ($290\ \mu\text{g/Se}$) por dois meses foi capaz de melhorar as concentrações séricas de HDL-c e os índices de Castelli I e II, que avaliam o risco cardiovascular. Maranhão e colaboradores (2011) observaram efeitos positivos nas concentrações de colesterol total e LDL-c após consumo da castanha ($108,5\ \mu\text{g/Se}$) por adolescentes do sexo feminino. Pacientes com hipercolesterolemia, após o consumo de farinha de castanha-do-brasil parcialmente desengordurada ($13\text{g/dia} - 227,5\ \mu\text{gSe/dia}$) por 90 dias apresentaram uma redução na concentração plasmática de colesterol total e do colesterol não-HDL comparado ao grupo que recebeu o placebo (CARVALHO et.al., 2015).

Em contrapartida, o consumo de $45\ \text{g/dia}$ ($862,6\ \mu\text{gSe}$) de castanha-do-brasil por indivíduos saudáveis durante um período de 15 dias não alterou as concentrações plasmáticas de colesterol total, HDL-c, LDL-c e triacilglicerol (STRUNZ et al., 2008). Este resultado corrobora com os encontrados no estudo em tela, na qual a alta ingestão de Se proveniente da castanha-do-brasil ($409,4\ \mu\text{gSe}$) não alterou o perfil lipídico.

6.3.5. Avaliação do biomarcadores inflamatórios

O efeito do consumo da castanha-do-brasil na inflamação foi avaliado por meio da determinação dos seguintes biomarcadores circulantes: PCR, MCP-1, fibrinogênio, leptina, e interleucinas pró e anti-inflamatórias (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, TNF- α e INF- γ).

Na **tabela 10** estão apresentados os resultados da concentração plasmática destes biomarcadores. Observou-se que não houve mudanças significativas nas concentrações destes parâmetros nos grupos durante as 8 semanas de intervenção.

Tabela 10. Avaliação das concentrações plasmáticas dos biomarcadores inflamatórios das participantes dos grupos *Brazil nut* (BN) e Controle(CO) antes (T0) e após (T1) o período da intervenção.

Variáveis	Grupo BN (n=29)			Grupo CO (n=26)			p-valor
	T0	T1	Δ (T1-T0)	T0	T1	Δ (T1-T0)	
PCR (mg/dL)	2,3 (1,1-3,5)	2,1 (1,4-2,8)	-0,14	1,8 (0,7-3,0)	2,0 (1,0-2,9)	0,14	0,585
Leptina (ng/mL)	44,5 (37,2-51,8)	62,3 (20,4-104,2)	17,78	31,8 (26,9-36,6)	33,1 (28,1-38,1)	1,33	0,424
Fibrinogênio (g/L)	1,5 (1,5-1,6)	1,5 (1,5-1,6)	0,03	1,5 (1,4-1,6)	1,5 (1,5-1,6)	-0,06	0,409
LPS (ng/mL)	0,49 (0,40-0,60)	0,45 (0,40-0,50)	-0,05	0,35 (0,28-0,43)	0,37 (0,28-0,46)	0,01	0,387
MCP-1 (pg/mL)	266,4 (229,0-303,9)	296,0 (240,7-351,3)	29,6	296,2 (228,6-363,9)	319,7 (256,2-383,1)	23,5	0,808
IL-10 (pg/mL)	3,6 (2,6-4,7)	4,0 (2,6-5,4)	0,40	3,0 (1,7-4,3)	3,0 (2,0-3,9)	0,00	0,124
IL-13 (pg/mL)	20,6 (1,2-40,0)	16,1 (1,9-30,2)	-4,50	6,3 (2,1-10,5)	7,9 (2,1-13,7)	1,60	0,250
IL-2 (pg/mL)	2,2 (1,2-3,1)	2,3 (1,5-3,1)	0,10	2,0 (1,6-2,5)	2,1 (1,6-2,7)	0,10	0,790
IL-6 (pg/mL)	2,4 (1,7-3,0)	2,7 (1,8-3,5)	0,30	2,7 (1,8-3,6)	2,9 (2,0-3,8)	0,20	0,349
IL-1 β (pg/mL)	2,5 (1,3-3,8)	2,4 (1,3-3,5)	0,10	1,5 (1,0-2,0)	1,6 (1,0-2,1)	0,10	0,808
TNF- α (pg/mL)	2,1 (1,6-2,7)	2,4 (1,7-3,0)	0,30	2,1 (1,6-2,5)	2,2 (1,6-2,8)	0,10	0,773
IFN- γ (pg/mL)	11,4 (9,6-13,2)	11,5 (9,3-13,7)	0,10	11,0 (8,9-13,1)	11,0 (9,0-12,9)	0,00	0,489

Legenda: BN= *Brazil nut*; CO= controle; n=numero de participantes; PCR= *proteína C reativa*; LPS= lipopolissacarídeo; MCP-1= *proteína quimiotática para monócitos 1*; IL= *interleucina*; TNF- α = fator de necrose tumoral alfa; IFN- γ = *interferon gama*.

Valores apresentados em média geométrica e intervalo de confiança de 95% entre parênteses. Δ (T1 - T0) representa a variação média dos parâmetros avaliados após a intervenção. p-valor calculado pela análise de variância para medidas repetidas: avaliação do efeito tempo e intervenção (ANOVA *repeated measures*).

Evidências do efeito do consumo da castanha-do-brasil nos biomarcadores inflamatórios em diferentes populações mostram resultados divergentes. De maneira oposta aos resultados observados neste trabalho, o consumo de diferentes quantidades de castanha-do-brasil (0, 5, 20 e 50g) por adultos saudáveis avaliado em diferentes tempos (1h, 3h, 6h, 9h, 24, 48h, 5 dias e 30 dias) alterou a concentração de alguns biomarcadores inflamatórios. As concentrações de IL-1, IL-6, TNF- α , INF- γ foram reduzidas e a de IL-10 aumentadas com o consumo de 20 ou 50g de castanha (COLPO *et al.*, 2014). Pires (2012), ao suplementar indivíduos diabéticos do tipo 1 com idade entre 10 e 25 anos com 1 castanha-do-brasil por 60 dias observou diferença apenas nas concentrações séricas de IL-6. Já os valores de fibrinogênio, PCR e TNF- α não foram alterados. Semelhantemente ao que observamos nas mulheres obesas, Callou (2014), também não observou diferença nas concentrações séricas de IL-6, IL-2, IL-10, PCR, TNF- α , IL-1 β após dois meses de suplementação com a castanha-do-brasil em mulheres diagnosticadas com artrite reumatóide.

Considerando o teor de Se presente nas castanhas utilizadas neste estudo, buscou-se avaliar correlações entre os marcadores de avaliação do *status* de Se e os biomarcadores inflamatórios avaliados acima. No *baseline* do estudo (T0) (n=55) observou-se uma correlação negativa significativa entre as concentrações plasmáticas de SELENOP e os seguintes marcadores inflamatórios: IL-2 (r= -0,373; p=0,011), IL-6 (r= -0,333; p=0,024) e TNF- α (r= -0,305; p=0,040). Após a intervenção com a castanha-do-brasil (T1), correlações negativas significativas foram encontradas entre o Se plasmático e as concentrações plasmáticas de IL-6 (r= -0,679; p<0,001) e IFN- γ (r= -0,621; p=0,001).

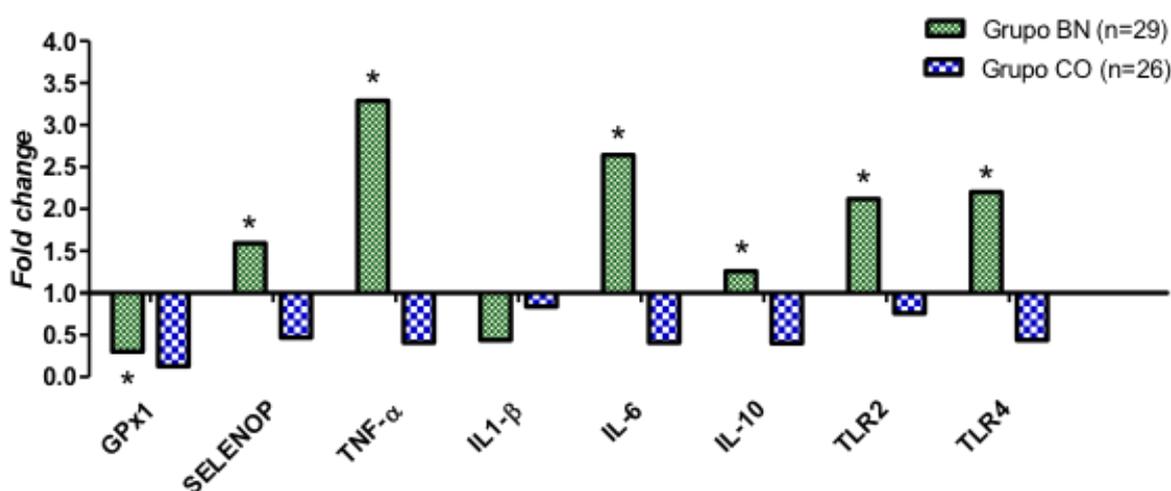
Nesta perspectiva, o potencial papel anti-inflamatório do Se como tem sido alvo de investigações, mas ainda é um assunto que necessita ser mais explorado e melhor esclarecido. No contexto da obesidade, não foram encontrados estudos que avaliaram a relação entre o *status* de Se e biomarcadores inflamatórios.

No entanto, Asemi *et. al.* (2015) observou que a suplementação com 200 μ g de Se na forma de tablete reduziu de forma significativa as concentrações séricas de PCR em mulheres com diabetes melitos gestacional. Já em pacientes

diagnosticados com nefropatia diabética e em tratamento hemodialítico, a suplementação por meio de cápsulas contendo 200µg durante 3 meses não foi suficiente para alterar as concentrações de PCR (OMRANI *et al.*, 2015).

A avaliação da expressão gênica foi realizada em PBMC visto que estas células refletem a regulação hepática do metabolismo do colesterol e podem migrar através da circulação sanguínea e se infiltrar em uma variedade de tecidos como o endotélio e o tecido adiposo. Desse modo, as PBMC podem não só refletir as respostas imunes e metabólicas dos adipócitos e hepatócitos, mas também de respostas a intervenções dietética e medicamentosa a nível de expressão gênica (DE MELLO *et al.*, 2012)

O **gráfico 4** mostra os resultados em *fold change* dos mRNAs dos genes analisados, considerando a variação da expressão após o período da intervenção.



Legenda: BN= *Brazil nut*; CO= controle; n=numero de participantes; GPx1= glutathione peroxidase 1; SELENOP= Selenoproteína P; TNF-α= fator de necrose tumoral alfa; IL= interleucina; TLR2= *Toll like receptor 2*; TR4= *Toll like receptor 4*. *p<0,05 (Teste de Mann-Whitney).

Gráfico 4. *Fold change* dos genes (comparação do pós-intervenção com o *baseline*) da GPx1, SELENOP, TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10, TLR2 e TLR4.

Dos genes avaliados, apenas a IL-1β não apresentou diferença significativa entre os grupos. Em relação aos demais genes, observou-se um aumento significativo da expressão gênica, exceto para a GPx1, no grupo que consumiu a castanha-do-brasil quando comparado com o grupo controle.

Em relação às selenoproteínas avaliadas, a intervenção com a castanha-do-brasil resultou na diminuição da expressão da GPx1 e no aumento significativo da expressão da SELENOP1. Estudos já demonstraram que o consumo da castanha-do-brasil é capaz de modular a expressão gênica de selenoproteínas. Em indivíduos saudáveis, por exemplo, o consumo de 1 unidade de castanha-do-brasil (~300 a 400 µg/Se) por 8 semanas aumentou a expressão gênica da GPx1 no sangue total. No entanto, para a SELENOP1, não houve alterações na expressão do mRNA após a intervenção (DONADIO, *et al.*, 2017). Pacientes diagnosticados com declínio cognitivo leve, após 6 meses de consumo da castanha-do-brasil (288 µg/Se), também tiveram um aumento da expressão da GPx1 no sangue total (CARDOSO *et al.*, 2016). Por outro lado, a suplementação desta noz (~280 µg/Se) em pacientes diabéticos do tipo 1 não foi suficiente para alterar a expressão da GPx1 (PIRES, 2012). Estudos realizados no contexto da obesidade não foram encontrados. Os resultados controversos podem ser atribuídos não só às diferentes populações estudadas, mas também à análise em si que foi realizada em diferentes compartimentos (sangue total e PBMC).

Sabe-se que a disponibilidade de Se é capaz de modular a expressão de selenoproteínas, uma vez que dependendo da ingestão deste mineral, algumas delas são menos expressas enquanto outras se mantêm estáveis. A regulação da expressão gênica das selenoproteínas ocorre a partir de dois princípios: as hierarquias tecidual e de selenoproteínas. A primeira refere-se à resposta tecidual, ou seja, diante de uma situação de deficiência grave a concentração de Se nos tecidos endócrinos e no cérebro são mantidas, enquanto a do plasma e do rim são significativamente reduzidas. O segundo diz respeito à prioridade de selenoproteínas a serem transcritas na deficiência de Se. No caso da família da GPx, por exemplo, a prioridade de incorporação de Se é das GPx-2 e 4 em relação às GPx-1 e 3. No caso da SELENOP, esta encontra-se em posição intermediária (HESKETH, 2008; SCHOMBURG, SCHWEIZER, 2009).

Assim como demonstrado anteriormente, as participantes dos dois grupos de estudo não apresentavam deficiência de Se. Após 2 meses de intervenção, observou-se aumento os biomarcadores de avaliação do *status* de Se no grupo BN, enquanto o grupo CO não teve alterações. Nesse sentido, diante do

aumento da oferta de Se e de um estado nutricional adequado, os resultados da expressão gênica da SELENOP1 e da GPx1 podem ser justificados de acordo com o princípio de hierarquia das selenoproteínas citado anteriormente. Neste caso, sugere-se que grande parte do Se estaria sendo utilizado para síntese de SELENOP1 (principal transportador do mineral para os tecidos), enquanto que a GPx1, já tendo atingido seu platô de atividade enzimática, receberia uma menor quantidade de substrato visto que sua síntese neste caso não é prioridade diante de outras selenoproteínas.

Poucos trabalhos buscaram avaliar os possíveis efeitos do consumo da castanha-do-brasil na modulação da expressão de genes relacionados ao processo inflamatório. Esta abordagem é relevante visto que esta noz apresenta grande quantidade de Se e vários estudos têm demonstrado um papel importante deste micronutriente na resposta imune.

Em contrapartida aos resultados encontrados neste estudo, a intervenção com a castanha-do-brasil não alterou a expressão de genes relacionados à inflamação (COX-2, MCP-1, IL-6 e TNF- α) em pacientes diabéticos do tipo 1 (PIRES, 2012). Já no estudo realizado com pacientes em hemodiálise, a ingestão de castanha-do-brasil (~290 μ g/Se) por 3 meses foi capaz de aumentar a expressão gênica do Nrf2 e reduzir a expressão do NF- κ B em PBMC (CARDOZO et al., 2016). São escassos na literatura os estudos que buscaram avaliar os efeitos do consumo deste alimento no aspecto molecular da resposta inflamatória, principalmente relacionados à obesidade.

Em relação ao Se, vários estudos têm demonstrado que a deficiência deste micronutriente implica em um aumento da inflamação e que a suplementação deste mineral é capaz de atenuar essa resposta. O pré-tratamento de uma linhagem celular de macrófagos U937 com selenometionina (1 μ M) suprimiu a ativação do NF- κ B induzido por LPS por meio do bloqueio da degradação da I κ B α , diminuindo a translocação deste fator de transcrição para o núcleo (SHEN et al., 2015). Em outra linhagem celular de macrófagos deficientes em Se foi observado que a suplementação com selenito de sódio promoveu uma redução da expressão dos genes da COX-2 e TNF- α induzidos por LPS via inibição da via da MAP quinase (VUNTA et al., 2008). Nesse sentido, Jamilian et. al. (2018) ao suplementarem mulheres diagnosticadas com diabetes

gestacional com 200 µg/Se por dia durante 6 semanas observou diminuição na expressão gênica do TNF-α e do TGF-β.

Na literatura já é bastante esclarecido que a deficiência de Se pode implicar em alterações metabólicas, e que a suplementação com este micronutriente promove benefícios à saúde. No entanto, atualmente, pesquisas buscam compreender os possíveis efeitos decorrentes da alta ingestão de Se que, como discutido anteriormente, podem estar relacionados a efeitos adversos à saúde. Até onde temos conhecimento, não existem trabalhos que associam a alta ingestão de Se ao aumento da expressão de genes pró-inflamatórios. Com a finalidade de verificar se existe uma relação entre o Se e a expressão dos genes relacionados à inflamação, foi realizada uma análise de correlação de *Spearman* (**Tabela 11**) entre a variação (Δ) dos biomarcadores do *status* deste micronutriente e os resultados de *fold change* dos genes avaliados.

Tabela 11. Correlação de *Spearman* entre a variação (Δ) dos biomarcadores de avaliação do *status* de selênio e o *fold change* do mRNA dos genes TNF-α, IL1-β, IL-6, IL-10, TLR2 e TLR4.

Gene	Δ Se plasma	Δ Se eritrócito	Δ SELENOP
TNF-α	0,579 (p<0,001)	0,564 (p<0,001)	0,433 (p=0,003)
IL1-β	-0,147 (p=313)	-0,122 (p=0,376)	0,032 (p=0,833)
IL-6	0,625 (p<0,001)	0,647 (p<0,001)	0,636 (p<0,001)
IL-10	0,567 (p<0,001)	0,437 (p=0,001)	0,389 (p=0,008)
TLR2	0,662 (p<0,001)	0,561 (p<0,001)	0,321 (p=0,037)
TLR4	0,753 (p<0,001)	0,698 (p<0,001)	0,421 (p=0,004)

Coeficiente de correlação e p-valor entre parênteses. Δ representa a variação dos parâmetros avaliados (pós-intervenção – *baseline*). As correlações significantes foram apresentadas em negrito.

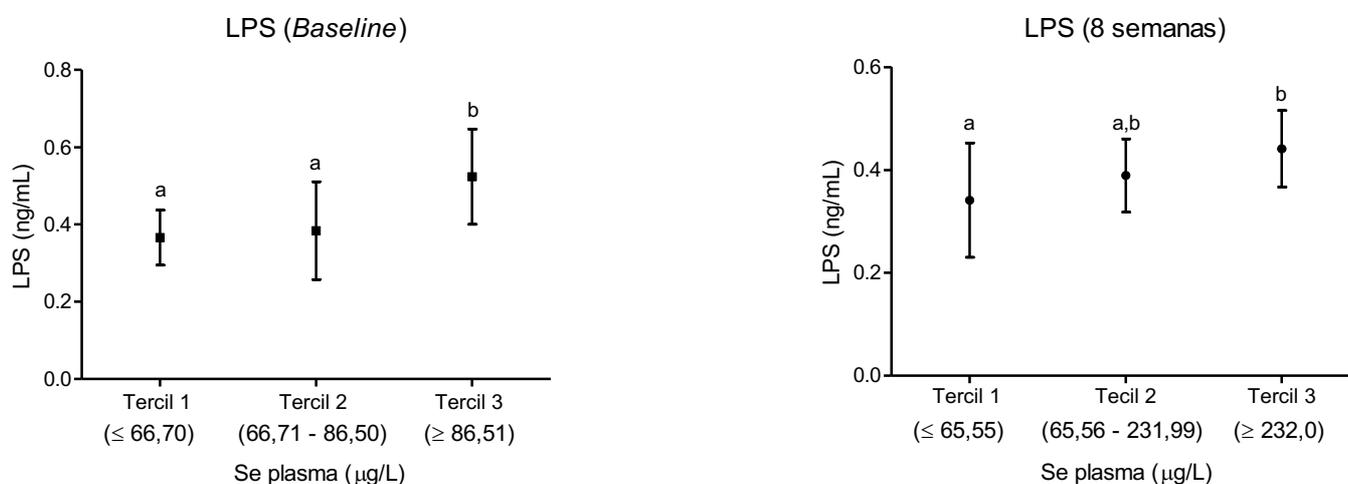
A partir dos resultados obtidos na **tabela 11**, observamos que existe uma relação positiva entre o Se e a expressão gênica dos biomarcadores inflamatórios, exceto para a IL1-β. Estes dados sugerem uma influência importante deste micronutriente na resposta inflamatória.

Neste contexto, um mecanismo de atuação do Se na resposta inflamatória proposto por Duntas et.al. (2009), citado anteriormente, está relacionado com a redução dos níveis de ERO e a translocação do NF-κB para o núcleo. Após a ingestão da castanha-do-brasil com altas concentrações de Se houve aumento da disponibilidade deste mineral para síntese de selenoproteínas, verificado a partir do aumento tanto da concentração plasmática como da expressão gênica da SELENOP. Assim, considerando o *status* de Se adequado das participantes e a ingestão de altas quantidades deste micronutriente, sugere-se que o aumento da atividade enzimática da GPx1 e, possivelmente, de outras selenoproteínas que também possuem função antioxidante, podem estar atuando de forma mais intensa no mecanismo citado acima, inibindo a ativação do NF-κB.

Evidências apontam que a inibição da atividade do NF-κB em células não imunes pode desencadear uma inflamação crônica e levar a um desequilíbrio da homeostase imune fisiológica. Entre os tipos celulares relacionados com este mecanismo, estão as células epiteliais intestinais, que constantemente estão expostas ao ambiente externo, como por exemplo a dieta. A inibição constante do NF-κB no epitélio intestinal pode levar ao aumento da morte destas células intestinais e à diminuição da expressão dos peptídeos antimicrobianos, que conseqüentemente, resultam no comprometimento da barreira epitelial e permite a invasão de bactérias comensais na mucosa colônica (PASPARAKIS, 2009). Este quadro pode levar ao aumento da permeabilidade intestinal e no aumento da translocação de LPS do lúmen intestinal para a corrente sanguínea, processo conhecido como endotoxemia metabólica (CANI *et al.*, 2008; MOREIRA *et al.*, 2012; ROGERO, CALDER, 2018).

Diante dos resultados observados no presente estudo, sugere-se que o aumento da expressão de genes pró-inflamatórios nas mulheres obesas possa estar relacionado com o aumento da inibição do NF-κB. Este mecanismo pode ser atribuído ao aumento da oferta de Se que resultou no aumento da expressão de selenoproteínas que atuam indiretamente na inibição deste fator de transcrição por meio de vias relacionadas ao estresse oxidativo. Nesse sentido, a fim de verificar se existe uma relação entre o Se e o aumento da permeabilidade intestinal, as participantes do estudo foram avaliadas de acordo

com o tercil de Se no plasma e a concentração plasmática de LPS. Os resultados desta análise estão apresentados no **Gráfico 5**.



Legenda: Os dados correspondem à média e intervalo de confiança de 95%. Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$ pelo teste Mann-Whitney).

Gráfico 5. Concentração plasmática de LPS das participantes do estudo no *baseline* e após 8 semanas de acordo com o tercil de selênio no plasma.

Os resultados do gráfico acima mostram que tanto no *baseline* quanto após 8 semanas de estudo, as concentrações plasmáticas de LPS são maiores de acordo com o aumento da concentração plasmática de Se. Uma correlação positiva e significativa foi encontrada entre as concentrações plasmáticas de Se e LPS após 8 semanas ($r = 0,317$; $p = 0,026$). A partir destes dados, sugere-se que existe uma relação entre as altas de concentrações de Se, o aumento da permeabilidade intestinal e a inflamação. No entanto, até o momento não existem evidências que mostram esta relação e, portanto, estudos nessa área são necessários para esclarecer essa hipótese.

Ao considerar a intervenção utilizada neste estudo, observou-se que o consumo da castanha-do-brasil com altas concentrações de Se, por um período de dois meses, resultou em alterações nas respostas moleculares relacionadas à inflamação nas mulheres obesas. Desse modo, acredita-se que o consumo deste alimento por períodos prolongados poderia intensificar essa resposta pró-inflamatória e acarretar em danos metabólicos para esta população.

Com a finalidade de investigar de forma mais detalhada os resultados obtidos da análise de expressão gênica observados no grupo que recebeu a intervenção, avaliou-se a expressão das proteínas de membrana TLR2 e TLR4 em monócitos do sangue periférico apenas no grupo BN. Na **tabela 12** estão apresentados os resultados desta avaliação.

Após o consumo da castanha-do-brasil, observou-se diferença significativa apenas na intensidade da fluorescência (IF) das células CD14+TLR2+. Para as demais células avaliadas, a intervenção não foi capaz de promover mudanças significativas.

Tabela 12. Expressão de TLR2 e TLR4 na membrana plasmática de monócitos do sangue periférico de mulheres obesas do grupo *Brazil nut* (BN) antes (T0) e após (T1) a intervenção.

	CD14+		* <i>p</i> -valor	CD16+		* <i>p</i> -valor
	T0	T1		T0	T1	
TLR2+ (%)	1,6 (1,3-2,0)	1,8 (1,4-2,1)	0,268	1,0 (0,6-1,3)	0,7 (0,5-0,9)	0,090
TLR2+ (IF)	699,5 (586,0-813,0)	564,5 (464,8-664,2)	<0,001	606,3 (541,9-670,6)	567,3 (468,0-666,5)	0,510
TLR4+ (%)	20,9 (15,6-26,1)	28,6 (23,2-33,9)	0,145	8,1 (5,9-10,4)	8,0 (6,0-10,1)	0,098
TLR4+ (IF)	1003,3 (877,7-1128,8)	1013,8 (836,1-1191,4)	0,382	372,0 (332,8-406,2)	355,5 (287,4-423,6)	0,872

Legenda: TLR= toll like receptor; IF= intensidade da fluorescência. Valores apresentados em média geométrica e intervalo de confiança de 95% entre parênteses. *Teste de Mann-Whitney.

Os TLRs são uma família de receptores transmembranas que desempenham um papel importante no reconhecimento de patógenos e na resposta imune por meio do controle da resposta imunológica e inflamatória. Na obesidade, o aumento da concentração de ácidos graxos e de LPS são considerados potenciais ativadores de TLR2 e TLR4 que estão envolvidos diretamente na resposta inflamatória. Estas isoformas são estímulos importantes para ativação da via de sinalização do NF- κ B via MyD88 contribuindo para o aumento da resposta inflamatória por meio do aumento da expressão de genes que codificam proteínas com ação pró-inflamatória (JIALAI *et al.*, 2014; ROGERO, CALDER, 2018).

Em humanos, TLR2/4 são expressos em monócitos e análises de citometria de fluxo identificaram a presença destas proteínas na membrana plasmática destas células. Considerando um indivíduo obeso, Devevre *et. al.* (2014) demonstrou que na obesidade os monócitos (CD14 e CD16) apresentam um fenótipo inflamatório com um aumento da resposta frente ao estímulo de TLR4 e TLR8. Este perfil de subpopulações de monócitos pode contribuir para a manutenção da inflamação crônica observada na obesidade.

Um estudo realizado com células de monócitos THP-1 avaliou os efeitos dos ácidos graxos livres em condições de hiperglicemia, fator importante na fisiopatologia da obesidade e do diabetes melitos tipo 2. Os resultados mostraram que a presença de ácidos graxos livres aumentou a expressão celular de TLR2/4, a produção de ERO e a atividade do NF- κ B (DASU, JIALAL, 2011). Mattos *et.al.* (2016) observou um aumento da expressão de TLR4 e TNF- α em monócitos de crianças obesas, principalmente nos denominados monócitos clássicos CD14⁺⁺CD16⁻. Segundo os autores, este dado sugere que a resposta inflamatória desencadeada pela ativação de macrófagos resulta no aumento da produção de citocinas inflamatórias. Nesse sentido, outro trabalho conduzido com pacientes diagnosticados com diabetes melitos do tipo 1 observou uma expressão gênica e proteica significativamente maior de TLR2/4 de monócitos em relação ao grupo controle saudável (DEVARAJ *et al.*, 2008).

Apesar de neste estudo não terem sido observadas diferenças significativas na expressão de TLR2/4 nas diferentes subpopulações de monócitos, este é o primeiro estudo que avaliou o efeito do consumo de um

alimento fonte de Se em células de indivíduos obesos. Mais estudos são necessários a fim de avaliar e compreender os possíveis efeitos de outros alimentos e compostos bioativos nas vias de sinalização envolvidas na resposta imune desses indivíduos.

7. CONCLUSÃO

O consumo da castanha-do-brasil com altas concentrações de Se por mulheres obesas que não possuem deficiência deste mineral, promoveu o aumento da expressão gênica de biomarcadores inflamatórios em células mononucleares do sangue periférico sem, no entanto, alterá-los no plasma. Nesse sentido, sugere-se que o consumo desta nóz por períodos prolongados pode levar a repercussões metabólicas e de saúde em mulheres obesas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALASFAR, F. et al. Selenium is significantly depleted among morbidly obese female patients seeking bariatric surgery. **Obes Surg**, v. 21, n. 11, p. 1710-3, 2011.

ALFADDA, A. A.; SALLAM, R. M. Reactive oxygen species in health and disease. **BioMed Research International**, v. 2012, p.1-14, 2012.

ASEMI, Z. et al. Effects of selenium supplementation on glucose homeostasis, inflammation, and oxidative stress in gestational diabetes: Randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Nutrition**, v. 31, n. 10, p. 1235-42, 2015.

ASTRUP, A.; BUGEL, S. Micronutrient deficiency in the aetiology of obesity. In: (Ed.). **Int J Obes (Lond)**. England, v.34, 2010. p.947-8. ISBN 1476-5497.

BAHMANI, F. et al. Effect of Selenium Supplementation on Glycemic Control and Lipid Profiles in Patients with Diabetic Nephropathy. **Biological trace element research**, v. 172, n. 2, p. 282-289, 2016.

BAHMANI, F. et. al. The effects of selenium supplementation on biomarkers of inflammation and oxidative stress in patients with diabetic nephropathy: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Br J Nutr**, v. 116, n. 7, p. 1222-1228, 2016.

BASTARD, J.-P. et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. **European cytokine network**, v. 17, n. 1, p. 4-12, 2006.

BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; ARÊAS, J. A. G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 646-656, 2009.

BATISTA, B. L. et al. 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. **Anal Chim Acta**, v. 639, n. 1-2, p. 13-8, Apr 20 2009.

BENSTOEM, C. et al. Selenium and Its Supplementation in Cardiovascular Disease—What do We Know? **Nutrients**, v. 7, n. 5, p. 3094-3118, 2015.

BES-RASTROLLO, M. et al. Prospective study of nut consumption, long-term weight change, and obesity risk in women. In: (Ed.). **Am J Clin Nutr**, v.89, 2009. p.1913-9.

BONDIA-PONS, I.; RYAN, L.; MARTINEZ, J. A. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 68, n. 4, p. 701-711, 2012.

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

BURK, R. F.; HILL, K. E. Selenoprotein P-expression, functions, and roles in mammals. **Biochim Biophys Acta**, v. 1790, n. 11, p. 1441-7, Nov 2009.

BURK, R. F. et al. Effects of chemical form of selenium on plasma biomarkers in a high-dose human supplementation trial. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 15, n. 4, p. 804-10, Apr 2006.

CALDER, P. C. et al. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. **British Journal of Nutrition**, v. 106, n. S3, p. S1-S78, 2011.

CALLOU, K. R. A. **Efeito da suplementação com castanha-do-brasil (Bertholletia excelsa H.B.K.) como fonte de selênio sobre os marcadores de estresse oxidativo, citocinas inflamatórias e sua relação com o polimorfismo Pro198Leu no gene da glutamina peroxidase 1 em pacientes com artrite reumatóide.** 2014. (Doutorado). Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, São Paulo.

CANI, P. D. et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. **Diabetes**, v. 57, n. 6, p. 1470-81, Jun 2008.

CARDOSO, B. R. et al. Effects of Brazil nut consumption on selenium status and cognitive performance in older adults with mild cognitive impairment: a randomized controlled pilot trial. **Eur J Nutr**, v. 55, n. 1, p. 107-16, Feb 2016.

CARDOSO, B.R. et. al. Pro198Leu polymorphism affects the selenium status and GPx activity in response to Brazil nut intake. **Food Funct**, v. 7, n. 2, p. 825-33, Feb 2016.

CARDOSO, B.R.; DUARTE, G.B.S.; REIS, B.Z.; COZZOLINO, S.M.F.. Brazil nuts: Nutritional composition, health benefits and safety aspects. **Food Research International**, v. 100, p. 9-18, 2017.

CARVALHO, R.F.; HUGUENIN, G.V.; LUIZ, R.R.; MOREIRA, A.S.; OLIVEIRA, G.M.; ROSA, G. Intake of partially defatted Brazil nut flour reduces serum cholesterol in hypercholesterolemic patients-a randomized controlled trial. **Nutrition journal**, v. 14, n. 1, p. 59, 2015.

CHEN, M. et al. Selenoprotein P is elevated in individuals with obesity, but is not independently associated with insulin resistance. **Obes Res Clin Pract**, v. 11, n. 2, p. 227-232, Mar - Apr 2017.

COLPO, E. et al. Brazilian nut consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters. **Nutrition**, v. 30, n. 4, p. 459-65, Apr 2014. \

COMBS, G. F., JR. Biomarkers of selenium status. **Nutrients**, v. 7, n. 4, p. 2209-36, Mar 31 2015.

COMINETTI, C. Selênio. In: COZZOLINO, S. M. F. e COMINETII, C. (Ed.). **Bases Bioquímicas e Fisiológicas da Nutrição: nas diferentes fases da vida, na saúde e na doença**. 1. Barueri: Manole, 2013. cap. 14, ISBN 978-85-204-3177-1.

COMINETTI, C. et al. Brazilian nut consumption improves selenium status and glutathione peroxidase activity and reduces atherogenic risk in obese women. **Nutr Res**, v. 32, n. 6, p. 403-7, Jun 2012.

COMINETTI, C.; DUARTE, G. B. S.; COZZOLINO, S. M. F. Selênio. In: (Ed.). **Série de Publicações ILSI Brasil: Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes**. 2. São Paulo: ILSI Brasil, 2017. cap. 8.

DA SILVA, E. G.; MATAVELI, L. R.; ARRUDA, M. A. Speciation analysis of selenium in plankton, Brazil nut and human urine samples by HPLC-ICP-MS. **Talanta**, v. 110, p. 53-7, Jun 15 2013.

DASU, M. R.; JIALAL, I. Free fatty acids in the presence of high glucose amplify monocyte inflammation via Toll-like receptors. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 300, n. 1, p. E145-54, Jan 2011.

DE MELLO, V. D. F. et al. Gene expression of peripheral blood mononuclear cells as a tool in dietary intervention studies: What do we know so far? **Molecular nutrition & food research**, v. 56, n. 7, p. 1160-1172, 2012.

DEVARAJ, S. et al. Increased toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with type 1 diabetes: further evidence of a proinflammatory state. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 93, n. 2, p. 578-83, Feb 2008.

DEVEVRE, E. F. et al. Profiling of the three circulating monocyte subpopulations in human obesity. **J Immunol**, v. 194, n. 8, p. 3917-23, Apr 15 2015.

DONADIO, J. L. S. et al. Influence of Genetic Variations in Selenoprotein Genes on the Pattern of Gene Expression after Supplementation with Brazil Nuts. **Nutrients**, v. 9, n. 7, p. 739, 2017.

DONADIO, J.L.S.; ROGERO, M.M.; GUERRA-SHINOHARA, E.M.; DESMARCHELIER, C.; BOREL, P.; COZZOLINO, S.M.F. SEPP1 polymorphisms modulate serum glucose and lipid response to Brazil nut supplementation. **European journal of nutrition**, p. 1-10, 2017.

DUMONT, E. et al. Speciation of Se in Bertholletia excelsa (Brazil nut): A hard nut to crack? **Food Chemistry**, v. 95, n. 4, p. 684-692, 2006.

DUNTAS, L. H. Selenium and inflammation: underlying anti-inflammatory mechanisms. **Hormone and Metabolic Research**, v. 41, n. 06, p. 443-447, 2009.

DUNTAS, L. H.; BENVENGA, S. Selenium: an element for life. **Endocrine**, v. 48, n. 3, p. 756-775, 2015.

EL-AMARI, S. S.; LLOREN, J. I.; SABATE, J. Nut Intake, Prospective Weight Change, and Obesity Risk: The Adventist Health Study-2. **The FASEB Journal**, v. 30, n. 1, 2016.

ELKS, C. M.; FRANCIS, J. Central adiposity, systemic inflammation, and the metabolic syndrome. **Current hypertension reports**, v. 12, n. 2, p. 99-104, 2010.

FAIRWEATHER-TAIT, S. J. et al. Selenium in human health and disease. **Antioxidants & redox signaling**, v. 14, n. 7, p. 1337-1383, 2011.

FALUDI, A. A. et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 109, n. 2, p. 1-76, 2017.

FAUL, F. et al. G* Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. **Behavior research methods**, v. 39, n. 2, p. 175-191, 2007.

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, A. et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 5, p. 3117-3132, 2011.

FOSTER, L. H.; SUMAR, S. Hydride generation atomic absorption spectrometric (HGAAS) determination of selenium in term and preterm infant formulae available in the United Kingdom. **Food Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 293-298, 1996.

GALANTE, A. P. **Desenvolvimento e validação de um método computadorizado para avaliação do consumo alimentar, preenchido por indivíduos adultos utilizando a Web**. 2007. (Doutorado). Nutrição Humana Aplicada (PRONUT), Universidade de São Paulo, São Paulo.

GALIC, S.; OAKHILL, J. S.; STEINBERG, G. R. Adipose tissue as an endocrine organ. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 316, n. 2, p. 129-139, 2010.

GARCIA, R. W. D. Representations on food intake and its implications in nutritional investigations: qualitative study with subjects submitted to dietary prescriptions. **Rev. Nutr.**, v. 17, n. 1, p. 15-28, 2004.

GELONEZE, B.; UMEDA, L. M.; VASQUEZ, A. C. J. Fisiologia e morfologia do tecido adiposo humano. In: GEN (Ed.). **Tratado de Obesidade**. 2. Rio de Janeiro: MANCINI, M. C., et al., v.1, 2015. cap. 16, p.117-136.

GONZALEZ-ESTECHA, M. et al. Relationship between serum selenium, sociodemographic variables, other trace elements and lipid profile in an adult Spanish population. **J Trace Elem Med Biol**, v. 43, p. 93-105, Sep 2017.

GOOSSENS, G. H. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. **Physiology & behavior**, v. 94, n. 2, p. 206-218, 2008.

GREENBERG, A. S.; OBIN, M. S. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. **The American journal of clinical nutrition**, v. 83, n. 2, p. 461S-465S, 2006.

HAO, D.-Q. et al. Determination of serum selenium by hydride generation flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 43, n. 4, p. 595-600, 1996.

HAUBROCK, J. et al. Estimating usual food intake distributions by using the multiple source method in the EPIC-Potsdam Calibration Study. **J Nutr**, v. 141, n. 5, p. 914-20, May 2011.

HESKETH, J. Nutrigenomics and Selenium: Gene Expression Patterns, Physiological Targets, and Genetics. **Ann. Rev. Nutr.**, v.28, p.157-177, 2008.

HOFFMANN, P. R. Mechanisms by which selenium influences immune responses. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 55, n. 5, p. 289-97, Sep-Oct 2007.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860-867, 2006.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87-91, 1993.

HUANG, Z.; ROSE, A. H.; HOFFMANN, P. R. The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. **Antioxidants & redox signaling**, v. 16, n. 7, p. 705-743, 2012.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, Â. D. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos
Glutathione and related enzymes: biological roles and importance in pathological processes. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

HUGUENIN, G. V. et al. Improvement of antioxidant status after Brazil nut intake in hypertensive and dyslipidemic subjects. **Nutr J**, v. 14, n. 54, p. 1-10, May 29 2015.

IOM. **Dietary reference intakes: the essential guide to nutrient requirements.** Washington, DC: National Academies Press. Institute of Medicine (IOM), 2006.

JACKSON, C. L.; HU, F. B. Long-term associations of nut consumption with body weight and obesity¹²³⁴. In: (Ed.). **Am J Clin Nutr**, v.100, 2014. p.408S-11S.

JAMILIAN, M. et al. Metabolic response to selenium supplementation in women with polycystic ovary syndrome: a... - Abstract - Europe PMC. **Clinical Endocrinology**, v. 82, n. 6, p. 885-891, 2015.

JAMILIAN, M. et. al. Effects of Selenium Supplementation on Gene Expression Levels of Inflammatory Cytokines and Vascular Endothelial Growth Factor in Patients with Gestational Diabetes. **Biol Trace Elem Res**, v. 181, n. 2, p. 199-206, Feb 2018.

JIALAL, I.; KAUR, H.; DEVARAJ, S. Toll-like receptor status in obesity and metabolic syndrome: a translational perspective. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 99, n. 1, p. 39-48, Jan 2014.

KIMMONS, J. E. et al. Associations between body mass index and the prevalence of low micronutrient levels among US adults. **MedGenMed**, v. 8, n. 4, p. 59, Dec 2006.

KOBAYASHI, H. et al. Dysregulated glutathione metabolism links to impaired insulin action in adipocytes. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, n. 6, p. E1326-34, Jun 2009.

KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 635, 2000.

KRETZ-REMY, C.; ARRIGO, A. P. Selenium: a key element that controls NF-kappa B activation and I kappa B alpha half life. **Biofactors**, v. 14, n. 1-4, p. 117-25, 2001.

LABUNSKYY, V. M.; HATFIELD, D. L.; GLADYSHEV, V. N. Selenoproteins: Molecular Pathways and Physiological Roles. **Physiological reviews.**, v.94, n.3, p.739-777, 2014.

LACLAUSTRA, M. et al. Serum selenium and serum lipids in US adults: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2004. **Atherosclerosis**, v. 210, n. 2, p. 643-8, Jun 2010.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001/12/01/ 2001.

LOHMAN, T. G. Advances in body composition assessment. **Human Kinetics**, p. 1-23, 1992.

LU, C.-W. et al. High serum selenium levels are associated with increased risk for diabetes mellitus independent of central obesity and insulin resistance. **BMJ Open Diabetes Research and Care**, v. 4, n. 1, p. e000253, 2016.

LUBOS, E.; LOSCALZO, J.; HANDY, D. E. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 7, p. 1957-1997, 2011.

MANACH, C. et al. Addressing the inter-individual variation in response to consumption of plant food bioactives: Towards a better understanding of their role in healthy aging and cardiometabolic risk reduction. **Mol Nutr Food Res**, v. 61, n. 6, 2017.

MARANHÃO, P. A. et al. Brazil nuts intake improves lipid profile, oxidative stress and microvascular function in obese adolescents: a randomized controlled trial. **Nutrition & metabolism**, v. 8, n. 1, p. 32, 2011..

MARSEGLIA, L. et al. Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 1, p. 378-400, 2014.

MASKREY, B. H. et al. Mechanisms of Resolution of Inflammation. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 31, n. 5, p. 1001-1006, 2011.

MATTOS, R. T. et al. Chronic Low-Grade Inflammation in Childhood Obesity Is Associated with Decreased IL-10 Expression by Monocyte Subsets. **PLoS One**, v. 11, n. 12, p. e0168610, 2016.

MAURY, E.; BRICHARD, S. M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 314, n. 1, p. 1-16, 2010.

MILECH, A. et al. Diretrizes da sociedade brasileira de diabetes (2015-2016). **São Paulo: AC Farmacêutica**, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **VIGITEL BRASIL 2016**. Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. Estimativas sobre Frequência e Distribuição Sócio-Demográfica de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas nas Capitais dos 26 Estados Brasileiros e no Distrito Federal em 2016. 1. Brasília, Distrito Federal: 2017. 160.

MIOT, H. A. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais Sample size in clinical and experimental trials. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 10, n. 4, p. 275-278, 2011.

MOREIRA, A. P. et al. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. **Br J Nutr**, v. 108, n. 5, p. 801-9, Sep 2012.

NEELS, J. G.; OLEFSKY, J. M. Inflamed fat: what starts the fire? **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 1, p. 33-35, 2006.

NGUYEN, D. M.; EL-SERAG, H. B. The epidemiology of obesity. **Gastroenterology Clinics**, v. 39, n. 1, p. 1-7, 2010.

OMRANI, H. R.; RAHIMI, M.; NIKSERESHT, K. The effect of selenium supplementation on acute phase reactants and thyroid function tests in hemodialysis patients. **Nephrourol Mon**, v. 7, n. 2, p. e24781, Mar 2015.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **J Lab Clin Med**, v. 70, n. 1, p. 158-69, Jul 1967.

PAL, M.; FEBBRAIO, M. A.; LANCASTER, G. I. The roles of c-Jun NH2-terminal kinases (JNKs) in obesity and insulin resistance. **The Journal of physiology**, v. 594, n. 2, p. 267-279, 2016.

PAPP, L. V. et al. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. **Antioxid Redox Signal**, v. 9, n. 7, p. 775-806, Jul 2007.

PASPARAKIS, M. Regulation of tissue homeostasis by NF-kappaB signalling: implications for inflammatory diseases. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 11, p. 778-88, Nov 2009.

PIECZYŃSKA, J.; GRAJETA, H. The role of selenium in human conception and pregnancy. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 29, p. 31-38, 2015.

PINTON, P. Oxidative stress in cardiovascular diseases and obesity: role of p66Shc and protein kinase C. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, 2013.

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

QUINTANILHA, B. J. et al. Nutrимиomics: Role of microRNAs and Nutrition in Modulating Inflammation and Chronic Diseases. **Nutrients**, v. 9, n. 11, p. 1168, 2017.

RAYMAN, M. P. Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. **British journal of nutrition**, v. 100, n. 2, p. 254-268, 2008.

ROGERO, M. M.; CALDER, P. C. Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. **Nutrients**, v. 10, n. 4, Mar 2018.

ROMAN, M.; JITARU, P.; BARBANTE, C. Selenium biochemistry and its role for human health. **Metallomics**, v. 6, n. 1, p. 25-54, 2014.

SABATE, J. Nut consumption and body weight. **Am J Clin Nutr**, v. 78, n. 3 Suppl, p. 647s-650s, Sep 2003.

SANCHEZ, C. et al. Plasma levels of copper, manganese and selenium in an adult population in southern Spain: influence of age, obesity and lifestyle factors. **Sci Total Environ**, v. 408, n. 5, p. 1014-20, Feb 2010.

SAVINI, I. et al. Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 5, p. 10497-10538, 2013.

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

SHAH, A.; MEHTA, N.; REILLY, M. P. Adipose inflammation, insulin resistance, and cardiovascular disease. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 32, n. 6, p. 638-644, 2008.

SHALTOUT, A. A. et al. Method development and optimization for the determination of selenium in bean and soil samples using hydride generation electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 85, n. 3, p. 1350-1356, 2011.

SHEN, Y. et al. SeMet mediates anti-inflammation in LPS-induced U937 cells targeting NF-kappaB signaling pathway. **Inflammation**, v. 38, n. 2, p. 736-44, Apr 2015.

SILVA JUNIOR, E. C. et al. Natural variation of selenium in Brazil nuts and soils from the Amazon region. **Chemosphere**, v. 188, p. 650-658, 2017.

STERN, S. E. et al. Identification of individuals with insulin resistance using routine clinical measurements. **Diabetes**, v. 54, n. 2, p. 333-339, 2005.

STOCKLER-PINTO, M. B. et al. Brazil nut (*Bertholletia excelsa*, H.B.K.) improves oxidative stress and inflammation biomarkers in hemodialysis patients. **Biol Trace Elem Res**, v. 158, n. 1, p. 105-12, Apr 2014.

STRANGES, S. et al. Higher selenium status is associated with adverse blood lipid profile in British adults. **The Journal of nutrition**, v. 140, n. 1, p. 81-87, 2010.

STRUNZ, C. C. et al. Brazil nut ingestion increased plasma selenium but had minimal effects on lipids, apolipoproteins, and high-density lipoprotein function in human subjects. **Nutr Res**, v. 28, n. 3, p. 151-5, Mar 2008.

THOMSON, C. D. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. **Eur J Clin Nutr**, v. 58, n. 3, p. 391-402, Mar 2004.

THOMSON, C. D. et al. Brazil nuts: an effective way to improve selenium status. **Am J Clin Nutr**, v. 87, n. 2, p. 379-84, Feb 2008.

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, n. 2, p. 379-384, 2008.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 10, p. 772-783, 2006.

VADIVEL, V.; KUNYANGA, C. N.; BIESALSKI, H. K. Health benefits of nut consumption with special reference to body weight control. **Nutrition**, v. 28, n. 11, p. 1089-1097, 2012.

VALLABHAPURAPU, S.; KARIN, M. Regulation and function of NF- κ B transcription factors in the immune system. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 693-733, 2009.

VAN DAEL, P.; DEELSTRA, H. Selenium. **Int J Vitam Nutr Res**, v. 63, n. 4, p. 312-6, 1993.

VINCENT, H. K.; TAYLOR, A. G. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. **International journal of obesity**, v. 30, n. 3, p. 400, 2006.

VUNTA, H. et al. Selenium attenuates pro-inflammatory gene expression in macrophages. **Mol Nutr Food Res**, v. 52, n. 11, p. 1316-23, Nov 2008.

WHO. WORLD OF HEALTH AND ORGANIZATION. **Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity.**: Geneva: World Health Organization 1998.

WHO | Obesity and overweight. **WHO**, 2018-02-09 16:11:49 2018. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> >.

WILLETT, W. C.; HOWE, G. R.; KUSHI, L. H. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. **Am J Clin Nutr**, v. 65, n. 4 Suppl, p. 1220S-1228S; discussion 1229S-1231S, Apr 1997.

XIA, Y. et al. Optimization of selenoprotein P and other plasma selenium biomarkers for the assessment of the selenium nutritional requirement: a placebo-controlled, double-blind study of selenomethionine supplementation in selenium-deficient Chinese subjects. **Am J Clin Nutr**, v. 92, n. 3, p. 525-31, Sep 2010.

YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. **LWT-Food Science and Technology**, v. 42, n. 10, p. 1573-1580, 2009.

YANG, S. J. et al. Serum selenoprotein P levels in patients with type 2 diabetes and prediabetes: implications for insulin resistance, inflammation, and atherosclerosis. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 96, n. 8, p. E1325-9, Aug 2011.

YERLIKAYA, F. H.; TOKER, A.; ARIBAS, A. Serum trace elements in obese women with or without diabetes. **Indian J Med Res**, v. 137, n. 2, p. 339-45, Feb 2013.

YUAN, Z. et al. High levels of plasma selenium are associated with metabolic syndrome and elevated fasting plasma glucose in a Chinese population: a case-control study. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 32, p. 189-194, 2015.

ZAMAMIRI-DAVIS, F. et al. Nuclear factor- κ B mediates over-expression of cyclooxygenase-2 during activation of RAW 264.7 macrophages in selenium deficiency. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 9, p. 890-897, 2002.

ZHANG, F. et al. Inhibition of TNF-alpha induced ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression by selenium. **Atherosclerosis**, v. 161, n. 2, p. 381-6, Apr 2002.

ZHANG, W. et al. Selenium inhibits LPS-induced pro-inflammatory gene expression by modulating MAPK and NF-kappaB signaling pathways in mouse mammary epithelial cells in primary culture. **Inflammation**, v. 37, n. 2, p. 478-85, Apr 2014.

ZHANG, Y.; CHEN, X. Reducing selenoprotein P expression suppresses adipocyte differentiation as a result of increased preadipocyte inflammation. In: (Ed.). **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.300, p.E77-85. 2011.

9. ANEXOS

- ANEXO 1 – Ficha do Aluno
- ANEXO 2 – Currículo lattes
- ANEXO 3 – Publicações relacionadas ao projeto de pesquisa
- ANEXO 4 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa
- ANEXO 5 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)
- ANEXO 6 – Ficha Cadastral
- ANEXO 7 – Ficha – Recordatório Alimentar de 24 horas
- ANEXO 8 – Ficha – Avaliação do nível de atividade física (IPAQ)