

Tese de Doutorado

**EFEITOS DO CONSUMO DA CASTANHA-DO-BRASIL
(*Bertholletia excelsa* H.B.K.) NA MODULAÇÃO DO
ESTRESSE OXIDATIVO E INSTABILIDADE GENÔMICA
EM INDIVÍDUOS COM DIABETES MELLITUS TIPO 2**

TAMIRES PAVEI MACAN



**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

TAMIRES PAVEI MACAN

**EFEITOS DO CONSUMO DA CASTANHA-DO-BRASIL
(*Bertholletia excelsa* H.B.K.) NA MODULAÇÃO DO
ESTRESSE OXIDATIVO E INSTABILIDADE GENÔMICA
EM INDIVÍDUOS COM DIABETES MELLITUS TIPO 2**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Moraes de Andrade

Co-Orientador: Prof. Dr. João Paulo Fernandes Teixeira (INSA – Portugal)

**CRICIÚMA
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

M114e Macan, Tamires Pavei.

Efeitos do consumo da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) na modulação do estresse oxidativo e instabilidade genômica em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 / Tamires Pavei Macan. – 2017.

132 p. : il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2017.

Orientação: Vanessa Moraes de Andrade.

Coorientação: João Paulo Fernandes Teixeira.

1. Diabetes mellitus tipo 2. 2. Castanha-do-Brasil – Uso terapêutico. 3. Selênio - Consumo. 4. Estresse oxidativo. I.



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

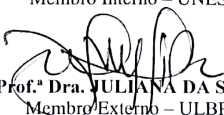
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata **Tamires Pavei Macan** sob o título **“EFEITOS DO CONSUMO DA CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) NA MODULAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E INSTABILIDADE GENÔMICA EM INDIVÍDUOS COM DIABETES MELLITUS TIPO 2”**, para obtenção do grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela **“APROVAÇÃO”** da Tese.


Criciúma, SC, 19 de dezembro de 2017.



Prof.^a Dra. JOSIANE BUDNI
Membro Relator – UNESC


Prof. Dr. PAULO CÉSAR LOCK SILVEIRA
Membro Interno – UNESC


Prof.^a Dra. JULIANA DA SILVA
Membro Externo – ULBRA


Prof.^a Dra. ALESSANDRA PERES
Membro Externo – UFCSPA


Prof.^a Dra. Vanessa Moraes de Andrade
Orientadora


Prof.^a Dra. Maria Inês da Rosa
Coordenadora do PPGCS

Folha informativa

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações das Clínicas Integradas e no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) em colaboração com o Departamento de Saúde Ambiental do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (Porto, Portugal) e o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício, do PPGCS da UNESC.

*Aos meus pais e
à todas as pessoas que creem no poder de um alimento, especialmente
às que voluntariamente doaram-se para a realização deste estudo.*

AGRADECIMENTOS

Acima de qualquer coisa, Ao Criador. Por todas a obras que Ele fez. Por todas as obras que Ele faz. Pelas oportunidades que Ele me dá.

Ao meu maior tesouro, minha família: meus pais, Gilmar e Rosângela, minhas irmãs, Tatiana e Mariane, e minhas avós, Augusta e Alvira. Minha família é meu ouro, meu céu, minha paz, minha vida e meu lar!

Ao Manoel, por estar sempre ao meu lado, pelo apoio fundamental nos momentos em que o mundo parecia desabar sobre mim... por me completar, por estar comigo pro que der e vier, num pedaço de qualquer lugar...

À professora Dra. Vanessa Andrade, minha orientadora, por ter confiado uma tese em minhas mãos, permitindo-me viver a nutrição no mundo da pesquisa científica. Pelas oportunidades a qual tive ao lado dela e pelos ensinamentos ao longo desta jornada.

Aos voluntários desta pesquisa, que se concretizou porque cada um deles depositou confiança e esperança na minha hipótese e na minha proposta. Eles foram essenciais.

A todos os colegas de trabalho do Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Este trabalho só pode ser executado porque uma equipe doou suas mãos para auxiliar. Sem eles, eu pouco ou nada faria, eles foram excepcionais! Um agradecimento especial à Marina Magenis, que esteve comigo em muitos momentos ao longo destes anos, mas principalmente por dividir uma das tarefas mais difíceis deste trabalho, a leitura das lâminas do teste de micronúcleo. Um beijo especial para Adriane Damiani e Samira De Prá, pela amizade e parceria destes anos! Destaco também, a participação especial da Gabriela Fagundes, pelas palavras leves e cheias de luz.

Ao serviço de enfermagem da Clínicas Integradas da UNESC, pelo auxílio no recrutamento dos participantes.

Ao professor Dr. João Paulo Teixeira e aos colegas de trabalho do Departamento de Saúde Ambiental do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (Porto, Portugal), por me acolherem em seu grupo de pesquisa, onde pude vivenciar um momento ímpar e inesquecível deste

doutoramento. De maneira especial, agradeço à Dra. Cristiana Pereira e à Susana Pinho por estarem sempre dispostas a me ajudar no que fosse preciso. Ainda, às duas amigas que lá fiz, e que levarei para toda a vida, Filipa Esteves e Raquel Amaro, dois anjos que foram minha fonte de colo e abraços durante o ano em que no Porto vivi.

À *European Cooperation in Science and Technology Action*, pela oportunidade de participação em um curso de curta duração sobre o ensaio cometa, no *Norwegian Institute of Public Health* (Oslo, Noruega), organizado pelo *The comet assay as a human biomonitoring tool (hCOMET)*. De forma especial, ao Dr. Gunnar Brunborg, um Senhor cientista, extremamente inteligente, dócil e fascinante, que mesmo aposentado e de cabelos branquinhos continua trabalhando em prol da ciência.

Às professoras Dra Blanca Laffon e Dra Vanessa Valdiglesias e seus alunos, do laboratório de toxicologia da Universidade da Coruña (Coruña, Espanha), que me acolheram em seu laboratório por alguns dias, enriquecendo meus conhecimentos com seus ensinamentos.

Ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício da UNESC, em especial ao professor Dr. Paulo Silveira e seus alunos, pelas análises de estresse oxidativo, e ao professor Dr. Ricardo Pinho e seus alunos, pelos ensinamentos sobre *western blot*.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UNESC que de uma maneira ou de outra, contribuíram neste processo do conhecimento.

Ao curso de nutrição da UNESC, em especial à professora M.Sc. Maria Cristina Gonçalves, por me oportunizar a prática docente em sua disciplina de Nutrição Arte e Ciência II, fazendo-me lembrar dos anos na qual o meu papel era de aluna da graduação e permitindo-me perceber o quanto podemos evoluir.

Aos professores Dr. Ricardo Pinho e Dr. Paulo Silveira, e às professoras Dra. Juliana Silva e Dra. Alessandra Peres, por disponibilizarem de seu tempo na participação da banca examinadora, colaborando com o trabalho, e tornando-o de melhor qualidade.

À UNESC, Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal

de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho e concessão das bolsas de doutorado e doutorado sanduíche. Tenho consciência de que muitos gostariam de ter a mesma oportunidade que tive. O meu desejo de viver um intercâmbio, que veio de anos, só pode ser realizado com este auxílio financeiro.

À UNESC, por todos estes anos de acolhimento, desde a graduação, iniciação científica, mestrado e doutorado.

Ao Instituto Excelsa e agropecuária Aruanã S.A., pela doação de parte das castanhas-do-Brasil utilizadas nesta pesquisa.

Aos amigos e amigas, que já dividiram e continuam dividindo seus passos comigo nesta caminhada chamada vida. Incentivo, ajuda, força e boas vibrações fizeram toda a diferença para o meu crescimento, tanto pessoal como profissional. Quem é especial, não precisa ter seu nome aqui, pois está no meu coração e pode sentir.

A todos que em algum momento, de forma ou de outra, contribuíram para que eu chegasse até aqui, seja com uma palavra de apoio, uma conversa amiga ou participando em alguma etapa deste processo.

A vida é feita de fases na qual você sonha, acredita e alcança. Um ciclo que se repete de tempos em tempos. É isso que nos move. Obrigada a todos que sonham comigo, acreditam no meu trabalho e festejam as minhas vitórias!

“Queira! Basta ser sincero e desejar profundo...”

Raul Seixas

RESUMO

A diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é uma doença metabólica cada vez mais prevalente que ocorre, em grande parte, devido às mudanças ambientais e no estilo de vida. Os estados crônicos de hiperglicemia, hiperlipidemia e hiperinsulinemia podem levar ao estresse oxidativo e conseqüentemente, à oxidação do ácido desoxirribonucleico (DNA). Uma boa prescrição dietética é considerada essencial no tratamento e prevenção de complicações relacionadas à DM2. A castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*, H.B.K.) é a melhor fonte alimentar de selênio encontrada na natureza e, níveis adequados deste mineral no organismo apresentam diversos benefícios à saúde, incluindo melhora no estado redox celular e modulação da instabilidade genômica. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do consumo desta oleaginosa sobre parâmetros bioquímicos, de estresse oxidativo e instabilidade genômica em indivíduos com DM2. Participaram deste estudo 37 homens e 37 mulheres, que consumiram 1 castanha-do-Brasil por dia ($\approx 210 \mu\text{g}$ de selênio) durante 6 meses. Foram coletadas amostras de sangue periférico e células esfoliadas da mucosa bucal imediatamente antes do início e ao final do estudo. Foram analisados os perfis glicêmico, lipídico, inflamatório, hepático e renal, além dos níveis séricos de selênio. Em relação ao estresse oxidativo, foram determinados os níveis de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), nitritos, tióis totais, grupamentos carbonila, malondialdeído (MDA), glutatona (GSH), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT). O ensaio cometa nas versões alcalina e modificada com o uso de formamidopirimidina glicosilase foi utilizado para análise dos danos basal e oxidativo ao DNA, respectivamente. O teste de micronúcleo em células esfoliadas da mucosa bucal foi utilizado para caracterização dos tipos celulares, anormalidades nucleares e presença de dano nuclear. As análises estatísticas foram feitas usando os testes *t* pareado ou de Wilcoxon e, correlação Spearman. Ao analisar os parâmetros bioquímicos, foram observados aumento dos níveis de glicemia de jejum, colesterol HDL e LDL e gama-glutamyltransferase. Os níveis de insulina e a relação triglicérides/HDL-colesterol foram diminuídos. O consumo de castanha-do-Brasil durante seis meses foi capaz de aumentar significativamente os níveis de selênio, GSH, GPx e CAT, sugerindo uma melhora do sistema antioxidante dos pacientes. Em relação à produção de oxidantes, os níveis de DCF e nitritos foram diminuídos. Observou-se um aumento dos níveis de tióis totais e diminuição do conteúdo de grupamentos carbonila e níveis de MDA, sugerindo uma redução na oxidação de proteínas e lipídios. Quanto à instabilidade genômica, os

danos ao DNA, avaliados através do ensaio cometa foram significativamente diminuídos, assim como a frequência de micronúcleos e brotos nucleares também. Os testes estatísticos revelaram que os níveis de selênio foram negativamente associados aos níveis de MDA, danos ao DNA e frequência de micronúcleos. Por outro lado, houve uma associação positiva entre os níveis de selênio e tióis totais, GSH, GPx e CAT. Os resultados do presente trabalho sugerem que a ingestão diária de castanha-do-Brasil pode ser uma aliada na modulação da instabilidade genômica em indivíduos com DM2, provavelmente através de mudanças no estado redox celular.

Palavras-chave: castanha-do-Brasil; selênio; diabetes mellitus tipo 2; estresse oxidativo; instabilidade genômica; ensaio cometa.

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a metabolic disease, occurring largely due to environmental and lifestyle changes. Chronic conditions of hyperglycaemia, hyperlipidaemia and hyperinsulinemia can lead to oxidative stress, and consequently damage to lipids, proteins and DNA. Dietary interventions are considered essential for the treatment and prevention of T2DM-related complications. Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*, H.B.K.) are the richest source of selenium known in nature. The adequate selenium status presents several health benefits, including improve of redox cellular status and maintenance of genomic stability. Based on this, the aim of this study was to assess biochemical and oxidative stress parameters and genomic instability in T2DM patients before and after 6-month consumption of selenium through Brazil nut. Thirty-seven men and thirty-seven women with T2DM were included. Participants consumed 1 Brazil nut a day ($\approx 210 \mu\text{g}$ of selenium) for 6 months. Samples of blood and exfoliated buccal cells (EBC) were collected at the beginning and at the end of treatment. The glycaemic, lipidic, inflammatory, hepatic and renal serum profiles were analyzed. In relation to oxidative stress, the levels of 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), nitrites, total thiols, protein carbonyl, malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) were determined. The alkaline version of the comet assay was the method selected to measure basal DNA damage. In order to measure oxidative DNA damage, the comet assay was coupled with a lesion-specific endonuclease (formamidopyrimidine glycosylase) to detect oxidized purines. The EBC were evaluated for the characterization of cell types (basal and differentiated) and nuclear abnormalities (binucleated cells, pyknosis, karyolysis, karyorrhexis, condensed chromatin) and the presence of cellular damage (micronuclei and nuclear buds). Finally, selenium levels were quantified in serum of participants. The data were processed and statistically analyzed using paired *t* test or Wilcoxon test and Spearman correlation. The data relative to biochemical parameters presents an increased in fasting glucose levels, HDL- and LDL-cholesterol and gama glutamyl transferase levels. Insulin levels and triglycerides/HDL-cholesterol ratio were decreased. Six-month Brazil nut consumption proved to be enough to significantly increase selenium and GSH levels, GPx and CAT activity, improving the antioxidant system of patients. In relation to oxidant production, DCF and nitrites levels were decreased. Besides, were observed an increase in total thiols, and a decrease in protein carbonyl and MDA levels, suggesting a reduction of

proteins and lipids oxidized. Relative to genomic instability, the levels of basal and oxidative DNA damage in T2DM were significantly decreased after Brazil nut consumption, as well as the frequency of micronuclei and nuclear buds. The statistic tests revealed that selenium levels were negatively associated with MDA, basal and oxidative DNA damage and micronuclei frequency. On the other hand, there was a positive association between selenium levels and total thiois, GSH, GPx and CAT. Taken together, the results of the present work indicate that Brazil nut consumption could be an ally to module the genomic instability in T2DM patients, probably through changes in oxidative status.

Key-words: Brazilian nut; selenium; type 2 diabetes mellitus; oxidative stress; genomic instability; comet assay.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1. Mecanismo esquemático do dano celular induzido pela hiperglicemia..... | 31 |
| Figura 2. Formas orgânicas de selênio obtidas através da alimentação | 36 |
| Figura 3. Reação geral do mecanismo antioxidante da glutatona peroxidase. | 37 |
| Figura 4. Mecanismos de ação propostos para os efeitos inerentes ao selênio na capacidade de redução dos danos ao DNA | 39 |
| Figura 5. Fluxograma geral da população estudada. | 50 |
| Figura 6. Protocolo experimental..... | 49 |
| Figura 7. Resumo das análises realizadas neste estudo. | 52 |
| Figura 8. Representação esquemática do ensaio cometa. | 58 |
| Figura 9. Concentração sérica de selênio antes e depois de seis meses de consumo da castanha-do-Brasil por indivíduos com diabetes mellitus tipo 2. | 64 |
| Figura 10. Representações gráficas da correlação de Spearman e regressão linear entre os níveis séricos de selênio <i>versus</i> glicemia de jejum e insulina de jejum em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2. | 66 |
| Figura 11. Efeitos do consumo de castanha-do-Brasil por seis meses sobre os níveis de DCF e concentração de nitrito em plasma de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2..... | 68 |
| Figura 12. Representações gráficas da correlação de Spearman e regressão linear entre os níveis séricos de selênio <i>versus</i> níveis de DCF e concentração de nitrito em plasma de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2. | 68 |
| Figura 13. Efeitos do consumo de castanha-do-Brasil por seis meses sobre marcadores do sistema antioxidante em plasma de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2. | 69 |
| Figura 14. Representações gráficas da correlação de Spearman e regressão linear entre os níveis séricos de selênio <i>versus</i> defesas antioxidante em plasma de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2..... | 70 |
| Figura 13. Efeitos do consumo de castanha-do-Brasil por seis meses sobre marcadores de dano oxidativo em plasma de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 | 71 |
| Figura 16. Representações gráficas da correlação de Spearman e regressão linear entre os níveis séricos de selênio <i>versus</i> marcadores de dano oxidativo em plasma de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2. | 72 |
| Figura 17. Efeitos do consumo de castanha-do-Brasil por seis meses sobre os danos ao DNA avaliados através do ensaio cometa em sangue de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2..... | 73 |

| | |
|---|----|
| Figura 18. Representações gráficas da correlação de Spearman e regressão linear entre os níveis séricos de selênio <i>versus</i> danos ao DNA em sangue de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2..... | 74 |
| Figura 19. Representações gráficas da correlação de Spearman e regressão linear entre os níveis séricos de selênio <i>versus</i> frequência de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2. | 75 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Composição centesimal e concentração de selênio das castanhas-do-Brasil utilizadas no estudo | 51 |
| Tabela 2. Características da população estudada antes e depois do consumo de castanha-do-Brasil | 63 |
| Tabela 3. Perfis glicêmico e insulinêmico de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 antes e depois do consumo de castanha-do-Brasil | 65 |
| Tabela 4. Perfis lipídico e inflamatório de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 antes e depois do consumo de castanha-do-Brasil | 66 |
| Tabela 5. Perfis hepático e renal de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 antes e depois do consumo de castanha-do-Brasil | 67 |
| Tabela 6. Frequência de tipos celulares e anormalidades nucleares em 1000 células e frequência de dano celular em 2000 células diferenciadas | 75 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|-----------------------------------|---|
| AGEs | Produtos finais da glicação avançada (do inglês <i>advanced glycation end-products</i>) |
| ALT | Alanina aminotransferase |
| Akt | Proteína cinase B (do inglês <i>serine/threonine kinase Akt</i>) |
| AST | Aspartato aminotransferase |
| CAT | Catalase |
| CT | Colesterol total |
| DCF | 2',7'-diclorofluoresceína (do inglês <i>2',7'-dichlorofluorescein</i>) |
| DM | Diabetes mellitus |
| DM2 | Diabetes mellitus tipo 2 |
| DMSO | Dimetilsulfóxido (do inglês <i>dimethyl sulfoxide</i>) |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>) |
| DTNB | Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (do inglês <i>5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)</i>) |
| DP | Desvio padrão |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetracético (do inglês <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>) |
| ERN | Espécies reativas de nitrogênio |
| ERO | Espécies reativas de oxigênio |
| EP | Erro padrão |
| FADH₂ | Dinucleotídeo de adenina e flavina reduzido (do inglês <i>flavin adenine dinucleotide reduced</i>) |
| FPG | Formamidopirimidina DNA-glicosilase |
| Gadd45 | Proteína induzida por dano ao DNA e parada de crescimento (do inglês <i>Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45</i>) |
| GGT | Gama-glutamilttransferase |
| GAPDH | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (do inglês <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>) |
| GSH | Glutationa reduzida (do inglês <i>reduced glutathione</i>) |
| GSSG | Glutationa oxidada (do inglês <i>oxidized glutathione</i>) |
| GPx | Glutationa peroxidase |
| GR | Glutationa redutase |
| H₂DCF-DA | Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (do inglês <i>2',7'-dichlorofluorescein diacetate</i>) |
| H₂O₂ | Peróxido de hidrogênio |
| HbA1c | Hemoglobina glicada (do inglês <i>hemoglobin A1c</i>) |

| | |
|-----------------------------------|--|
| HDL | Lipoproteína de alta densidade (do inglês <i>high density lipoprotein</i>) |
| HOMA IR | Modelo de homeostase de resistência à insulina (do inglês <i>homeostasis model assessment of insulin resistance</i>) |
| HOMA β | Modelo de homeostase das células β (do inglês <i>homeostasis model assessment of β cells</i>) |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta resolução (do inglês <i>high performance liquid chromatography</i>) |
| IMC | Índice de massa corporal |
| LABIM | Laboratório de Biologia Celular e Molecular |
| LDL | Lipoproteína de baixa densidade (do inglês <i>low density lipoprotein</i>) |
| MDA | Malondialdeído |
| MN | Micronúcleo |
| NADPH | Dinucleotídeo de adenina e nicotinamida fosfato reduzido (do inglês <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced</i>) |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| | dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzido (NADH) |
| NAFLD | Doença hepática não alcoólica (do inglês <i>non-alcoholic fatty liver disease</i>) |
| NO | Óxido nítrico (do inglês <i>nitric oxide</i>) |
| O₂^{•-} | Ânion superóxido |
| OH[•] | Radical hidroxila |
| PARP | Poli ADP-ribose polimerase (do inglês <i>poly(ADP-ribose) polymerase</i>) |
| PCR | Proteína C reativa |
| PCR-us | Proteína C reativa ultrassensível |
| PKC | Proteína cinase C (do inglês <i>protein kinase C</i>) |
| PPGCS | Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde |
| QUICKI | Índice quantitativo de sensibilidade à insulina (do inglês <i>quantitative insulin sensitivity check index</i>) |
| RDA | Ingestão dietética recomendada (do inglês <i>recommended dietary allowance</i>) |
| ROOH | Hidroperóxido orgânico |
| SeCis | Selenocisteína |
| SeMet | Selenometionina |
| SOD | Superóxido dismutase |
| TBA-RS | Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês <i>thiobarbituric acid-reactive substances</i>) |
| TG | Triglicerídeos |

| | |
|---------------|--|
| TrxR | Tiorredoxina redutase |
| UL | Limite superior tolerável de ingestão (do inglês <i>tolerable upper intake level</i>) |
| UNASAU | Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde |
| UNESC | Universidade do Extremo Sul Catarinense |
| TNB | Acido 5-tio-2-nitrobenzóico (do inglês <i>5-thio-2-nitrobenzoic acid</i>) |
| VLDL | Lipoproteína de muito baixa densidade (do inglês <i>very low density lipoprotein</i>) |
| 8-OHdG | 8-hidroxi-2-desoxiguanosina |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO. | 29 |
| 1.1. Diabetes mellitus tipo 2 | 29 |
| 1.1.1. Conceito, epidemiologia e aspectos fisiopatológicos do diabetes mellitus tipo 2 | 29 |
| 1.1.2. Diabetes mellitus tipo 2 e estresse oxidativo | 30 |
| 1.1.3. Diabetes mellitus tipo 2 e instabilidade genômica | 32 |
| 1.2. Selênio | 34 |
| 1.2.1. Selênio: um mineral essencial | 34 |
| 1.2.2. Biodisponibilidade do selênio, recomendações dietéticas e toxicidade | 35 |
| 1.2.3. O papel antioxidante do selênio | 37 |
| 1.2.4. O papel do selênio na estabilidade genômica | 38 |
| 1.2.5. Selênio e diabetes mellitus tipo 2 | 40 |
| 1.2.6. Castanha-do-Brasil: a melhor fonte dietética de selênio | 41 |
| 1.3. Justificativa | 42 |
| 2. OBJETIVOS. | 45 |
| 2.1. Objetivo geral | 45 |
| 2.2. Objetivos específicos | 45 |
| 3. CASUÍSTICA E MÉTODOS. | 47 |
| 3.1. Casuística | 47 |
| 3.1.1. Classificação e local de realização da pesquisa | 47 |
| 3.1.2. Considerações éticas | 47 |
| 3.1.3. Cálculo da amostra | 47 |
| 3.1.4. Critérios de inclusão | 48 |
| 3.1.5. Critérios de exclusão | 48 |
| 3.1.6. População estudada | 48 |
| 3.1.7. Protocolo experimental | 50 |
| 3.2. Métodos | 52 |
| 3.2.1. Avaliação antropométrica | 52 |
| 3.2.2. Coleta, transporte, processamento e armazenamento das amostras biológicas | 53 |
| 3.2.3. Determinação das concentrações séricas de selênio | 54 |
| 3.2.4. Análises bioquímicas | 54 |
| 3.2.5. Indicadores da formação de oxidantes | 55 |
| 3.2.6. Marcadores de dano oxidativo à proteínas e lipídios | 56 |
| 3.2.7. Defesas antioxidantes | 56 |
| 3.2.8. Dosagem de proteínas | 57 |
| 3.2.9. Ensaio cometa na versão alcalina | 57 |
| 3.2.10. Ensaio cometa com tratamento enzimático | 59 |

| | |
|--|------------|
| 3.2.11. Teste de micronúcleos | 59 |
| 3.2.12. Análise estatística dos dados | 60 |
| 4. RESULTADOS | 63 |
| 4.1. Caracterização da população estudada | 63 |
| 4.2. Níveis de selênio após o consumo da castanha-do-Brasil. | 64 |
| 4.3. Efeitos da ingestão de selênio sobre os perfis glicêmico, lipídico, inflamatório, hepático e renal | 64 |
| 4.4. Efeitos da ingestão de selênio sobre a produção de oxidantes | 67 |
| 4.5. Efeitos da ingestão de selênio sobre defesas antioxidantes | 69 |
| 4.6. Efeitos da ingestão de selênio sobre marcadores de dano oxidativo a macromoléculas..... | 70 |
| 4.7. Efeitos da ingestão de selênio sobre os danos ao DNA avaliados pelo ensaio cometa | 72 |
| 4.8. Efeitos da ingestão de selênio sobre parâmetros avaliados pelo teste de micronúcleos..... | 74 |
| 5. DISCUSSÃO | 77 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 95 |
| REFERÊNCIAS..... | 97 |
| ANEXOS | 125 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Diabetes mellitus tipo 2

1.1.1. Conceito, epidemiologia e aspectos fisiopatológicos do diabetes mellitus tipo 2

O diabetes mellitus (DM) tipo 2 (DM2) é uma doença complexa multifatorial caracterizada por níveis elevados de glicose na corrente sanguínea, resultante de alterações na secreção e/ou ação da insulina, levando à hiperglicemia e alterações no metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas (American Diabetes Association, 2012). A evolução da doença pode ser acompanhada de uma disfunção das células β do pâncreas e uma perda generalizada da sensibilidade à insulina (Kitamura, 2013).

Esta doença metabólica cada vez mais prevalente, cuja rápida difusão atingiu proporções epidêmicas, ocorre em grande parte devido ao estilo de vida, que envolve uma alimentação com alta densidade energética associada à redução na prática de exercícios físicos (Nolan et al., 2011). Por ser um dos maiores problemas de doença evitável do século, tornou-se um grande desafio para as organizações públicas de saúde em nível mundial (Guariguata et al., 2014; Zimmet et al., 2016).

De acordo com a atualização de 2015 do Atlas da Federação Internacional de Diabetes, 415 milhões de pessoas em todo o mundo tem DM, sendo metade ainda não diagnosticada. A forma mais comum da doença é o DM2, atingindo cerca de 90 a 95% dos indivíduos. Em 2015, os gastos com cuidados de saúde para esta doença ultrapassaram os 673 bilhões de dólares. Ainda, neste mesmo ano, cinco milhões de pessoas morreram devido ao DM e estes números estão aumentando em todos os países. Entre os países das Américas do Sul e Central, o Brasil é o que tem maior número de indivíduos com DM, ultrapassando 14,3 milhões, ou seja, 8,7% da população adulta e, a somar-se a estes números, 3,2 milhões de indivíduos não diagnosticados (International Diabetes Federation, 2015).

Para que um indivíduo desenvolva DM2, algumas alterações metabólicas são cruciais: i) incapacidade das células β em compensar o excesso calórico; ii) aumento da secreção de glucagon e redução da resposta à incretina; iii) aumento do tecido adiposo subcutâneo, diminuição dos níveis de adiponectina e inflamação do tecido adiposo; iv) aumento da produção endógena de glicose e; v) desenvolvimento de resistência periférica à insulina (Weir et al., 2001; Kahn, 2003; Leahy,

2005; Prentki e Nolan, 2006; Nolan e Prentki, 2008; Meier e Nauck, 2010; Unger e Scherer, 2010). Sabe-se que os efeitos metabólicos da insulina são mediados principalmente através da fosforilação da proteína cinase B (Akt) (Burgering e Coffey, 1995; Taniguchi et al., 2006) e, uma alteração da sinalização deste hormônio pode resultar em resistência à insulina no fígado, tecido adiposo e no músculo esquelético, que são características da fisiopatologia do DM2 (Schinner et al., 2005). Em longo prazo, os indivíduos diagnosticados com DM2 também podem sofrer complicações microvasculares e macrovasculares (Giacco e Brownlee, 2010; Donath e Shoelson, 2011).

Em geral, as complicações microvasculares são causadas pela hiperglicemia persistente. Embora este processo seja modificado por fatores genéticos de suscetibilidade individual e por fatores de aceleração independentes, como hipertensão e dislipidemia, existem mecanismos que medeiam os efeitos prejudiciais da hiperglicemia, tais como alterações agudas no metabolismo celular e alterações cumulativas em longo prazo em macromoléculas estáveis (Giacco e Brownlee, 2010). O conjunto destas alterações também leva a um aumento na predisposição para o desenvolvimento de alguns tipos de câncer (Cebioglu et al., 2008; Cebioglu et al., 2010).

Os fatores mais conhecidos por estarem associados à resistência à insulina e à progressão da doença são sedentarismo, obesidade, inflamação, disfunção das células β pancreáticas, envelhecimento e estresse oxidativo (Akash et al., 2013). Dentre estes fatores, o estresse oxidativo tem recebido destaque, uma vez que os estados crônicos de hiperglicemia, hiperlipidemia e hiperinsulinemia culminam em danos em proteínas e lipídios, bem como afeta significativamente o ácido desoxirribonucleico (DNA) (Dincer et al., 2002; Giacco e Brownlee, 2010; Broedbaek et al., 2011; Stefani et al., 2015).

1.1.2. Diabetes mellitus tipo 2 e estresse oxidativo

As reações de oxidação e redução são fundamentais na vida aeróbica e no metabolismo celular. Nesse cenário, a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) é um fenômeno necessário e natural do metabolismo, que pode produzir tanto efeitos benéficos quanto nocivos às células (Halliwell e Gutteridge, 2007). Os efeitos benéficos das ERO/ERN ocorrem quando as mesmas são produzidas em baixas ou moderadas concentrações e envolvem papéis fisiológicos, como no mecanismo de defesa e em alguns sistemas de sinalização celular (Thannickal e Fanburg, 2000; Sen, 2001; Gomes et al.,

2012). Os efeitos nocivos são os resultados de um desequilíbrio entre a produção destas espécies e a capacidade antioxidante da célula, caracterizando um quadro de estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2007; Fatehi-Hassanabad et al., 2010; Pandey et al., 2010)

A hiperglicemia, marcador através do qual se diagnostica DM2, promove o aumento na produção de ERO por diversas vias metabólicas (Tiwari et al., 2013). Entretanto, Brownlee desde 2001, defende a teoria do “mecanismo unificado” dos danos celulares causados pela hiperglicemia (Brownlee, 2001).

O aumento dos níveis de glicose na corrente sanguínea pode levar diretamente à formação de ERO (Valko et al., 2004), e em consequência disto, ocorre um aumento da poli ADP-ribose polimerase (PARP), enzima envolvida no reparo de danos ao DNA, e posteriormente, diminuição da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), responsável pela metabolização final da glicose (Brownlee, 2001). O resultado do baixo controle glicêmico é o aumento da carga oxidativa em indivíduos com DM2. Isto acontece porque uma redução da GAPDH implica na ativação da proteína cinase C (PKC), que está relacionada à patogênese de diversas complicações do diabetes (Brownlee, 2005). Além disso, há um aumento na atividade das vias dos polióis e das hexosaminas, e aumento na geração de produtos finais da glicação avançada (AGEs), que são gatilhos para a produção de citocinas pró-inflamatórias (Figura 1) (Brownlee, 2001).

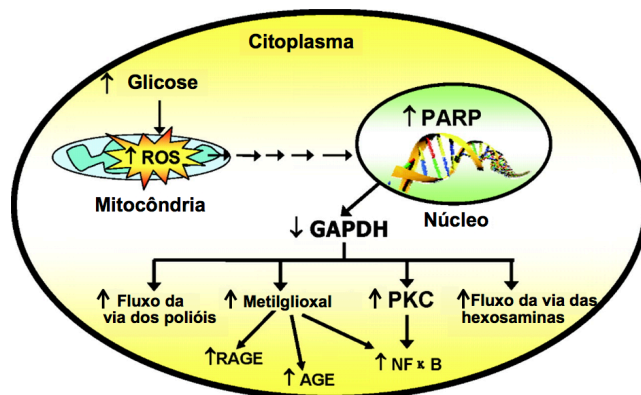


Figura 1. Mecanismo esquemático do dano celular induzido pela hiperglicemia. Adaptado de (Brownlee, 2005). ROS: espécies reativas de oxigênio. PARP: poli ADP-ribose polimerase. GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. RAGE: receptores para produtos finais da glicação avançada. AGE: produtos finais da glicação avançada. PKC: proteína cinase C. NFκB: fator nuclear kappa beta.

O estresse oxidativo pode ser mensurado através da quantificação de várias moléculas, que são relacionadas à geração de radicais livres ou moléculas modificadas através da interação com essas espécies (Santilli et al., 2015). Na tentativa de impedir a ação tóxica das ERO e ERN, as células possuem sistemas de defesa antioxidantes, podendo ser enzimáticos ou não, e atuam na proteção dos sistemas biológicos contra os efeitos lesivos da oxidação excessiva. Entre as enzimas que fazem parte do sistema de defesa antioxidante primário estão a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e tioredoxina redutase (TrxR), e estas são responsáveis pela remoção do excesso, principalmente do ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Adicionalmente, um dos principais antioxidantes não enzimáticos é a glutathiona (GSH), principal e mais abundante tiol não proteico na defesa contra o estresse oxidativo (Lu, 2013). A GSH auxilia na manutenção dos grupamentos tióis das proteínas em estado reduzido, participa no transporte de aminoácidos, atua como coenzima em várias reações enzimáticas e auxilia na prevenção de danos aos tecidos (Tsai et al., 2012). Além disso, é um eficiente antioxidante e está presente em quase todas as células, por isso é considerado um bom biomarcador de desequilíbrio redox em nível celular (Chakravarty e Rizvi, 2011). Indivíduos com DM2 apresentam níveis reduzidos de GSH, podendo então ser um dos fatores envolvidos no dano oxidativo ao DNA, proteínas e lipídios no DM2 (Dincer et al., 2002; Calabrese et al., 2012). Infelizmente, o metabolismo da GSH pode ser prejudicado na presença excessiva de ERO (Morris et al., 2013). Em pacientes refratários ao tratamento com hipoglicemiante oral e até à insulina, ou seja, que possuem um baixo controle glicêmico, há uma grave deficiência na síntese de GSH e isto é atribuído à baixa disponibilidade de seus precursores. Portanto, a suplementação dietética com precursores de GSH poderia melhorar a sua síntese e reduzir o dano oxidativo em biomoléculas frente a hiperglicemia persistente (Sekhar et al., 2011).

1.1.3. Diabetes mellitus tipo 2 e instabilidade genômica

Os resultados de um evento fisiopatológico, geralmente afetam o sistema antioxidante e, não só o dano às biomoléculas pode determinar a severidade de uma doença, mas a genotoxicidade também pode indicar a amplitude do dano oxidativo (Stefani et al., 2015). A estabilidade do genoma é constantemente desafiada pelos danos causados na estrutura primária do DNA por diversos fatores que incluem desde metabólitos

celulares até agentes externos. O dano ao DNA afeta as vias de transcrição e de sinalização e causa erros de replicação e instabilidade genômica (Valko et al., 2006).

Diariamente, estima-se que cada célula sofra mais de 20 mil lesões no DNA, induzidas de maneira endógena (Friedberg, 2003). O dano genômico é provavelmente a mais importante e fundamental causa do desenvolvimento de doenças neoplásicas. Além das ações de agentes genotóxicos já conhecidos, é também estabelecido que alterações genômicas são produzidas por deficiência de micronutrientes, estilo de vida, estresse oxidativo e exposição ocupacional (Blasiak et al, 2004). A mutação é um processo inerente ao desenvolvimento dos seres vivos e necessário para a diversidade e evolução das espécies. Entretanto, algumas mutações podem não ser reparadas, acumulando-se nas células com consequências carcinogênicas (Tubbs e Nussenzweig, 2017).

Tornovsky-Babeay e colegas (2014) sugeriram que a hiperglicemia pode levar a quebras na dupla fita do DNA via estresse oxidativo. Vários estudos já evidenciaram uma associação entre os níveis plasmáticos da glicemia de jejum e as purinas oxidadas, que podem ser avaliadas através do teste cometa com enzimas específicas, neste caso, a formamidopirimidina DNA-glicosilase (FPG) (Collins et al., 1998; Dincer et al., 2002; Pitozzi et al., 2003; Lodovici et al., 2008). Müllner e colaboradores (2013) corroboraram estes dados através dos seus achados, pelo aumento de sítios sensíveis à FPG com o aumento da glicemia de jejum. Este dado suporta a hipótese sugerida por Collins et al. (1998), de que os sítios especificamente sensíveis à FPG refletem danos resultantes da hiperglicemia.

Em indivíduos não diabéticos, os níveis de oxidação global do DNA são menores quando comparados com indivíduos com DM2. Além disso, o controle glicêmico pode ser apontado como um fator determinante da oxidação global do DNA, uma vez que indivíduos com concentrações de hemoglobina glicada (HbA1c), mesmo em 6,5% apresentaram níveis mais elevados de 8-oxoguanina em comparação com indivíduos com HbA1c < 6,5% (Müllner et al., 2013).

Além disso, o estresse oxidativo pode desencadear danos ao DNA, que tem sido associados ao aumento do risco de câncer (Lee e Chan, 2015). Portanto, pacientes com DM mostram uma maior incidência de câncer, com uma forte associação linear entre os níveis de HbA1c e a incidência de câncer gástrico, pancreático, colorretal, de mama e de fígado (Vigneri et al., 2009; De Beer e Liebenberg, 2014).

A associação entre os danos ao DNA, estresse oxidativo e DM2 já está bem descrita na literatura. Na DM2, os danos do DNA aumentam

(Blasiak et al., 2004; Xavier et al., 2014) e o sistema de reparo de DNA é afetado negativamente (Manoel-Caetano et al., 2012; Merezcz et al., 2015). Somados a estas alterações, os marcadores de estresse oxidativo estão aumentados, ao passo que as defesas antioxidantes diminuem (Calabrese et al., 2012; Ha et al., 2012; Gupta et al., 2013; Tupe et al., 2014; Aouacheri et al., 2015), facilitando a instabilidade genômica, que é encontrada em indivíduos com DM2.

Com base no conhecimento de que níveis elevados de estresse oxidativo são lesivos ao organismo e que existem, na natureza, substâncias com propriedades antioxidantes, a literatura passou a investigar o potencial papel de substâncias antioxidantes em reduzir a reatividade das ERO e, conseqüentemente, os danos orgânicos. Portanto estudos voltados para a prevenção e controle de doenças crônicas prevalentes nas populações são fundamentais. No caso do DM2, prevenir a oxidação do DNA é de extrema importância (Dincer et al., 2002; Nishikawa et al., 2003; Broedbaek et al., 2011), ou seja, um bom controle dos fatores que aumentam a produção de ERO é crucial no controle da doença (Müllner et al., 2013).

1.2. Selênio

1.2.1. Selênio: um mineral essencial

Os micronutrientes são componentes da dieta alimentar e fundamentais na prevenção de doenças. Possuem um conjunto de funções essenciais na regulação da homeostase orgânica, são elementos chave nas diferentes vias metabólicas, e a sua ausência pode comprometer o estado de saúde de um indivíduo. Por não serem produzidos no organismo, devem ser obtidos a partir da dieta. Dentre estes microconstituintes da alimentação, está o selênio (WHO/FAO, 2004; Cozzolino, 2016).

O selênio é um mineral traço essencial para a saúde humana e foi descoberto em 1817 pelo químico sueco Jons Jacob Berzelius (Rayman, 2008). Mais de um século após a sua descoberta, Schwarz & Foltz (1957) descreveram a função essencial deste mineral na saúde animal, a partir da observação de que a adição de selênio na dieta de ratos com deficiência de vitamina E, prevenia a necrose hepática. A partir disto, as pesquisas e os estudos passaram a se concentrar no papel metabólico e nas conseqüências de sua deficiência. Anos depois, Flohé e colaboradores (Flohe et al., 1973) identificaram o selênio como cofator indispensável para o funcionamento da enzima GPx, destacando a importância desse mineral (Kohrl et al., 2000). Em seres humanos, sua essencialidade foi

comprovada em 1979, quando um paciente com distrofia muscular, em razão de longa permanência sob nutrição parenteral total, apresentou melhora do quadro clínico após suplementação com o mineral (Brown e Arthur, 2001).

O selênio é um elemento chave das selenoproteínas, e atua como um antioxidante extremamente importante em diversos tipos celulares (Mukherjee et al., 1998; Beckett e Arthur, 2005). Até o momento, pelo menos 25 selenoproteínas já foram descritas e estas, possuem diversas funções, dentre as quais o seu papel antioxidante, participação na conversão de tiroxina em triiodotironina, proteção contra ação nociva de metais pesados, prevenção de doenças crônicas não transmissíveis, aumento da resistência pelo sistema imunológico e participação na manutenção da estabilidade genômica (Navarro-Alarcon e Cabrera-Vique, 2008; Holben e Smith, 1999; Ferguson et al., 2012).

1.2.2. Biodisponibilidade do selênio, recomendações dietéticas e toxicidade

A biodisponibilidade de um nutriente ingerido pode ser definida como sua acessibilidade aos processos metabólicos e fisiológicos normais. A biodisponibilidade influencia o efeito benéfico de um nutriente em níveis fisiológicos de ingestão, mas também pode afetar a natureza e a gravidade da toxicidade quando a ingestão for excessiva. A biodisponibilidade pode ser afetada por alguns fatores que incluem a concentração e a forma química do nutriente, a nutrição e a saúde do indivíduo e as perdas por excreção. No caso dos minerais e elementos-traço, quando ingeridos através dos alimentos ou da água, frequentemente são menos rapidamente absorvidos (Cozzolino, 2009).

Quanto à sua forma química, o selênio pode ser ingerido tanto na sua forma orgânica, quanto na sua forma inorgânica. As formas inorgânicas são sais de selênio, como selenato e selenito. As formas orgânicas, apresentadas na Figura 2, são a selenometionina (SeMet) e a selenocisteína (SeCis), que podem ser incorporadas as proteínas (Roman et al., 2014).

A biodisponibilidade de selênio a partir de certos alimentos e a sua eficácia no aumento do status deste mineral tem sido investigada, como por exemplo, em pão de trigo enriquecido com selênio, peixes e carnes vermelhas (Van Der Torre et al., 1991; Fox et al., 2004; Thomson, 2004). No entanto, o teor de selênio nestes alimentos é relativamente baixo, de maneira que grandes quantidades deveriam ser consumidas para

atingir níveis ótimos deste micronutriente em seres humanos (Thomson et al., 2008).

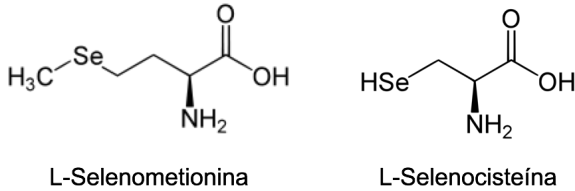


Figura 2. Formas orgânicas de selênio obtidas através da alimentação.

A concentração de selênio nos alimentos dependerá da região geográfica e do nível e disponibilidade do selênio encontrado no solo onde foram cultivados (Ferreira et al., 2002). Castilho (2016), ao avaliar os níveis de selênio em diversas amostras de solo coletadas em doze estados brasileiros, encontrou concentrações de selênio mais elevadas nos solos provenientes da região Norte e mais escassas nos solos da região Sul. Adicionadas a estas informações, Maihara e colaboradores (2004) perceberam que no estado de São Paulo por exemplo, crianças, adultos e idosos não atingiam os valores de ingestão dietética recomendada (RDA) de selênio, que é de 55 µg/dia. A RDA é o nível de ingestão dietética diária suficiente para atender às necessidades de um nutriente de praticamente todos (97% a 98%) os indivíduos saudáveis de um determinado grupo de mesmo gênero e estágio de vida.

De um lado, a deficiência de selênio está associada à doença de Keshan, uma cardiomiopatia (Chen, 2012), e à doença de Kashin-Beck, uma doença osteoarticular (Sokoloff, 1988). Por outro lado, tal como acontece com o ferro, a funcionalidade do selênio acontece em forma de "U", ao passo que, tanto baixos quanto altos níveis podem ser prejudiciais à saúde. Diferente de muitos outros micronutrientes, o selênio possui uma faixa estreita entre os níveis de deficiência e toxicidade (Ferguson et al., 2012; Reich e Hondal, 2016). Alguns pesquisadores sugerem que os sintomas mais tóxicos ocorrem com ingestões que variam de aproximadamente 3 a 7 mg/dia, e os sintomas moderados, com cerca de 1,3 mg/dia. Esse último valor relaciona-se a uma concentração de selênio no sangue de 1350 µg/L (Institute of Medicine, 2000; Navarro-Alarcon e Cabrera-Vique, 2008).

Ambas as formas orgânica e inorgânica são igualmente tóxicas em casos de ingestão excessiva crônica. Entretanto, é importante conhecer a forma do selênio ingerido porque o selênio inorgânico causa toxicidade em concentrações muito inferiores à SeMet, que é orgânica (Institute of Medicine, 2000; Prabhu e Lei, 2016). Sendo assim, ressalta-se a importância do limite superior tolerável de ingestão (UL), que é o valor mais alto de ingestão diária continuada de um nutriente, que aparentemente não oferece risco de efeito adverso à saúde para a maioria dos indivíduos em um determinado estágio de vida ou gênero. O UL não é um nível de ingestão recomendado, mas foi estabelecido a partir do crescimento da prática de fortificação de alimentos e do uso de suplementos alimentares. Atualmente, os valores indicados pelo UL para o selênio são de 400 μg ao dia (Institute of Medicine, 2000; Monsen, 2000; Cozzolino, 2009).

1.2.3. O papel antioxidante do selênio

Dentre as várias funções deste mineral no organismo, talvez uma das mais estudadas seja a de aumentar as defesas antioxidantes (Tinggi, 2008). De maneira geral, os antioxidantes são substâncias que atuam na prevenção ou redução dos danos celulares, por impedir ou neutralizar as ERO, e com isso, auxiliar no estado redox celular (Chan et al., 2016).

Esta capacidade de atenuar o estresse oxidativo ocorre através de selenoproteínas que funcionam como antioxidantes e incluem as famílias das GPx e TrxR, as quais possuem uma SeCis em seu sítio ativo, tornando-as adequadas para reações de óxido-redução (Mattmiller et al., 2013). A GPx reduz peróxido de hidrogênio (H_2O_2), lipoperóxidos e outros hidroperóxidos orgânicos (ROOH) a compostos hidroxilados, utilizando GSH como doador de hidrogênio. Subsequente à esta reação, a glutationa redutase (GR) catalisa a redução da glutationa oxidada (GSSG) de volta à GSH, utilizando elétron NADPH (Figura 3) (Huang et al., 2012).

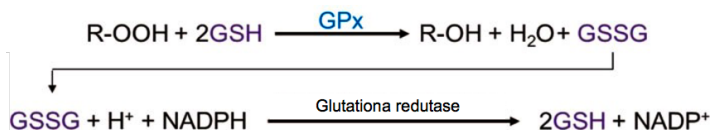


Figura 3. Reação geral do mecanismo antioxidante da glutaciona peroxidase (GPx). Adaptado de Mattmiller et al., 2013. GPx: glutaciona peroxidase.

A atividade da GPx dependerá do teor de selênio obtido a partir da dieta e está positivamente correlacionada com a ingestão de selênio (Bermingham et al., 2014). Por esse motivo, a atividade da GPx no sangue é um indicador amplamente utilizado para avaliar o estado nutricional relativo ao selênio e o status antioxidante, bem como um parâmetro para avaliar a resposta a sua administração terapêutica (Ibrahim et al., 2015; Meplan, 2015). Uma vez que o estresse oxidativo tem parte na fisiopatologia de muitas doenças, os efeitos antioxidantes mediados pelo selênio auxiliam na prevenção e/ou redução dos danos causados por esta condição (Valko et al, 2006).

1.2.4. O papel do selênio na estabilidade genômica

As ERO, tais como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), H_2O_2 e radical hidroxila (OH^{\bullet}) atacam as bases nitrogenadas do DNA resultando em potencial erro de transcrição de sequência de DNA. Nas células, existem vias de reparo de DNA que evitam a permanência destes danos e ajudam a manter a estabilidade do genoma, auxiliando na prevenção do câncer (Cooke et al., 2005).

Muitos componentes alimentares, tais como flavonóides e isotiocianatos, vitaminas C e E, e minerais como o selênio auxiliam na neutralização das ERO e estimulam as vias de reparo de dano oxidativo ao genoma. Assim, uma deficiência destes microconstituintes dietéticos poderia prejudicar as vias de reparo de DNA (Friso e Choi, 2005; Ferguson et al., 2015). Além disso, os estudos propõem que a redução dos danos ao DNA juntamente com um aumento na sua capacidade de reparo pode ser alcançada através dos alimentos como um todo, e não somente por meio de micronutrientes e fitoquímicos isolados (Slyskova et al, 2014).

Revisando o papel do selênio na manutenção da estabilidade genômica, Ferguson et al. (2012), descreveram que o uso moderado de certos compostos de selênio em testes experimentais com tecidos em meios de cultura ou em dietas de animais e seres humanos pode proteger contra a formação de adutos de DNA, quebras cromossômicas ou de DNA e contra o ganho ou perda de cromossomos. Além destes, podem haver efeitos gerais com impacto sobre a capacidade de reparo do DNA, como por exemplo, causar modificações pós-traducionais, alterando a atividade das enzimas de reparo. Várias glicosilases são reguladas por acetilação e/ou fosforilação e alguns autores já descreveram que o selênio altera a atividade de histonas cinases e desacetilases (Zeng, 2002; Xiang et al., 2008). Zeng e colaboradores (2003) demonstraram que o selênio

fornecido à ratos sob a forma de brócolis enriquecido em selênio, pode estimular a tradução da GPx1 e a expressão da Gadd45, uma proteína envolvida na replicação e reparo de danos do DNA. A Figura 4 apresenta os possíveis mecanismos pelas quais o selênio poderia auxiliar na manutenção da estabilidade genômica.

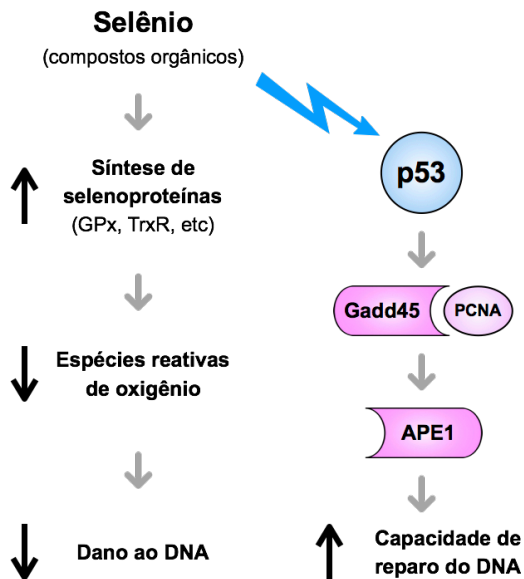


Figura 4. Mecanismos de ação propostos para os efeitos inerentes ao selênio na capacidade de redução dos danos ao DNA. Adaptada de Bera et al., 2013 e Jung et al., 2013. GPx: glutationa peroxidase. TrxR: tiorredoxina redutase. Gadd45: proteína induzida por dano ao DNA e parada de crescimento. PCNA: antígeno nuclear da proliferação celular. APE1: endonuclease apurínica 1.

Uma outra proteína envolvida no processo de reparo do DNA é a histona H2AX, que quando fosforilada, exerce um papel fundamental no recrutamento de outras proteínas que atuam no reparo de quebras da dupla fita de DNA (Bassing et al., 2002; Celeste et al., 2002; Celeste et al., 2003) e, quando esta proteína é reduzida, o processo de reparo pode decair significativamente. Jerome-Morais e colaboradores (2013) demonstraram que o selênio pode aumentar a fosforilação da histona H2AX, funcionando como um arcabouço para o recrutamento de enzimas

de reparo do DNA (Lowndes e Toh, 2005; Thiriet e Hayes, 2005). Consequentemente, existem fortes argumentos para aumentar a ingestão de selênio e interesses em alimentos que contenham quantidades elevadas deste mineral (Vonderheide et al., 2002).

1.2.5. Selênio e diabetes mellitus tipo 2

A relação que o selênio possui com as doenças crônicas se deve a sua participação na estrutura das selenoproteínas. Como abordado anteriormente, a GPx tem o papel de reduzir H_2O_2 em água e oxigênio. Neste contexto, o selênio pode exercer grande influência sobre o binômio saúde e doença. Assim, o sistema antioxidante está diretamente ligado aos fatores ambientais e à ingestão de nutrientes e minerais como o selênio (Roberts e Sindhu, 2009).

O potencial das selenoproteínas em proteger contra o estresse oxidativo levou à expectativa de que o selênio poderia proteger contra o DM2, e de fato num estudo da década de 1990, o selênio mostrou ter efeitos antidiabéticos e insulino-miméticos (Becker et al., 1996). Entretanto, é preciso ter imparcialidade ao discutir o estado nutricional relativo ao selênio e o risco para o desenvolvimento de DM2.

Mueller et al. (2009) em uma revisão sobre selênio e diabetes, discutiram vários estudos que apontam efeitos adversos do elevado status de selênio ou do seu uso permanente na forma de suplementos, no diabetes e na síndrome metabólica. Estudos realizados com a população europeia também apresentaram resultados conflitantes, mostrando tanto efeitos adversos quanto benéficos do selênio em relação ao DM2 (Kornhauser et al., 2008; Akbaraly et al., 2010; Stranges et al., 2010).

Uma meta-análise conduzida por Mao et al. (2014) concluiu que a aplicação rotineira de suplementação de selênio para prevenção de DM2 entre participantes caucasianos não é sustentada. Outro estudo observou que a suplementação de selênio não foi capaz de prevenir o DM2 (Stranges et al., 2007). Curiosamente, Rayman et al. (2012) viram que adultos mais velhos com um status de selênio relativamente baixo não apresentaram efeitos diabetogênicos após uma suplementação durante seis meses com 100, 200 ou 300 μg de selênio/dia. Vários fatores importantes, como o status de selênio dos participantes, dosagem de selênio, etnia e duração do estudo podem afetar as associações entre suplementação de selênio e marcadores do metabolismo da insulina.

Embora estudos anteriores tenham observado que a suplementação de selênio não está associada à menor risco de DM2, dados mais recentes acerca deste tema foram notados por Tabrizi et al.

(2017). Os autores conduziram uma revisão sistemática e meta-análise de ensaios clínicos randomizados para resumir o efeito da administração de selênio no metabolismo da glicose e nos perfis lipídicos em pacientes com doenças relacionadas à síndrome metabólica, como por exemplo, a DM2. Os resultados dos cinco estudos incluídos neste trabalho, sendo três destes com DM2, mostraram que a suplementação de selênio reduziu significativamente os níveis de insulina e o índice de verificação quantitativa da sensibilidade à insulina (QUICKI). Por outro lado, a suplementação de selênio não teve efeitos benéficos em outros parâmetros da homeostase de glicose, como glicemia de jejum, avaliação do modelo de homeostase de resistência à insulina (HOMA IR) e marcadores do perfil lipídico, como triglicerídeos (TG), colesterol total (CT), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL).

1.2.6. Castanha-do-Brasil: a melhor fonte dietética de selênio

Até o momento, a melhor fonte alimentar vegetal de selênio é a castanha-do-Brasil, apresentando concentrações médias relatadas na literatura que variam de 8 a 83 µg de selênio por grama de castanha (Chang et al., 1995; Vonderheide et al., 2002; Kannamkumarath et al., 2002; Bodó et al., 2003; Dumont et al., 2006; Ros, 2009).

A castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*, H.B.K., família Lecythidaceae) é uma planta nativa da região Amazônica, reconhecida pelo seu alto valor nutricional devido ao seu alto conteúdo de lipídios, cerca de 50 a 70%, além de conter proteínas (10 a 20%) e carboidratos (10 a 20%) (Elias e Bressani, 1961; Gonçalves et al., 2009). Esta semente também é rica em outros compostos bioativos tais como ácidos graxos essenciais (principalmente os ácidos oleico e linoleico), aminoácidos contendo enxofre (em particular a metionina e cisteína), vitaminas (A, E e folato), fibras, compostos fenólicos e minerais, tais como zinco, potássio e especialmente, o selênio. A castanha-do-Brasil é capaz de promover diversos benefícios à saúde humana, apresentando inclusive propriedades anticancerígenas (Ip e Lisk, 1994). Este efeito parece estar relacionado ao elevado conteúdo de selênio, principalmente presente sob a forma de SeMet, que é uma espécie de selênio altamente biodisponível (Kannamkumarath et al., 2002).

Thomson e colaboradores (2008) realizaram um estudo para avaliar a eficácia da castanha-do-Brasil em aumentar o status de selênio em comparação com um suplemento de selênio (SeMet) na dose de 100

µg, em adultos deficientes deste micronutriente. Ao final de 12 semanas de tratamento, o consumo de duas castanhas-do-Brasil por dia, contendo em média 26 µg de selênio cada, foi tão eficaz em aumentar o status de selênio e a atividade da GPx quanto a suplementação com 100 µg de SeMet ao dia. O estudo ainda sugere que o selênio encontrado na castanha pode apresentar uma melhor biodisponibilidade do que o suplemento de SeMet em si, uma vez que a atividade da GPx no sangue foi maior no grupo que consumiu a castanha em comparação com o grupo suplementado com SeMet (Thomson et al., 2008).

Maranhão et al. (2011) sugeriram que a ingestão em curto prazo (16 semanas) da castanha-do-Brasil por um grupo de adolescentes obesas influencia positivamente o perfil lipídico e a função microvascular, possivelmente devido aos altos níveis de substâncias bioativas e ácidos graxos insaturados. Dados semelhantes também foram demonstrados por Cominetti e colaboradores (2012), em que o consumo de uma castanha do Brasil (290 µg de selênio) ao dia durante oito semanas, por mulheres obesas, além da eficácia em aumentar o status de selênio, melhorou a atividade da GPx e reduziu o risco aterogênico, avaliado através do perfil lipídico, especialmente os níveis de HDL, que foram aumentados.

Os compostos bioativos encontrados em outras sementes oleaginosas (Kocycit et al., 2006) e seus efeitos sobre o controle glicêmico (Kendall et al., 2010), a inflamação e a função endotelial (Ros et al., 2004; Ros, 2009) também já foram descritos. O consumo de amêndoas, por exemplo, foi capaz de reduzir os níveis de glicemia e insulina pós-prandial, além de diminuir o dano oxidativo em indivíduos saudáveis, após realizarem refeições ricas em carboidratos (Jenkins et al., 2006).

1.3. Justificativa

Estudos epidemiológicos indicam que a incidência do DM2 e pré-diabetes pode ser reduzida através de mudanças no estilo de vida, como o não-tabagismo, a prática de atividade física, a reeducação alimentar e a perda de peso (Hu et al., 2001; Laaksonen et al., 2010). Estes estudos dão respaldo a importância das influências ambientais na patogênese da DM2.

A ingestão de micronutrientes a partir de fontes alimentares é preferível às práticas de suplementação alternativas quando o objetivo é melhorar o estado nutricional de uma população, pois os alimentos apresentam baixo custo, são sustentáveis e têm menor risco de toxicidade (Finley, 2005). Dado o custo relativamente baixo, a alta

biodisponibilidade, e o aumento da popularidade da castanha-do-Brasil, a inclusão deste alimento rico em selênio na dieta parece ser uma opção adequada para melhorar o status de selênio em humanos. Uma simples recomendação de saúde pública para incluir apenas 1 castanha-do-Brasil na dieta evita a necessidade de fortificação de alimentos ou o uso de suplementos de alto custo com o intuito de melhorar os níveis séricos de selênio (Thomson et al., 2008).

Em contrapartida, a epidemia do DM2, juntamente com os seus elevados custos humanos e econômicos, não está mostrando sinais de redução e, portanto, novas abordagens são urgentemente necessárias para prevenir e retardar a progressão e limitar as consequências desta doença. Até o momento, não existem estudos que relatam os efeitos da ingestão de castanha-do-Brasil sobre o estresse oxidativo e instabilidade genômica de indivíduos diagnosticados com DM2. No entanto, os efeitos desta semente já descritos na literatura mostraram-se benéficos em outras doenças. Com base na literatura apresentada, que confirma a existência de um grande descontrole metabólico, além de uma instabilidade genômica nos indivíduos diagnosticados com DM2 e, devido ao fato da utilização de nutrientes através de fontes alimentares apresentar uma melhor biodisponibilidade dos mesmos, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da ingestão de selênio através da castanha-do-Brasil sobre a modulação de parâmetros bioquímicos e genéticos em indivíduos com DM2.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar os efeitos da ingestão de selênio através do consumo de castanha-do-Brasil sobre a modulação de parâmetros bioquímicos e genéticos em indivíduos com DM2.

2.2. Objetivos específicos

1. Avaliar o estado nutricional relativo ao selênio antes e depois da ingestão de castanha-do-Brasil em soro de indivíduos com DM2;

2. Avaliar os efeitos da ingestão de selênio através da castanha-do-Brasil sobre os perfis glicêmico, lipídico, inflamatório, hepático, renal em indivíduos com DM2;

3. Investigar os efeitos da ingestão de selênio através da castanha-do-Brasil sobre indicadores da produção de oxidantes em plasma de indivíduos com DM2;

4. Investigar os efeitos da ingestão de selênio através da castanha-do-Brasil sobre as defesas antioxidantes em plasma de indivíduos com DM2;

5. Investigar os efeitos da ingestão de selênio através da castanha-do-Brasil sobre marcadores de dano oxidativo a macromoléculas em plasma de indivíduos com DM2;

6. Analisar os efeitos da ingestão de selênio através da castanha-do-Brasil sobre os danos ao DNA em sangue de indivíduos com DM2;

7. Analisar os efeitos da ingestão de selênio através da castanha-do-Brasil sobre o número de micronúcleos (MN) em células esfoliadas da mucosa bucal de indivíduos com DM2;

8. Verificar se existe associação entre os níveis séricos de selênio *versus* perfil glicêmico, produção de ERO e ERN, dano oxidativo a macromoléculas, defesas antioxidantes, danos ao DNA e número de micronúcleos em indivíduos com DM2.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

3.1.1. Classificação e local de realização da pesquisa

Este estudo classifica-se como do tipo experimental, com abordagem quantitativa e de corte longitudinal.

Este trabalho foi realizado nas instalações das Clínicas Integradas da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), uma das estruturas da Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde (UNASAU), e no Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LABIM), um dos laboratórios do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da UNESC, em colaboração com o Departamento de Saúde Ambiental do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (Porto, Portugal) e Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício, do PPGCS da UNESC.

3.1.2. Considerações éticas

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da UNESC, de acordo a Resolução nº 466 de 2012 do Conselho Nacional de Saúde, sendo aprovado sob o parecer número 1.086.099 (Anexo I). Todos os indivíduos deste estudo tiveram sua participação de maneira voluntária, com prévia autorização dos mesmos e da UNESC, antes de serem incluídos na pesquisa. Além disso, foi garantido o sigilo dos dados dos participantes.

3.1.3. Cálculo da amostra

O cálculo do tamanho mínimo da amostra foi realizado por meio do software WinPEPI (<http://www.brixtonhealth.com/pepi4windows.html>) (Abramson, 2011). Para o cálculo do tamanho mínimo da amostra utilizou-se um nível de significância $\alpha = 0,05$ e poder de 0,80. Li e colaboradores (2007) encontraram uma redução no dano do DNA de $5,2 \pm 10,07\%$, dados estes, que foram também utilizados como insumos para o cálculo do tamanho mínimo da amostra, que resultou em 64 observações, ou seja, 32 antes e 32 depois do consumo de castanha-do-Brasil. Considerando uma perda amostral de 50% das observações, o número total de observações necessário neste estudo foi de no mínimo 96, ou seja, 48 antes e 48 depois.

Contudo, este estudo alcançou 148 observações, isto é, 74 antes e 74 depois do consumo de castanha-do-Brasil.

3.1.4. Critérios de inclusão

Foram incluídos neste estudo pacientes diagnosticados com DM2 há pelo menos cinco anos, de ambos os sexos, inscritos nos projetos de extensão do Serviço de Enfermagem das Clínicas Integradas da UNESC, com sobrepeso ou obesidade e peso estável nos últimos seis meses, sem intenção de mudança de hábitos de vida, sem uso de suplementos alimentares, sem consumo regular de castanha-do-Brasil, não alérgicos às oleaginosas, não fumantes, com idade entre 45 e 80 anos, e que aceitaram assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo II), o qual descreve informações sobre o projeto, de acordo com a Resolução CNS nº 466 de 2012.

3.1.5. Critérios de exclusão

Foram excluídos desta pesquisa os pacientes que interromperam o tratamento proposto por este estudo, que iniciaram outro tratamento paralelo ao proposto pelo estudo, e que apresentaram alguma complicação microvascular e/ou macrovascular durante o período experimental.

3.1.6. População estudada

Esta pesquisa foi realizada com indivíduos com diagnóstico de DM2 há pelo menos cinco anos, voluntários, de ambos os sexos, com idade entre 45 e 80 anos, inscritos nos projetos de extensão do Serviço de Enfermagem das Clínicas Integradas da UNASAU da UNESC. Os participantes foram recrutados a partir do acesso aos prontuários armazenados nas Clínicas Integradas, para a detecção de diagnóstico de DM2 há pelo menos cinco anos e acesso aos contatos pessoais dos participantes para agendamento da explicação detalhada do estudo e procedimentos da pesquisa.

O primeiro contato com os indivíduos pré-selecionados foi necessário para verificar se os mesmos preenchiam os critérios de inclusão. Tais critérios elegeram 133 pacientes que, após serem informados do propósito do presente estudo, dos procedimentos da pesquisa, de todos os seus direitos, riscos e benefícios e da participação não obrigatória foram convidados a participar desta pesquisa. Todos os

133 indivíduos deram seu consentimento por escrito, sendo então contatados posteriormente por telefone, para agendamento da primeira coleta de amostra dos materiais biológicos e entrega das castanhas.

Todos os participantes apresentavam peso corporal estável, hábitos alimentares e níveis de atividade física constantes por no mínimo quatro semanas que antecederam o início do estudo. Todos os tratamentos adotados anteriormente ao estudo pelos participantes foram mantidos e inalterados, e todos os participantes usavam diariamente insulina, metformina e estatina.

Ao término da segunda coleta de sangue foram contabilizados 74 participantes que compareceram às duas coletas, fizeram o consumo corretamente, e não apresentaram nenhuma alteração de saúde nesse período (Figura 5).

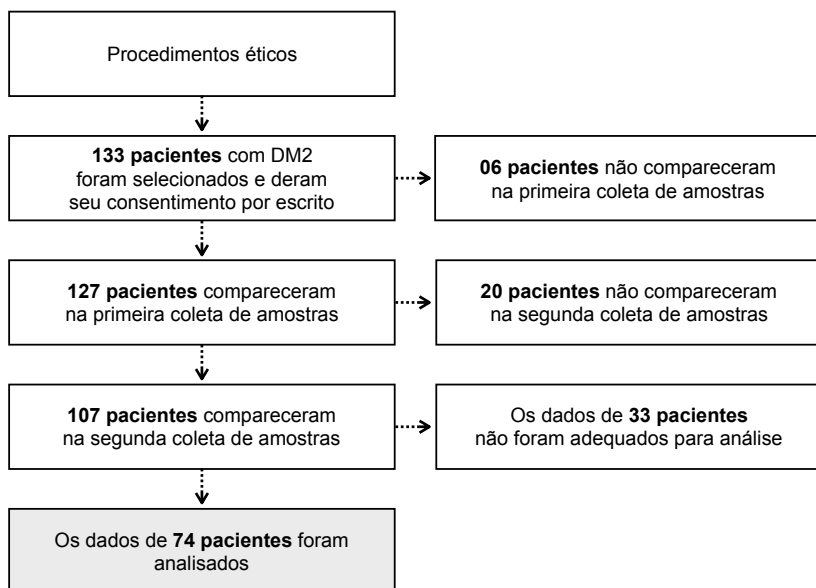


Figura 5. Fluxograma geral da população estudada.

3.1.7. Protocolo experimental

O estudo contou com duas etapas (Figura 6), entre as quais houve o consumo diário de uma castanha-do-Brasil por um período de seis meses (Rita Cardoso et al., 2016).

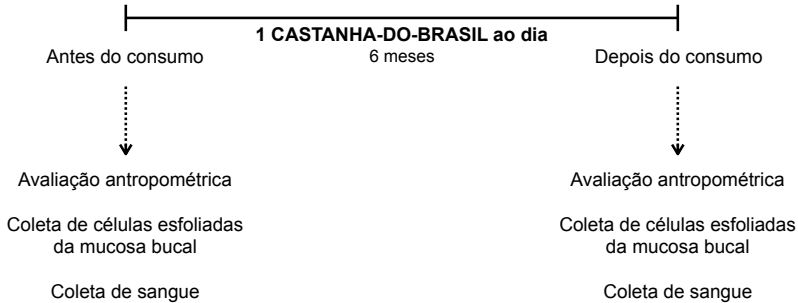


Figura 6. Protocolo experimental.

Em cada etapa, sendo a primeira imediatamente antes do início do consumo da castanha-do-Brasil, e a segunda, imediatamente após o término dos seis meses de consumo das castanhas, foram realizadas avaliação antropométrica e coleta de amostras de sangue e de células esfoliadas da mucosa bucal.

A cada 30 dias, os pesquisadores forneciam a cada participante 30 castanhas, juntamente com as informações nutricionais, as orientações e um calendário para controle do consumo. As castanhas foram entregues em embalagens de plástico, contendo uma castanha por embalagem.

As castanhas-do-Brasil utilizadas no estudo eram orgânicas, originárias de Itacoatiara, no Amazonas, e foram em parte cedidas e em parte adquiridas do Instituto Excelsa. Os dados relacionados à composição centesimal e à concentração de selênio desta castanha estão apresentados na Tabela 1. O peso médio de cada castanha foi de 3,7 g, portanto cada unidade forneceu em torno de 213,7 µg de selênio.

Tabela 1. Composição centesimal e concentração de selênio das castanhas-do-Brasil utilizadas no estudo

| Nutriente | Média ± DP |
|------------------|-------------------|
| Energia, kCal | 714,79 ± 31,56 |
| Carboidratos, g | 10,89 ± 5,54 |
| Proteínas, g | 16,27 ± 0,07 |
| Lipídios, g | 67,35 ± 5,88 |
| Umidade, % | 2,42 ± 0,05 |
| Cinzas, % | 3,07 ± 1,07 |
| Selênio, µg/g | 57,75 ± 5,96 |

DP: desvio padrão. Fonte: Cardoso, 2014.

Periodicamente os pesquisadores entravam em contato pessoalmente ou por telefone com o intuito de verificar a adesão ao consumo. Todos os participantes foram orientados a devolver as castanhas não com sumidas, e a adesão foi considerada quando houve um consumo mínimo de 85% das castanhas. Todos os participantes foram orientados para que não houvesse alterações no padrão alimentar e uso de novos suplementos e/ou medicamentos durante o período de estudo.

3.2. Métodos

A Figura 7 apresenta o esquema das análises que foram realizadas nesta pesquisa.

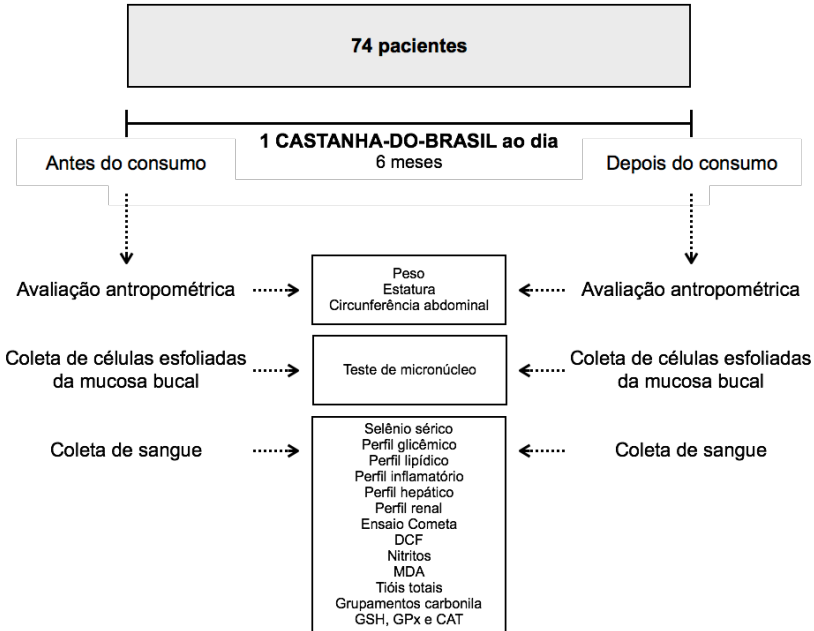


Figura 7. Resumo das análises realizadas neste estudo.

3.2.1. Avaliação antropométrica

A altura e o peso corporal foram mensurados utilizando-se uma balança digital com estadiômetro (Welmy®, modelo W200/5). O índice de massa corporal (IMC) foi calculado através da divisão do peso em kg pela altura em metros elevada ao quadrado, e o resultado expresso em kg/m^2 .

Os dados da circunferência abdominal foram coletados no maior perímetro abdominal (entre o rebordo costal inferior e a crista ilíaca), utilizando-se uma fita métrica. Conforme recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS), solicitou-se ao paciente que ficasse em posição

supina, fizesse uma inspiração profunda e, ao final da expiração, foi coletada a medida, expressa em cm.

3.2.2. Coleta, transporte, processamento e armazenamento das amostras biológicas

Nas duas fases do estudo, as coletas dos materiais biológicos foram realizadas nas dependências das Clínicas Integradas da UNASAU da UNESC.

A coleta do sangue foi feita através de punção venosa periférica (membros superiores, 30 mL/ indivíduo), após 12 h de jejum. Foram utilizadas seringas plásticas descartáveis e agulhas de aço inoxidável, estéreis e descartáveis. Devido às diversas dosagens que foram feitas, o sangue foi coletado em tubos específicos para coleta à vácuo, como segue: tubo contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), tubo contendo heparina sódica, tubo seco livre de metais e, tubo sem aditivos. O sangue foi imediatamente armazenado a 4°C e transportado para o LABIM (UNESC).

Os tubos de coleta à vácuo sem aditivos e contendo EDTA foram encaminhados para um laboratório de análises clínicas terceirizado para avaliação dos perfis glicêmico, lipídico, hepático, renal, tireoidiano e inflamatório.

As amostras de sangue dos tubos de coleta à vácuo livre de metais foram centrifugadas a 3000 x g durante 10 min. Após a centrifugação, o soro foi fracionado em dois microtubos contendo 1,5 mL de soro cada e, congelados a -80°C. Ao final das duas fases do estudo, o soro foi enviado para um laboratório terceirizado para quantificação dos níveis de selênio.

As amostras de sangue coletadas em tubos contendo heparina sódica foram utilizadas para obtenção de sangue total e plasma. Inicialmente, uma pequena parte destas amostras de sangue (500 µL) foram criopreservadas para posterior realização do ensaio cometa. Para a criopreservação, adicionou-se uma quantidade igual de 1:4 (v/v) de DMSO e RPMI 1640 às amostras de sangue. Esta mistura de sangue com solução de congelamento foi então armazenada em alíquotas de 200 µL cada, a -80°C. Ao final das coletas de sangue, as amostras foram exportadas por uma empresa especializada, para o Departamento de Saúde Ambiental, do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, situado na cidade do Porto (Portugal) e mantiveram-se armazenadas a -80°C até o momento do uso. Após separar as alíquotas de 500 µL para o procedimento supracitado, o sangue coletado nos tubos heparinizados foi levado à centrifugação a 3000 x g por 10 min, a 4°C. Após a

centrifugação, o plasma foi fracionado em dois microtubos contendo 1 mL de plasma cada e, congelados a -80°C para posterior análise dos parâmetros de estresse oxidativo.

A coleta das células esfoliadas da mucosa bucal foi realizada por meio de uma escova citológica (Cytobrush®) retirando-se a amostra do epitélio bucal direito e esquerdo, após um enxágue bucal realizado com água, com a função de retirar material bruto que poderia dificultar no momento da análise microscópica. As células coletadas foram depositadas em tubos cônicos de 15 mL contendo solução fixadora Saccomanno (etanol 50% (v/v) e polietileno-glicol 2% (v/v) diluídos em água destilada) e transportadas até o LABIM, onde foram processadas no mesmo dia da coleta conforme descrito previamente por (Thomas et al., 2009).

3.2.3. Determinação das concentrações séricas de selênio

Os níveis séricos de selênio foram quantificados através de espectrofotometria de absorção atômica com forno de grafite (com correção de Zeeman), como descrito anteriormente por Jacobson e Lockitch (1988).

3.2.4. Análises bioquímicas

As concentrações séricas de glicose, insulina, HbA1c, CT, HDL, TG, aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamilttransferase (GGT), creatinina, uréia e homocisteína foram avaliadas imediatamente após a coleta das amostras de sangue dos participantes do estudo. As concentrações séricas de proteína C reativa ultrasensível (PCR-us) foram avaliadas por um laboratório de suporte em até 24 h após a realização da coleta das amostras de sangue. As análises foram realizadas antes do consumo e ao final da intervenção, em parceria com um laboratório de análises clínicas de Criciúma (SC, Brasil).

A porcentagem de HbA1c foi analisada a partir das amostras de sangue com EDTA, por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). A glicemia de jejum (mg/dL), AST (U/L), ALT (U/L) e uréia (mg/dL) foram quantificadas pelo método enzimático. As concentrações de CT (mg/dL) e TG (mg/dL) foram mensurados pelo método enzimático colorimétrico. As concentrações de HDL (mg/dL) foram quantificadas pelo método enzimático fotométrico. Os níveis de creatinina (mg/dL) e GGT (U/L) foram determinados pelo método cinético. As concentrações de insulina ($\mu\text{UI/mL}$) foram determinadas por quimioluminescência. Os

níveis de homocisteína ($\mu\text{mol/L}$) foram mensurados por imunoenensaio quimioluminescente de micropartículas. Por último, a PCR-us (mg/L) foi quantificada por imunoturbidimetria.

A partir dos valores obtidos de glicemia de jejum e insulina foram calculados os valores de HOMA IR, que avalia a resistência insulínica, conforme a fórmula a seguir: (insulina de jejum, $\mu\text{UI/mL}$ x glicemia de jejum, mmol/L) / 22,5. Além disso, foram calculados os valores de HOMA β para a avaliação da função das células beta pancreáticas, conforme a fórmula a seguir: (20 x insulina de jejum, $\mu\text{UI/mL}$) / (glicemia de jejum, $\text{mmol/L} - 3,5$) (Matthews et al., 1985; Geloneze et al., 2006). Por último, também foram calculados os valores do QUICKI, que avalia sensibilidade a insulina, conforme a fórmula a seguir: $1 / [\log(\text{insulina de jejum, } \mu\text{UI/mL}) + \log(\text{glicemia de jejum, mg/dL})]$ (Katz et al., 2000).

Os valores do LDL foram estimados a partir da fórmula de Friedewald. A fórmula de Friedewald calcula o valor de LDL utilizando os valores de CT, HDL e TG, conforme a fórmula a seguir: $\text{LDL} = \text{CT} - \text{HDL} - \text{VLDL}$, onde: $\text{VLDL, mg/dL} = \text{TG, mg/dL} / 5$. O cálculo do colesterol não-HDL utiliza os valores de colesterol total e HDL, e é obtido a partir da diferença entre esses dois valores (Friedewald et al., 1972; Contois et al., 2011). Utilizando-se dos valores de TG e HDL, calculou-se também a razão TG/HDL, pela fórmula: $\text{TG, mg/dL} / \text{HDL, mg/dL}$, também denominada Índice de Castelli I.

A filtração glomerular estimada foi calculada a partir do *clearance* de creatinina baseada na fórmula de Cockcroft-Gault = $[(140 - \text{idade}) \times \text{peso}] / (72 \times \text{creatinina sérica, mg/dL})$, expresso ml/min/1,73m^2 . Para mulheres, multiplica-se ainda o resultado final por 0,85 (Cockcroft e Gault, 1976).

3.2.5. Indicadores da produção de oxidantes

Níveis de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF): a produção de hidroperóxidos no plasma foi determinada pela formação intracelular de DCF, a partir da oxidação do diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$) por ERO, de acordo com o método descrito anteriormente por Dong et al. (2010), com algumas modificações. Os resultados foram expressos em U fluorescência/mg proteína.

Conteúdo de nitritos: a produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada espectrofotometricamente através do metabólito estável nitrito (Chae et al., 2004). Para mensurar o conteúdo de nitrito, as amostras de

plasma foram incubadas com reagente Griess (sulfanilamida 1% e N-(1-naftil)-etilenodiamina 0,1%) em temperatura ambiente por 10 min, e a absorbância foi medida a 540 nm. O conteúdo de nitritos foi calculado com base numa curva padrão de 0 a 100 nM realizada com o metabólito nitrito de sódio (NaNO₂). Os resultados foram expressos em µmol nitrito/mg proteína.

3.2.6. Marcadores de dano oxidativo à proteínas e lípidios

Conteúdo de tióis totais: a oxidação dos tióis livres da amostra leva à formação de pontes dissulfeto. O ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB), reagente de cor, é reduzido pelos tióis não oxidados, gerando um derivado amarelo, o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB), lido espectrofotometricamente a 412 nm ($\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Aksenov e Markesbery, 2001). Os resultados foram expressos em nmol de TNB/mg proteína.

Carbonilação de proteínas: o dano oxidativo a proteínas foi avaliado através da determinação de grupamentos carbonila. Neste ensaio, os grupos carbonilas reagem com dinitrofenilhidrazina, levando a formação de hidrazonas correspondentes. O conteúdo de grupamentos carbonila foi determinado espectrofotometricamente a 370 nm, usando um coeficiente de extinção molar de dinitrofenilhidrazonas de $22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e expresso em nmol/mg de proteína, como previamente descrito por Levine et al., 1990.

Formação de malondialdeído (MDA): como índice de lipoperoxidação foi quantificada a formação de MDA, mensurado por HPLC (Proeminence Shimadzu, JP), em uma coluna Ascentis® C18 (250 x 2.1 mm, 5 µm, Supelco Sigma-Aldrich), segundo (Grotto et al., 2007).

3.2.7. Defesas antioxidantes

Conteúdo de GSH: os níveis de GSH foram determinados como descrito por Hissin e Hilf (1976), com algumas adaptações. GSH foi mensurado após precipitação de proteína com 1 mL de ácido tricloroacético 10%. Em parte da amostra foi adicionado um tampão de fosfato 800 mM, pH 7,4 e DTNB 500 µM. O desenvolvimento de cor resultante a partir da reação entre o DTNB e tióis atingiu um máximo em 5 minutos e manteve-se estável durante mais de 30 min. A absorbância foi lida a 412 nm depois de 10 min. Uma curva padrão de glutathione

reduzida foi usado para calcular os níveis de GSH nas amostras.

Atividade da GPx: a atividade da GPx foi analisada a partir da taxa de decaimento do NADPH. A determinação foi realizada em espectrofotômetro a 340 nm, conforme Flohé e Günzler (1984). Os resultados foram calculados como U/ mg proteína, sendo que 1 U corresponde a 1 μ mol de peróxido transformado em água por min.

Atividade da CAT: a atividade da CAT foi determinada pela taxa de decaimento do peróxido de hidrogênio, analisada em espectrofotômetro a 240 nm, conforme descrito anteriormente por Aebi (1984). Os resultados foram expressos em U/mg proteína.

3.2.8. Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas a partir do plasma foi feita através do método de Lowry et al. (1951), utilizando-se a albumina sérica bovina como padrão.

3.2.9. Ensaio Cometa na versão alcalina

O Ensaio Cometa (Figura 8) na versão alcalina foi realizado como descrito previamente por Singh e colaboradores (Singh et al., 1988) com algumas modificações (Al-Salmani et al., 2011; Costa et al., 2008). Resumidamente, utilizam-se núcleos embebidos numa camada fina de agarose, que são distribuídos em 12 minigéis por lâmina. Todas as proteínas celulares são removidas por lise celular. O DNA sofre desnaturação em condições alcalinas e logo após, é aplicado um campo elétrico (eletroforese) para permitir que os fragmentos de DNA migrem a partir do núcleo. Na sua versão alcalina, o ensaio detecta quebras simples e duplas, locais de reparação incompleta e sítios alcali-lábeis (McKelvey-Martin et al., 1993).

Antes do ensaio, as amostras de sangue total foram rapidamente descongeladas em gelo (4°C). Os minigéis foram feitos a partir de uma mistura de 5 μ L de sangue com 300 μ L de agarose de baixo ponto de fusão a 0,6% (Figura 8). Colocou-se então 10 μ L de tal mistura (células com agarose) em lâmina de microscópio pré-revestida com agarose de ponto de fusão normal a 1%. As amostras foram analisadas em duplicata, ou seja, foram feitos dois minigéis por indivíduo. Imediatamente após o preparo das lâminas, as mesmas foram colocadas na geladeira por aproximadamente 5 min, para solidificação dos minigéis. Após este curto

intervalo de tempo, as lâminas foram imersas em solução de lise gelada, preparada alguns minutos antes do uso (NaCl 2,5 M, Na₂EDTA 100 mM, Tris-base 10 mM, NaOH 0,25 M, pH 10, 1% Triton X-100), e permaneceram durante pelo menos 1 h a 4°C no escuro. Após este período, as lâminas foram submersas em solução de eletroforese (Na₂EDTA 1 mM, NaOH 300 mM) durante 20 min a 4°C, para permitir o desenovelamento do DNA. A eletroforese foi realizada durante 20 min a 30 V e 300 mA. Para a neutralização, as lâminas foram lavadas durante 10 min em PBS gelado e durante mais 10 min em água destilada gelada. As lâminas foram então fixadas em etanol a 70% durante 15 min e em etanol absoluto durante mais 15 min.

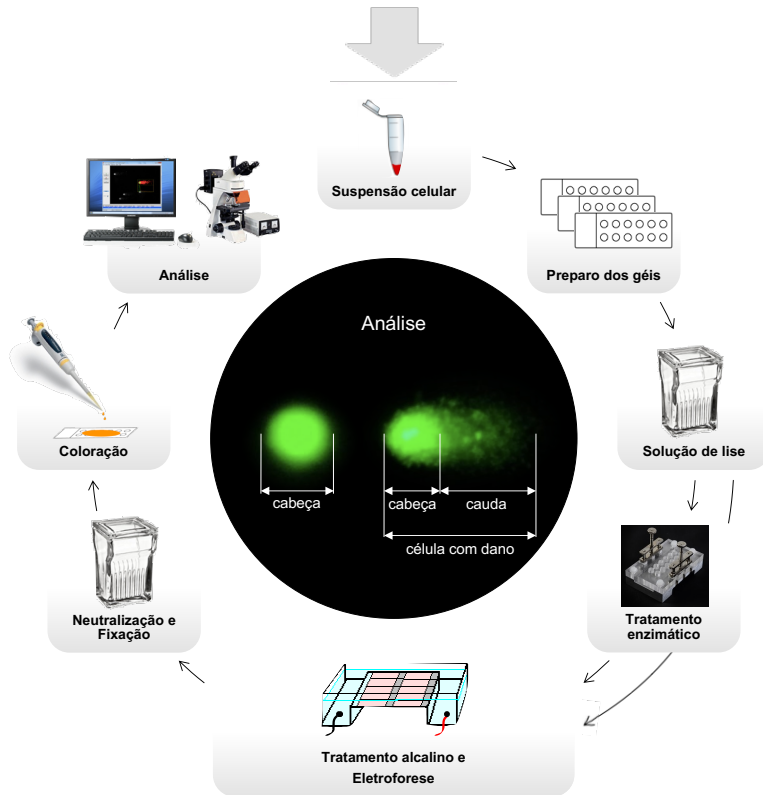


Figura 8. Representação esquemática do ensaio cometa.

As lâminas secas foram coradas com SYBR® Gold (Invitrogen, EUA) na diluição recomendada pelo fabricante, durante 20 min, em banho com agitação. Ao final, foram enxaguadas duas vezes com água destilada e deixadas secar a temperatura ambiente. Um total de 100 células por indivíduo (50 células/minigel) foram analisadas usando o sistema de análise de imagem semi-automatizado Comet Assay IV (Perceptive Instruments, UK). As análises microscópicas foram feitas em um microscópio de fluorescência (Eclipse E400, Nikon Instruments, JP), com objetiva de 40X. O parâmetro utilizado para avaliar o dano ao DNA foi a intensidade da fluorescência na cauda deslocada a partir do nucleóide (*tail intensity*), formando uma espécie de cometa. Os valores foram expressos como porcentagem de DNA na cauda.

3.2.10. Ensaio Cometa com tratamento enzimático (FPG)

O Ensaio Cometa modificado foi realizado como descrito por Azqueta e Collins (2013). Para a medição de purinas oxidadas, após a lise, as lâminas foram lavadas 3 vezes (5 min a cada vez) com tampão gelado (KCl 0,1 M, Na₂EDTA 0,5 mM, HEPES 40 mM, BSA 0,2 mg/mL, pH 8,0) e incubadas durante 30 min a 37°C com FPG (na diluição recomendada pelo fabricante) ou tampão. As etapas seguintes foram realizadas de acordo com a versão alcalina do Ensaio Cometa, descrita no item anterior. A porcentagem de DNA na cauda do cometa foi o parâmetro de dano do DNA avaliado para descrever a formação de cometas. Os sítios sensíveis à FPG foram calculados através da diferença entre o valor obtido para a % de DNA na cauda dos núcleos tratados com tampão e do valor obtido para a % de DNA na cauda dos núcleos tratados com FPG.

3.2.11. Teste de MN em células esfoliadas da mucosa bucal

O teste de MN foi realizado como descrito previamente por Thomas et al. (2009). As células esfoliadas da mucosa bucal depositadas em fixador Saccomanno foram centrifugadas três vezes, a 580 x g por 10 min, desprezando-se o sobrenadante e completando o volume para 5 mL com tampão mucosa, a cada ciclo de centrifugação. Este procedimento ajuda a inativar DNAses endógenas presentes na cavidade oral e a remover bactérias e resíduos celulares que poderiam prejudicar a contagem. Após a última centrifugação, as células foram fixadas (etanol: ácido acético glacial, 3:1 v/v) por 10 min. Uma alíquota de 150 µL da suspensão celular foi transferida para lâminas de microscópio com uma

pipeta Pasteur, a uma altura aproximada de 40 cm. Ao final, as lâminas foram deixadas secar ao ar livre, por no mínimo 24 h. Antes da coloração, as lâminas contendo as células fixadas foram imersas em etanol 50% (v/v) e etanol 20% (v/v), durante 1 min cada, e lavadas com água destilada durante 2 min. A coloração das lâminas foi baseada na metodologia de Feulgen-Fast Green, que consistiu na utilização do reagente de Schiff e contra coloração com Fast-Green. Primeiramente, as lâminas foram colocadas em uma solução de HCl 5 M por 30 min a temperatura ambiente, para hidrolisar as células. As lâminas foram então lavadas com água destilada e coradas no reagente de Schiff por 2 h no escuro, a temperatura ambiente e, em seguida, lavadas com água destilada. Por último, as lâminas foram coradas com Fast-Green a 0,1% (p/v) por 5 seg e lavadas duas vezes em água destilada, durante 10 seg cada. Ao final, as lâminas foram fixadas em etanol absoluto, para posterior leitura.

Os biomarcadores de dano do DNA (número total de micronúcleos e brotos nucleares), defeitos citocinéticos (células binucleadas), potencial proliferativo (células basais) e morte celular (picnose, cariorrexia, cariólise e cromatina condensada) foram classificados de acordo com Bolognesi et al. (2013). A contagem foi realizada em microscópio óptico (Eclipse E100, Nikon Instruments, JP) a uma ampliação de 1000X. Para cada indivíduo foram analisadas 2000 células para contagem de micronúcleos e brotos nucleares e, 1000 células para os outros biomarcadores. Os resultados são apresentados como o número de biomarcadores por 1000 células (‰).

3.2.12. Análise estatística dos dados

Primeiramente foi realizada a análise descritiva das variáveis, antes e depois do consumo de castanha-do-Brasil. Os dados para caracterização da população estudada foram expostos como mediana e intervalo interquartil (25% – 75%) para melhor visualização dos pontos de corte na qual os participantes estavam inseridos. Os dados referentes às análises bioquímicas clínicas foram expostos como média \pm desvio padrão (DP). Os dados referentes aos danos ao DNA e estresse oxidativo foram expostos como média \pm erro padrão (EP).

Considerando o tamanho da população estudada ($n = 74$), a normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis que possuíam distribuição normal foram analisadas através de testes paramétricos e, portanto, para comparar os dados antes e depois do consumo de castanha-do-Brasil, foi aplicado o teste t pareado. Já as variáveis que afastaram-se significativamente da

normalidade foram analisadas através de testes não paramétricos. Neste último caso, para comparar as variáveis antes e depois do consumo de castanha-do-Brasil, foi utilizado o teste de Wilcoxon.

Para verificar a possível associação entre os níveis de selênio e as variáveis referentes ao perfil glicêmico, estresse oxidativo e danos ao DNA, realizou-se o teste de correlação de Spearman, uma vez que os dados destas variáveis afastaram-se significativamente da normalidade.

Todos os testes foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism 6. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da população estudada

Ao total, 74 participantes completaram o ensaio clínico. Destes, 37 eram homens, com idade de 61,0 [IQ: 57,0 – 67,5] anos, IMC de 30,0 [IQ: 27,9 – 33,1] kg/m² e circunferência abdominal de 106 [IQ: 102 – 113] cm. As outras 37 participantes eram mulheres, com idade de 66,0 [IQ: 59,0 – 70,0] anos, IMC de 32,9 [IQ: 29,5 – 35,9] kg/m² e circunferência abdominal de 105 [IQ: 98 – 116] cm (Tabela 2).

Tabela 2. Características da população estudada antes e depois do consumo de castanha-do-Brasil

| | Antes do consumo | Depois do consumo |
|-------------------------|----------------------|----------------------|
| | Mediana [IQ 25 – 75] | Mediana [IQ 25 – 75] |
| Homens, n (%) | 37 (50%) | - |
| Idade, anos | 61,0 [57,0 – 67,5] | - |
| Peso, kg | 92,0 [82,1 – 100,3] | 90,0 [83,5 – 100,0] |
| IMC, kg/ m ² | 30,0 [27,9 – 33,1] | 29,7 [28,1 – 33,1] |
| CA, cm | 106 [102 – 113] | 111 [104 – 114]** |
| Mulheres, n (%) | 37 (50%) | - |
| Idade, anos | 66,0 [59,0 – 70,0] | - |
| Peso, kg | 78,0 [69,0 – 88,7] | 78,0 [67,5 – 88,0] |
| IMC, kg/ m ² | 32,9 [29,5 – 35,9] | 32,5 [29,3 – 36,3] |
| CA, cm | 105 [98 – 116] | 109 [101 – 117] |

IQ: intervalo interquartil.

IMC: índice de massa corporal.

CA: circunferência abdominal.

Os dados representam a frequência (porcentagem) e mediana [IQ].

** $p < 0,01$, calculado pelo teste t pareado.

Para melhor homogeneidade amostral, foram incluídos nesta pesquisa somente indivíduos com excesso de peso, desta maneira, todos apresentavam IMC > 27 kg/m². Tanto em homens quanto em mulheres, os dados de IMC obtidos depois do consumo da castanha não diferiram do início do estudo. Por outro lado, ao final do ensaio clínico, os homens tiveram a circunferência abdominal aumentada, quando comparada com os valores obtidos no início do estudo ($p = 0,009$).

4.2. Níveis de selênio após o consumo da castanha-do-Brasil

Para comprovar a eficácia do consumo de castanha-do-Brasil como fonte dietética de selênio, os níveis séricos deste mineral ($\mu\text{g/L}$) foram avaliados antes e após seis meses de consumo deste fruto oleaginoso (Figura 9). Foram verificadas mudanças significativamente positivas nas concentrações séricas de selênio ao longo do ensaio clínico (antes do consumo: $55,7 \pm 14,7$; depois do consumo: $177,4 \pm 47,1$; $p < 0,0001$). No início do estudo, cinco participantes apresentavam nível sérico de selênio adequado, conforme a referência mais aceita ($> 84 - 100 \mu\text{g/L}$) (Thomson, 2004) e, após os seis meses de consumo da castanha, com exceção de apenas dois participantes, todos os outros não apresentaram deficiência do mineral.

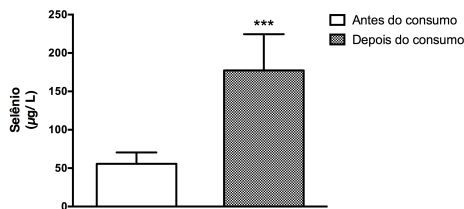


Figura 9. Concentração sérica de selênio ($\mu\text{g/L}$) antes e depois de seis meses de consumo da castanha-do-Brasil por indivíduos com diabetes mellitus tipo 2. Os dados representam a média \pm desvio padrão. *** $p < 0,001$, calculado pelo teste de Wilcoxon.

4.3. Efeitos da ingestão de selênio sobre os perfis glicêmico, lipídico, inflamatório, hepático e renal

A manutenção dos níveis séricos de selênio não foi acompanhada de melhora na homeostase glicêmica (Tabela 3). Foram observadas mudanças significativas na glicemia e insulina de jejum. Tanto os níveis de glicemia de jejum quando os níveis de insulina de jejum foram aumentados significativamente após seis meses de consumo da castanha ($p = 0,023$ e $p = 0,006$, respectivamente). Ao verificar os níveis de HbA1c, não foi encontrada diferença significativa entre o início e o término do ensaio clínico.

A partir dos valores obtidos de glicemia de jejum e insulina de jejum, pode-se calcular os valores de HOMA β e HOMA IR, que avaliam a função secretora das células β e a resistência à insulina, respectivamente. Os resultados calculados de HOMA β e HOMA IR não foram diferentes entre as duas fases da pesquisa. Por último, também foi calculado o valor de QUICKI, que avalia a sensibilidade a insulina, mas não foi observada diferença significativa entre as duas etapas da pesquisa.

Tabela 3. Perfis glicêmico e insulinêmico de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 antes e depois do consumo de castanha-do-Brasil

| | Antes do consumo | Depois do consumo |
|--------------------------------|-------------------|-------------------------------|
| | Média \pm DP | Média \pm DP |
| Glicemia de jejum, mg/dL | 137,1 \pm 48,4 | 148,5 \pm 46,1* |
| Insulina de jejum, μ UI/mL | 22,1 \pm 15,1 | 26,1 \pm 16,8 ^{##} |
| HbA1c, % | 8,1 \pm 1,2 | 8,1 \pm 1,3 |
| HOMA β , % | 154,8 \pm 145,4 | 158,2 \pm 155,4 |
| HOMA IR | 6,6 \pm 4,7 | 9,2 \pm 7,1 |
| QUICKI | 0,30 \pm 0,04 | 0,29 \pm 0,04 |

HbA1c: hemoglobina glicada.

HOMA β : *homeostatic model assessment of β cells function.*

HOMA IR: *homeostatic model assessment of insulin resistance.*

QUICKI: *quantitative insulin sensitivity check index.*

* $p < 0,05$, calculado pelo teste t pareado.

^{##} $p < 0,01$, calculado pelo teste de Wilcoxon.

Ao encontrar tais resultados insatisfatórios quanto à homeostase glicêmica, foi analisado se maiores níveis de glicemia e insulina de jejum poderiam estar associados aos maiores níveis de selênio. Na Figura 10 estão representadas as correlações entre os níveis séricos de selênio *versus* glicemia de jejum e insulina de jejum. No presente estudo, os resultados destas análises não tiveram diferenças significativas, isto é, o aumento dos níveis de selênio não foi associado ao aumento das concentrações de glicemia e insulina.

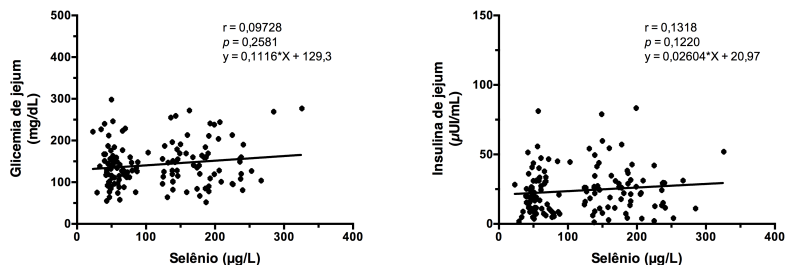


Figura 10. Representações gráficas da correlação de Spearman e regressão linear entre os níveis séricos de selênio *versus* glicemia de jejum e insulina de jejum em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2.

Ao avaliar os efeitos da ingestão de selênio sobre o perfil lipídico, foram encontradas alterações positivas (Tabela 4). Após seis meses de consumo da castanha-do-Brasil, houve um aumento significativo nos valores de HDL ($p = 0,024$) e de LDL ($p = 0,041$), e uma redução significativa na razão TG/HDL ($p = 0,030$), denominada Índice de Castelli I. Por outro lado, não foram encontradas mudanças significativas nos valores de CT e não HDL. Os níveis de TG apesar de tenderem à redução, mostraram-se apenas marginalmente significativos ($p = 0,054$).

Tabela 4. Perfis lipídico e inflamatório de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 antes e depois do consumo de castanha-do-Brasil

| | Antes do consumo | Depois do consumo |
|-------------------------|------------------|------------------------|
| | Média ± DP | Média ± DP |
| Colesterol total, mg/dL | 180,3 ± 43,3 | 186,2 ± 48,4 |
| HDL, mg/dL | 39,7 ± 9,5 | 41,1 ± 10,3* |
| não HDL, mg/dL | 142,4 ± 43,2 | 146,8 ± 48,9 |
| LDL, mg/dL | 103,8 ± 36,4 | 111,3 ± 41,6* |
| Triglicerídeos, mg/dL | 188,3 ± 89,3 | 173,9 ± 83,2 |
| Índice de Castelli I | 5,3 ± 3,3 | 4,8 ± 3,1 [#] |
| PCR ultrasensível, mg/L | 3,8 ± 3,5 | 4,8 ± 5,0 |
| Homocisteína, µmol/L | 13,9 ± 5,4 | 13,7 ± 5,3 |

HDL: lipoproteína de alta densidade.

LDL: lipoproteína de baixa densidade.

PCR: proteína C reativa.

* $p < 0,05$, calculado pelo teste t pareado.

[#] $p < 0,05$, calculado pelo teste de Wilcoxon.

Para caracterizar o perfil inflamatório dos participantes deste estudo, foram quantificadas as concentrações PCR-us e homocisteína. Ao comparar os valores destas duas variáveis, antes e após seis meses de consumo da castanha, os testes estatísticos não encontraram diferenças significativas.

Em relação ao perfil hepático, o consumo de uma castanha-do-Brasil por seis meses não causou alterações nas enzimas AST e ALT. Entretanto, foi observada uma redução significativa na enzima GGT ($p = 0,036$) (Tabela 5). Já os marcadores da função renal não sofreram alterações ao longo deste estudo.

Tabela 5. Perfis hepático e renal de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 antes e depois do consumo de castanha-do-Brasil

| | Antes do consumo | Depois do consumo |
|---------------------------------|------------------|------------------------------|
| | Média \pm DP | Média \pm DP |
| AST, U/L | 22,5 \pm 10,2 | 22,1 \pm 9,8 |
| ALT, U/L | 26,3 \pm 14,6 | 25,6 \pm 14,7 |
| GGT, U/L | 33,0 \pm 20,5 | 31,5 \pm 21,8 [#] |
| Uréia, mg/dL | 40,8 \pm 16,4 | 43,2 \pm 15,7 |
| Creatinina, mg/dL | 1,00 \pm 0,34 | 1,00 \pm 0,34 |
| TFGe, ml/min/1,73m ² | 90,5 \pm 32,9 | 90,0 \pm 31,2 |

AST: alanina aminotransferase.

ALT: aspartato aminotransferase.

GGT: gama-glutamilttransferase.

TFGe: taxa de filtração glomerular estimada.

[#] $p < 0,05$, calculado pelo teste de Wilcoxon.

4.4. Efeitos da ingestão de selênio sobre a produção de oxidantes

Os parâmetros quantificados para verificar a produção de oxidantes foram os níveis da oxidação de H₂DCF-DA e conteúdo de nitrito (Figura 11). Ao analisar os níveis de DCF, os dados revelaram uma redução significativa da produção de ERO após o consumo da castanha-do-Brasil (antes do consumo: 261,6 \pm 8,2; depois do consumo: 166,0 \pm 13,6; $p < 0,0001$). Similarmente a estes achados, o conteúdo de nitrito também apresentou o mesmo comportamento, sendo reduzido significativamente ao final do estudo (antes: 2,44 \pm 0,18; depois: 0,98 \pm 0,07; $p < 0,0001$). Com o intuito de verificar se os resultados obtidos a partir destas duas análises estavam associados aos níveis séricos de

selênio, foi aplicado o teste de correlação de Spearman (Figura 12). Os resultados mostraram que maiores níveis de selênio estão associados a menores níveis de DCF ($r = -0,5345$; $p < 0,001$) e menor conteúdo de nitrito ($r = -0,4726$; $p < 0,001$).

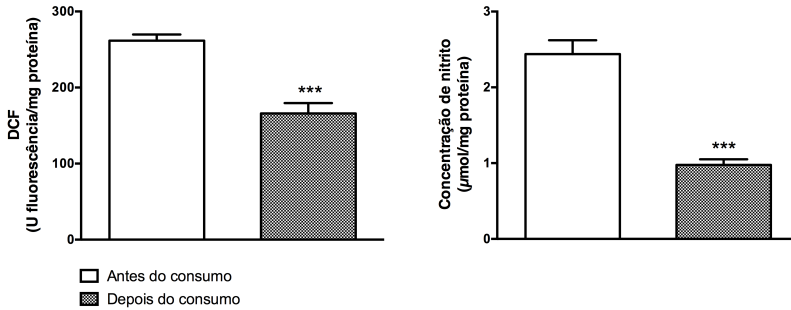


Figura 11. Efeitos do consumo de castanha-do-Brasil por seis meses sobre os níveis de DCF e concentração de nitrito em plasma de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2.

Os dados representam a média \pm erro padrão. *** $p < 0,001$, calculado pelo teste de Wilcoxon.

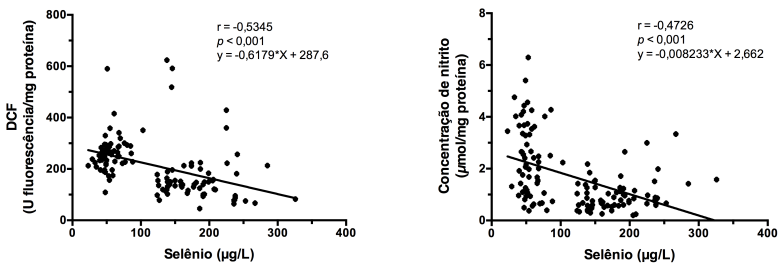


Figura 12. Representações gráficas da correlação de Spearman e regressão linear entre os níveis séricos de selênio *versus* níveis de DCF e concentração de nitrito em plasma de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2.

4.5. Efeitos da ingestão de selênio sobre defesas antioxidantes

Para verificar o *status* antioxidante dos participantes desta pesquisa, foram quantificados os níveis de GSH e a atividade das enzimas GPx e CAT. Fazendo uma rápida interpretação da Figura 13, observa-se uma melhora do sistema de defesa antioxidante nos indivíduos com DM2 ao final do estudo. Houve um aumento dos níveis de GSH (antes do consumo: $0,46 \pm 0,04$; depois do consumo: $1,07 \pm 0,15$; $p < 0,0001$), aumento na atividade da enzima GPx (antes: $1,18 \pm 0,08$; depois: $1,76 \pm 0,17$; $p = 0,003$) e um aumento na atividade da enzima CAT (antes: $1,52 \pm 0,09$; depois: $2,18 \pm 0,09$; $p < 0,0001$), em plasma de indivíduos com DM2 após seis meses de ingestão de selênio através da castanha-do-Brasil.

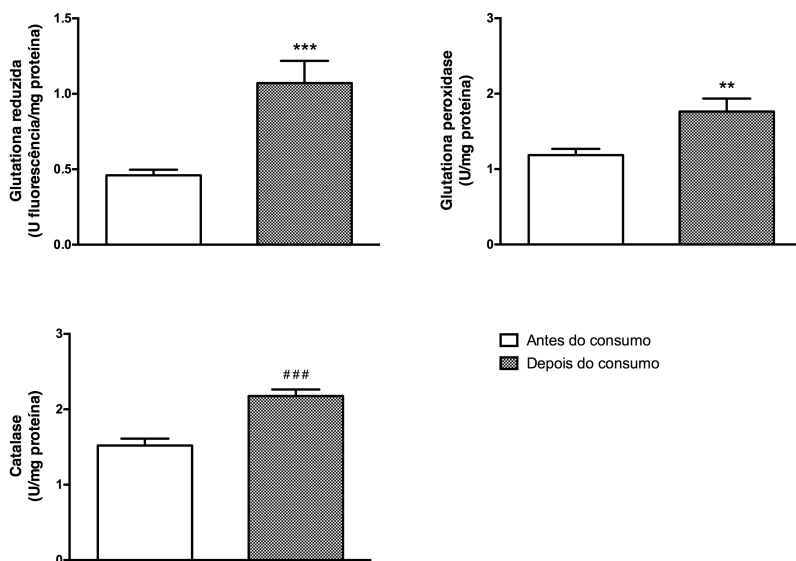


Figura 13. Efeitos do consumo de castanha-do-Brasil por seis meses sobre marcadores do sistema antioxidante em plasma de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2.

Os dados representam a média \pm erro padrão. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, calculados pelo teste de Wilcoxon. ### $p < 0,001$, calculado pelo teste t pareado.

A partir dos resultados encontrados na figura anterior, investigou-se as possíveis associações entre os níveis do mineral selênio e os marcadores do sistema antioxidante avaliados neste estudo (Figura 14). Todos os três marcadores apresentaram correlações positivas com os níveis de selênio, isto é, os maiores níveis de selênio estão associados à maiores concentrações de GSH ($r = 0,3050$; $p < 0,001$), maior atividade da GPx ($r = 0,2733$; $p = 0,031$) e, maior atividade da enzima CAT ($r = 0,3231$; $p < 0,001$).

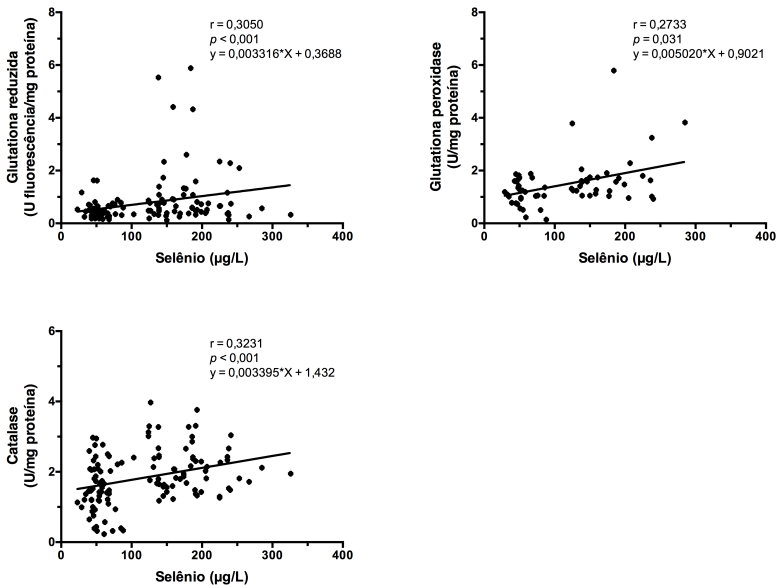


Figura 14. Representações gráficas da correlação de Spearman e regressão linear entre os níveis séricos de selênio *versus* defesas antioxidante em plasma de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2.

4.6. Efeitos da ingestão de selênio sobre marcadores de dano oxidativo a macromoléculas

Na Figura 15 estão expostos os resultados dos parâmetros de estresse oxidativo que refletem danos oxidativos a proteínas (tióis totais e conteúdo de grupamentos carbonila) e lipídios (MDA). Ao final de seis

meses de consumo da castanha-do-Brasil, foi observado um aumento significativo nos níveis de tióis totais (antes do consumo: $0,77 \pm 0,07$; depois do consumo: $2,57 \pm 0,20$; $p < 0,0001$) e redução significativa do dano oxidativo em proteínas, avaliado pelos níveis de grupamentos carbonila (antes do consumo: $0,091 \pm 0,011$; depois do consumo: $0,061 \pm 0,004$; $p = 0,018$). Ao comparar os valores de MDA antes e depois do consumo da castanha-do-Brasil, observou-se uma redução significativa na lipoperoxidação ao final do estudo (antes do consumo: $129,8 \pm 10,6$; depois do consumo: $86,2 \pm 4,6$; $p = 0,003$).

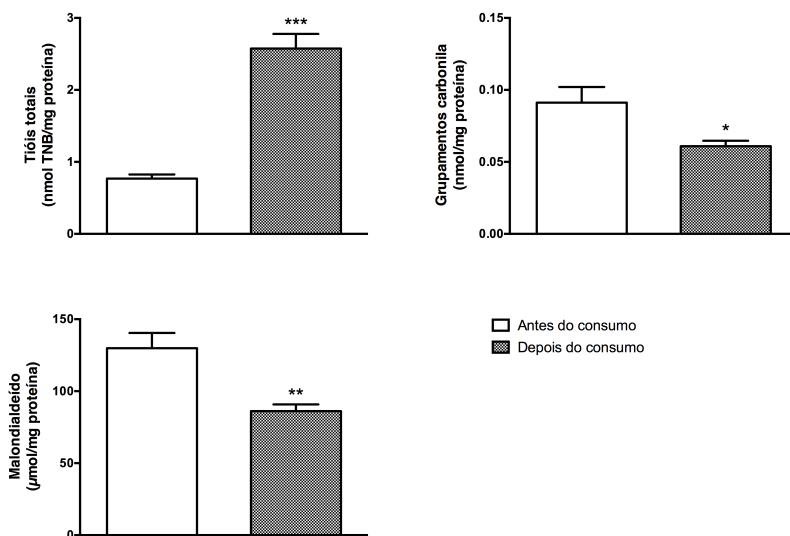


Figura 15. Efeitos do consumo de castanha-do-Brasil por seis meses sobre marcadores de dano oxidativo em plasma de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2.

Os dados representam a média \pm erro padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, calculados pelo teste de Wilcoxon.

A Figura 16 apresenta as associações entre os níveis séricos de selênio e os diferentes marcadores de dano oxidativo. Foi observada uma forte correlação positiva entre os níveis séricos de selênio e tióis totais ($r = 0,5467$; $p < 0,001$). Por outro lado, os níveis deste mineral foram negativamente correlacionados com os níveis de MDA ($r = -0,4981$; $p =$

0,002), isto é, maiores níveis séricos de selênio estão associados à menor lipoperoxidação em indivíduos com DM2. Ao testar estas associações entre os níveis de selênio e o conteúdo de grupamentos carbonila, não foram observadas diferenças significativas, apesar dos dados apresentarem uma tendência negativa.

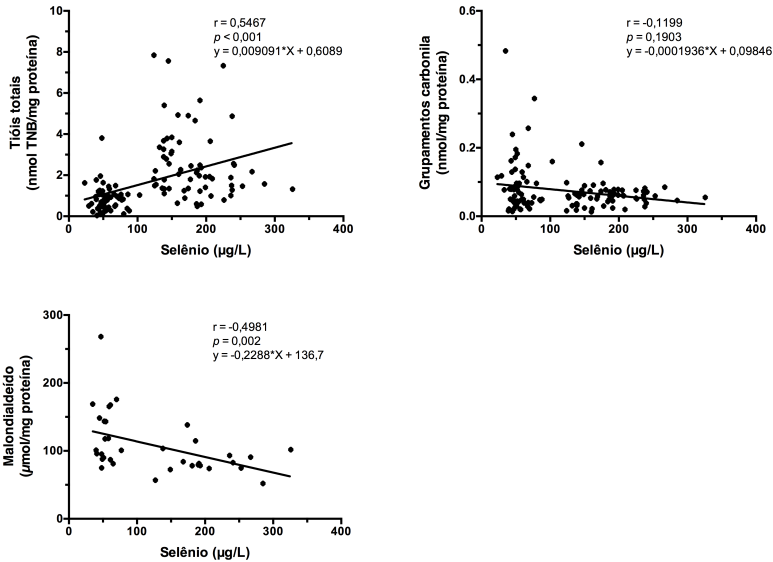


Figura 16. Representações gráficas da correlação de Spearman e regressão linear entre os níveis séricos de selênio *versus* marcadores de dano oxidativo em plasma de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2.

4.7. Efeitos da ingestão de selênio sobre os danos ao DNA avaliados pelo ensaio cometa

Além da melhora em todos os parâmetros de estresse oxidativo avaliados nesta tese, a manutenção dos níveis de selênio nos participantes deste estudo foi acompanhada de uma redução significativa dos danos ao DNA. Estes valores foram avaliados através do percentual de DNA deslocado a partir do nucleóide, formando uma cauda. Os resultados apresentados na Figura 17 demonstram o potencial antígenotóxico do selênio após seis meses de consumo de uma castanha-do-Brasil ao dia

(antes do consumo: $10,7 \pm 0,8$; depois do consumo: $5,2 \pm 0,6$; $p < 0,0001$). Além disso, o dano oxidativo ao DNA avaliado através do ensaio cometa modificado com o uso da enzima FPG, também apresentou redução (antes do consumo: $5,7 \pm 0,5$; depois do consumo: $2,5 \pm 0,3$; $p < 0,0001$).

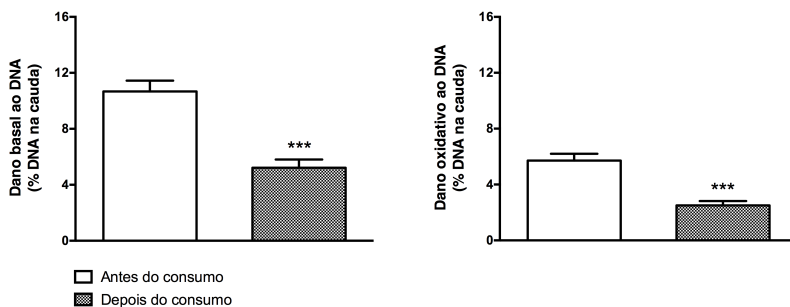


Figura 17. Efeitos do consumo de castanha-do-Brasil por seis meses sobre os danos ao DNA avaliados através do ensaio cometa em sangue de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2.

Os dados representam a média \pm erro padrão. *** $p < 0,001$, calculado pelo teste de Wilcoxon.

Com o intuito de verificar se os resultados obtidos a partir do Ensaio Cometa estavam associados aos níveis séricos de selênio, foi aplicado o teste de correlação de Spearman (Figura 18). Verificou-se que maiores níveis de selênio estão fortemente associados a menores danos ao DNA, tanto no Ensaio Cometa alcalino ($r = -0,4816$; $p < 0,001$), como no Ensaio Cometa modificado ($r = 0,4872$; $p < 0,001$), que avalia os sítios sensíveis a enzima FPG, isto é, purinas oxidadas.

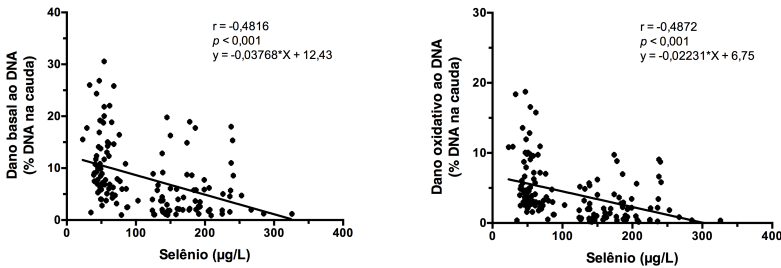


Figura 18. Representações gráficas da correlação de Spearman e regressão linear entre os níveis séricos de selênio *versus* danos ao DNA em sangue de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2.

4.8. Efeitos da ingestão de selênio sobre parâmetros avaliados pelo teste de micronúcleos

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados dos tipos celulares (células basais e diferenciadas), anormalidades nucleares (picnose, cariólise, cariorrexe e cromatina condensada) e dano celular (binucleadas, brotos nucleares e micronúcleos) antes e depois do consumo da castanha-do-Brasil. Em relação ao tipo celular, não foram encontradas diferenças significativas. Após seis meses de consumo da castanha-do-Brasil, observou-se duas mudanças quanto às alterações nucleares, o número de células com dois núcleos ou com cromatina condensada foram reduzidos ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente). Quanto ao dano celular, houve redução na média de brotos nucleares ($p < 0,05$) e também na média de micronúcleos ($p < 0,01$) ao final do estudo.

Tabela 6. Frequência de tipos celulares e anormalidades nucleares em 1000 células e frequência de dano celular em 2000 células diferenciadas

| | Antes do consumo | Depois do consumo |
|-------------------------------|------------------|-------------------|
| | Média ± EP | Média ± EP |
| Diferenciadas, em 1000 | 962,2 ± 2,1 | 961,2 ± 2,6 |
| Basais, em 1000 | 37,4 ± 2,1 | 38,9 ± 2,7 |
| Picnóticas, em 1000 | 2,1 ± 0,3 | 2,0 ± 0,3 |
| Cariolíticas, em 1000 | 3,1 ± 0,7 | 2,9 ± 0,6 |
| Cariorréticas, em 1000 | 4,8 ± 0,5 | 4,2 ± 0,4 |
| Cromatina condensada, em 1000 | 3,6 ± 0,4 | 2,9 ± 0,3* |
| Binucleadas, em 2000 | 4,4 ± 0,4 | 3,5 ± 0,4** |
| Broto nuclear, em 2000 | 2,4 ± 0,3 | 1,9 ± 0,2* |
| Micronúcleo, em 2000 | 2,7 ± 0,2 | 2,1 ± 0,2** |

EP: erro padrão.

* $p < 0,05$, calculado pelo teste de Wilcoxon.

** $p < 0,01$, calculado pelo teste de Wilcoxon.

Por fim, foram aplicados testes para analisar uma possível associação entre os níveis séricos de selênio e a frequência de micronúcleos. Os testes representados pela Figura 19 revelaram uma associação negativa entre estas variáveis, isto é, baixos níveis de selênio estão associados à maior dano celular.

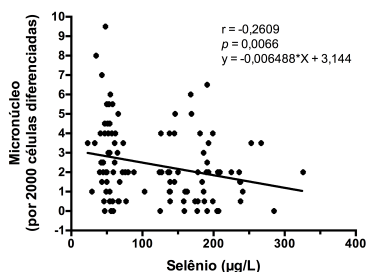


Figura 19. Representações gráficas da correlação de Spearman e regressão linear entre os níveis séricos de selênio *versus* frequência de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2.

5. DISCUSSÃO

O número de indivíduos diagnosticados com DM2 é alarmante e está aumentando em todo o mundo (International Diabetes Federation, 2015). Esta epidemia é atribuída ao aumento da prevalência de obesidade, que ocorre devido ao estilo de vida altamente obesogênico, e ao envelhecimento da população (Danaei et al., 2011; Akash et al., 2013). Além de elevada adiposidade visceral, o DM2 geralmente é acompanhado de comorbidades como hipertensão arterial sistêmica e dislipidemia (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2016). Por isso, as intervenções devem abranger essas múltiplas anormalidades metabólicas, com o intuito de prevenir complicações desta doença (World Health Organization, 2002). Os alvos mais importantes para a prevenção da obesidade e das complicações associadas ao DM2 são justamente fatores modificáveis, e incluem dieta e exercício físico (Qi et al., 2008; Khazrai et al., 2014).

A obesidade, especialmente a visceral, reflete no aumento da circunferência abdominal e está associada não somente ao DM2, mas também à síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (Eckel et al., 2011). Este quadro clínico nutricional provoca um aumento dos níveis de ácidos graxos livres na circulação e acúmulo desses ácidos graxos em outros tecidos, como músculo, fígado e pâncreas (Mittelman et al., 2002). No fígado, esses ácidos graxos podem prejudicar o metabolismo hepático, levando ao aumento da produção de glicose e à resistência à insulina (Despres e Lemieux, 2006). A Organização Mundial da Saúde estabelece como ponto de corte para risco cardiovascular aumentado, medida de circunferência abdominal igual ou superior a 94 cm para homens, e 80 cm para mulheres. A circunferência abdominal, além de ser um bom marcador de adiposidade visceral, está fortemente associado à resistência à insulina (Lim et al., 2015; Nazare et al., 2015). Todos os participantes desta pesquisa apresentaram sobrepeso ou obesidade conforme a classificação pelo IMC e circunferência abdominal aumentada nas duas fases do estudo, constituindo alto risco de complicações metabólicas associadas à obesidade.

Sabe-se que para redução do peso e da circunferência abdominal, um planejamento dietético completo aliado ao exercício físico é fundamental. Os alimentos e seus microconstituintes, quando utilizados isoladamente, sem associação com mudanças no estilo de vida, podem apresentar efeitos sobre as funções orgânicas, mas dificilmente serão capazes de reverter um quadro de sobrepeso/obesidade associado à elevada circunferência abdominal (Barreira et al. 2017). Isto vem ao encontro dos resultados observados nesta pesquisa. Antes de iniciar o

estudo, todos os indivíduos passaram por uma entrevista na qual pode-se constatar que a dieta era baseada no consumo de carboidratos refinados, pobre em fibras e com baixo consumo de proteínas e gorduras de boa qualidade. Além disso, muitos relataram um baixo consumo de frutas e verduras. A adição dietética de uma castanha-do-Brasil rica em selênio, considerando os hábitos alimentares não alterados conforme relatado, e sem prática regular de exercício físico, não foi capaz de reverter o quadro de sobrepeso/obesidade. Nos homens, foi observada um aumento sutil na circunferência abdominal, porém significativo. Entretanto, levando em consideração os intervalos interquartis encontrados antes e depois do consumo da castanha-do-Brasil (102 – 113 cm e; 104 – 114 cm, respectivamente), nota-se que apesar de significativa, esta variação na circunferência abdominal não apresenta importância na prática clínica.

De acordo com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2016), o DM2 pode ocorrer em qualquer idade, mas é geralmente diagnosticado após os 40 anos. Desta maneira, foram incluídos neste estudo somente indivíduos com idade acima de 45 anos. Ao total, 74 participantes completaram o ensaio clínico, sendo 37 homens com idade média de 61,0 [IQ: 57,0 – 67,5] anos, e 37 mulheres com idade média de 66,0 [IQ: 59,0 – 70,0] anos. Estudos mostram que indivíduos mais velhos são mais vulneráveis à deficiência de micronutrientes, uma vez que apresentam necessidades nutricionais aumentadas, tendem a fazer alterações na dieta, e apresentam alterações metabólicas decorrentes do envelhecimento, que reduzem a biodisponibilidade de nutrientes. Dentre estes micronutrientes que podem estar deficientes, está o selênio, (Planas et al., 2004; Arnaud et al., 2007; Letsiou et al., 2009). Apesar de controvérsias, a suplementação de selênio tem sido estudada como um adjuvante no tratamento do DM2 (Valko et al., 2006; Tiwari et al., 2013).

A distribuição de selênio nos alimentos é dependente da sua concentração nos solos onde os alimentos são cultivados e animais são criados (Ferreira et al., 2002). O selênio é encontrado em alimentos de origem animal, e em menores concentrações nos de origem vegetal, com exceção da castanha-do-Brasil (Thomson et al., 2008). A composição da dieta e as diferenças de selênio nos alimentos em virtude da sua concentração no solo justificam as diferenças na ingestão de selênio entre as pessoas (Gromadzinska et al., 2008; Reszka et al., 2012).

Para avaliação do estado nutricional relativo ao selênio são utilizados marcadores sanguíneos, os quais refletem em curto, médio e longo prazo o *status* corporal referente a esse mineral. Não foram encontrados na literatura estudos que avaliassem o consumo de castanha-do-Brasil, como fonte de selênio, em pacientes adultos ou idosos com DM

tipo 1 ou 2. Apenas uma tese de doutorado, conduzida por Pires (2012), verificou que uma intervenção dietética com castanha-do-Brasil em adolescentes com diabetes tipo 1 aumentou significativamente as concentrações sanguíneas de selênio.

Existem também outros estudos que comprovam a eficiência da castanha-do-Brasil em melhorar o status de selênio. Uma intervenção com obesos mórbidos (Cominetti et al., 2012), outras duas com pacientes renais crônicos (Stockler-Pinto et al., 2010; Stockler-Pinto et al., 2014), e uma quarta com idosos (Rita Cardoso et al., 2016), mostraram que o consumo de uma castanha-do-Brasil ($\approx 290 \mu\text{g}$) por dia, foi efetiva em melhorar os marcadores do *status* de selênio. Huguenin e colaboradores (2015) também observaram aumento dos níveis de selênio em indivíduos hipertensos e dislipidêmicos, após consumirem $\approx 200 \mu\text{g}$ de selênio por dia, através da castanha-do-Brasil. Os resultados do presente estudo, conduzido em pacientes com DM2 corroboram com os estudos apresentados acima, mostrando que o selênio presente na castanha-do-Brasil possui alta biodisponibilidade, conforme observado pelo aumento das concentrações séricas de selênio.

O primeiro objetivo deste estudo foi avaliar o estado nutricional relativo ao selênio antes e depois da ingestão de castanha-do-Brasil em soro de indivíduos com DM2. Kornhauser et al. (2008) avaliaram a concentração de selênio no soro de pacientes com DM2 e verificaram que os níveis de selênio nestes pacientes encontravam-se reduzidos quando comparados ao grupo controle. Similarmente, verificou-se que 6,75%, isto é, apenas cinco participantes deste estudo apresentavam níveis satisfatórios deste mineral ($< 84 \mu\text{g/L}$) na fase inicial, conforme os valores de referência mais aceitos (Thomson, 2004). Um dos fatores que pode alterar o *status* de selênio em pacientes com diabetes é o tempo de diagnóstico da doença. Whiting e colegas (2008), descreveram que pacientes com a doença entre 4 e 6 anos tiveram concentrações de selênio no plasma reduzidas ($38,7 \mu\text{g/L}$) quando comparados com o grupo de pacientes com duração da doença menor do que 2 anos ($132 \mu\text{g/L}$).

O papel do selênio através das selenoproteínas em seres humanos, tanto na saúde quanto na doença, tem sido amplamente estudado, principalmente como biomarcadores relevantes do *status* de selênio, que é influenciado principalmente pela ingestão dietética deste mineral (Gromadzinska et al., 2008; Reszka et al., 2012). A literatura apresenta controvérsia quanto às evidências que associam suplementação de selênio com DM2 (Mazokopakis e Liontiris, 2017). De acordo com vários estudos, a associação selênio *versus* DM2 foi estabelecida em

forma de “U”. Assim, níveis de selenoproteínas abaixo ou acima do intervalo de referência são possíveis fatores de risco para DM2 (Rayman, 2012; Liontiris e Mazokopakis, 2017). Esta associação em forma de “U” foi revelada recentemente em uma meta-análise de cinco estudos, envolvendo 13460 participantes (Wuang et al., 2016). Os dados apontaram uma alta prevalência de DM2 nos pacientes cujos níveis séricos de selênio eram relativamente baixos ($< 97,5 \mu\text{g/L}$) ou elevados ($> 132,5 \mu\text{g/L}$).

Portanto, a suplementação de selênio pode beneficiar indivíduos que possuem baixos níveis deste mineral. Em contraste, em indivíduos que já possuem quantidades satisfatórias ou elevadas no organismo, pode levar a efeitos adversos, não sendo recomendada a sua suplementação (Febiyanto et al., 2017; Liontiris e Mazokopakis, 2017). Embora não tenham sido descritos na literatura casos clínicos de DM2 decorrentes do consumo de castanha-do-Brasil, faz-se necessário uma avaliação nutricional relativa ao *status* do selênio antes de iniciar ou aumentar a ingestão deste mineral através da suplementação ou consumo da oleaginosa em estudo.

Partindo dos seguintes princípios: i) não há um consenso na literatura quanto às concentrações séricas de referência para o selênio; ii) quase todos os participantes deste estudo possuíam deficiência deste mineral antes de consumirem a castanha-do-Brasil; iii) foram respeitados os níveis da UL para a ingestão de selênio, uma vez que a castanha ofereceu $\approx 200 \mu\text{g/dia}$ deste mineral; é oportuno destacar que, mesmo sendo observado uma média de $177,4 \pm 47,1 \mu\text{g/L}$, não foram observadas características clínicas de selenose nos participantes deste estudo (Lemire et al., 2012; Prabhu e Lei, 2016).

Levando em consideração os diversos benefícios do selênio à saúde humana já apresentados, e os dados supracitados, parte do segundo objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da ingestão de selênio através da castanha-do-Brasil sobre o perfil glicêmico em pacientes com DM2. Indivíduos com baixos níveis de selênio podem se beneficiar do consumo desta oleaginosa, mas embora a ingestão de $\approx 210 \mu\text{g}$ deste oligoelemento através de uma castanha-do-Brasil ao dia, por indivíduos diabéticos, ter sido eficiente na manutenção dos níveis séricos deste mineral, as respostas glicêmica e insulinêmica não foram melhoradas. Adicionalmente os índices que avaliam a capacidade de secreção de insulina pelas células β do pâncreas e de resistência à insulina não sofreram alterações. Somados a isso, os valores obtidos pelo cálculo do QUICKI também não foram alterados. Este índice avalia a sensibilidade

à insulina, e é comparável aos resultados obtidos com o teste de tolerância endovenosa à insulina (Geloneze e Tambascia, 2006).

Os resultados deste trabalho geraram certa preocupação, pois os dados encontrados tenderam a corroborar-se com os indícios de algumas associações já feitas na literatura, entre os níveis de selênio e a piora da homeostase glicêmica (Wuang et al., 2016). Entretanto sabe-se que tanto a glicemia quanto a insulina de jejum, são parâmetros que não devem ser utilizados isoladamente para avaliação clínica. Desta maneira, ao analisar os valores de HbA1c, marcador utilizado para verificar as variações de glicose dos últimos 60 – 120 dias, sendo um importante índice de avaliação do controle glicêmico em longo prazo, estes não foram alterados. Além disso, não houve associação entre a glicemia de jejum e os níveis séricos de selênio.

Os resultados encontrados por Pires (2012) corroboram-se com os achados deste estudo, no qual o consumo de castanha-do-Brasil não foi capaz de alterar o percentual de HbA1c em adolescentes com diabetes tipo 1. Maranhão et al. (2011) também examinaram os efeitos do consumo desta oleaginosa sobre biomarcadores de resistência à insulina em adolescentes obesas e não observaram diferenças na glicemia de jejum, insulina e HOMA IR. Para Wang et al. (2017), a ingestão de selênio em até 1,6 µg/kg/dia por indivíduos não diabéticos, está associada à menor resistência à insulina. Adicionalmente, para valores acima disto, os benefícios desaparecem. Alguns estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que o selênio pode ter um efeito antidiabético, reduzindo HbA1c e glicose. Entretanto, este efeito só foi observado com o uso altas concentrações deste mineral, consideradas tóxicas para humanos, conforme enfatizado pelos autores (Ezaki, 1990; Mueller et al., 2009; Steinbrenner et al., 2011).

No estudo SU.VI.MAX (*Supplementation with antioxidant vitamins and minerals*) realizado com 3146 franceses, a suplementação com 100 µg de selênio associado com outros antioxidantes não foi capaz de alterar a concentração de glicose plasmática após 7,5 anos de intervenção (Czernichow et al., 2006). Erbayraktar et al. (2007) demonstraram que em modelo animal de diabetes induzido por estreptozotocina, a suplementação de SeMet tendeu a reduzir a concentração sanguínea desta hexose. Entretanto, resultados opostos foram verificados com a suplementação de selenato. Os efeitos da suplementação com selenato de sódio sobre a glicose plasmática em ratos diabéticos foram similares entre alguns estudos, pois a suplementação reduziu a concentração de glicose dos animais diabéticos quando

comparado ao grupo controle (Mcneill et al., 1991; Berg et al., 1995; Battell et al., 1998).

Tomados em conjunto, os dados referentes à homeostase glicêmica observados neste estudo, sugerem que o uso de selênio por pacientes com DM2, associada à excesso de peso e elevada circunferência abdominal, não possui efeito benéfico. Por outro lado, o aumento estatisticamente significativo, mas nutricionalmente pouco relevante, nos níveis de glicemia e insulina, não podem ser considerados nocivos. Isso deve-se ao fato de que parâmetros mais importantes como o percentual de HbA1c e os índices que avaliam sensibilidade e resistência à insulina não foram alterados. A intervenção nutricional apresenta impacto importante na redução da HbA1c em pessoas com diabetes tipos 1 e 2, após 3 a 6 meses de seguimento com profissional especialista, independentemente do tempo de diagnóstico da doença. Assim, a importância de um planejamento nutricional completo para que haja mudanças nos hábitos alimentares e consequente melhora de parâmetros clínicos e metabólicos é novamente destacado (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2016).

O perfil lipídico geralmente encontrado em pacientes com DM2 consiste em hipertrigliceridemia e baixos níveis de HDL. As concentrações do LDL não apresentam diferenças quantitativas quando comparadas com as de pacientes não diabéticos. Entretanto, do ponto de vista qualitativo, indivíduos com DM2 apresentam maior proporção de LDL do tipo B, uma subfração de LDL que são pequenas e densas, e mais facilmente oxidáveis, o que as tornam mais aterogênicas (Austin et al., 1988; Siqueira et al., 2006; Sociedade Brasileira de Diabetes, 2016). Assim como um bom controle glicêmico, é essencial avaliar o perfil lipídico nestes pacientes com o intuito de manter os valores dentro dos níveis de referência, uma vez que, dois a três terços desses indivíduos morrem por complicações cardiovasculares (Boussageon et al., 2011; DeFronzo et al., 2015).

Uma alternativa nutricional para reduzir os fatores de risco cardiovasculares seria o consumo de oleaginosas (Kim et al., 2017). Em uma revisão escrita por Souza e colaboradores (2015) foi observado que amendoins, pistaches, nozes, avelãs, macadâmias ou amêndoas são capazes de reduzir os níveis de TG, CT, glicemia e risco de doença coronariana, enquanto aumentam a GSH e o HDL. Assim, uma vez que a castanha-do-Brasil é rica em selênio, ácidos graxos insaturados e compostos fenólicos, foi hipotetizado que a quantidade e o tempo de suplementação poderiam melhorar o perfil lipídico de indivíduos com DM2. Neste estudo, os níveis de TG apresentaram uma redução clínica

considerável, entretanto esta diferença não foi considerada estatisticamente significativa. Além disso, não foram constatadas diferenças significativas nas concentrações séricas de CT e não HDL. Por outro lado, foram verificados aumento dos níveis de HDL.

Estudos realizados com obesos demonstraram que a ingestão de castanha-do-Brasil modifica positivamente os lipídios séricos e diminui o risco aterogênico, obtidos através dos índices de Castelli I e II (Maranhão et al., 2011; Cominetti et al., 2012). Stockler-Pinto et al. (2014) observaram o mesmo comportamento no perfil lipídico de pacientes em hemodiálise, após três meses de consumo de tal oleaginosa. Com o intuito de verificar se os efeitos positivos da castanha-do-Brasil sobre o perfil lipídico seriam atribuídos exclusivamente à composição de ácidos graxos da oleaginosa, alguns pesquisadores ofereceram 13 g de farinha de castanha-do-Brasil (227,5 µg de selênio) parcialmente desengordurada, a indivíduos hipercolesterolêmicos, durante três meses. Esta intervenção afetou positivamente os níveis de TG, CT e não HDL (Carvalho et al., 2015), sugerindo que os benefícios podem ser causados por compostos que não sejam lipídios.

Estudos propõem que o selênio pode exercer papel importante no metabolismo das lipoproteínas (Hercberg et al., 2005; Bleys et al., 2008; Sengupta et al., 2008; Laclaustra et al., 2010). Entretanto, essa relação ainda não está bem estabelecida, uma vez que os estudos não são conclusivos. Os resultados encontrados por Faghihi e colaboradores (2014) estão de acordo com os encontrados no presente trabalho. Os pesquisadores observaram um aumento nos níveis de HDL em indivíduos com DM2 após receberem 200 µg de selenito de sódio ao dia por 3 meses. Estes resultados também vão ao encontro com os achados de Rayman et al. (2011), nos quais a suplementação de selênio em indivíduos com baixo status deste mineral levou a um aumento na concentração de HDL. Do mesmo modo, outro estudo demonstrou que os níveis de HDL são melhorados com o aumento da concentração de selênio, mas atingem um platô quando os valores deste mineral ultrapassam as 120 µg/L (Laclaustra et al., 2010).

A razão entre TG e HDL, denominada Índice de Castelli I (Castelli et al., 1983), é utilizada como um potente preditor do desenvolvimento de doenças coronarianas, além de ser considerado um indicador fácil e rápido de ser obtido, especialmente quando considerado o contexto da atenção básica de saúde (Da Luz et al., 2005; Da Luz et al., 2008). Além disso, correlaciona-se diretamente com o nível de LDL tipo B no plasma (Da Luz et al., 2008). Neste estudo, foram verificados aumento dos níveis de LDL, entretanto, a relação TG/HDL foi diminuída

em 10,5%. Estes dados sugerem que apesar dos níveis de LDL terem aumentados, não parece ser reflexo de um aumento de LDL tipo B.

A hiperglicemia crônica e persistente no DM2 está associada com o estresse oxidativo e estado inflamatório crônico. Essa conclusão é baseada em estudos que mostraram a relação entre o aumento das concentrações circulantes dos marcadores inflamatórios de fase aguda, exemplificados pela proteína C reativa (PCR), e da resistência à insulina (Greenfield e Campbell, 2006).

Para avaliar o efeito do consumo da castanha-do-Brasil sobre marcadores inflamatórios associados ao risco cardiovascular, foram determinadas as concentrações circulantes de PCR-us e homocisteína. De maneira geral, as concentrações destes dois biomarcadores estão elevadas nos pacientes diabéticos e em obesos, e esse aumento está intimamente relacionado com o risco de aterosclerose nos mesmos (Shoelson et al., 2007; Vijayakumar et al., 2017).

A PCR é uma proteína de fase aguda, produzida por hepatócitos, sendo considerada um marcador muito sensível de inflamação (Fu et al., 2009). Além disso, é considerado um preditor de mortalidade em indivíduos com DM2 ao longo de um período de 5 a 7 anos (Jager et al., 1999). Já a homocisteína é um aminoácido, também produzido no fígado, por meio do metabolismo da metionina, que em níveis elevados, demonstra alta correlação com as doenças cardiovasculares, pois causa lesão da célula endotelial, facilita a absorção e formação de placas de ateroma, hipertrofia do músculo liso vascular, ativação dos processos de coagulação e aumenta a oxidação e absorção da LDL no endotélio (Vijayakumar et al., 2017).

Os participantes deste estudo apresentaram valores elevados tanto de homocisteína quanto de PCR-us nas duas fases desta pesquisa. Dados científicos que associem o status de selênio com as concentrações de homocisteína e PCR em pacientes com diabetes são escassos. Xun e colaboradores (2010), ao estudarem a associação entre as concentrações de selênio e PCR na população americana, não encontraram correlações significativas. No estudo SETCAP (*Selenium therapy in coronary artery disease patients*) também não foram observadas diferenças nas concentrações de PCR após a suplementação com 200 e 500 µg de selenito de sódio por dia durante 12 semanas em pacientes com DM2 (Schnabel et al., 2008).

Indivíduos obesos com resistência à insulina e que possuem níveis aumentados destes marcadores apresentam resultados positivos quando há perda de peso e melhora da sensibilidade à insulina (Shoelson et al., 2007). Uma vez que os participantes deste estudo não mudaram

hábitos alimentares e nem fizeram outras mudanças no estilo de vida, mantendo o peso elevado e alta circunferência abdominal durante toda a pesquisa, os níveis de PCR-us e homocisteína seguiram a mesma tendência.

Além do risco de complicações cardiovasculares citadas acima, o DM2 está fortemente associado a um aumento do risco de doença hepática não alcoólica (NAFLD), sendo esta prevalente em até 70% dos indivíduos diabéticos (Anstee et al., 2011). A hiperinsulinemia compensatória impede a adequada metabolização dos ácidos graxos, levando ao acúmulo de gordura no hepatócito. Por isso, o controle glicêmico e a redução da resistência à insulina são alvos no tratamento e prevenção da NAFLD, bem como o aumento da proteção antioxidante e da exposição a agentes protetores dos hepatócitos (Zhang et al., 2017). Normalmente esta doença é assintomática, e está associada com o aumento das enzimas hepáticas ALT, AST e GGT (Schindhelm et al., 2006; Ferreira et al., 2013). Além disso, o selênio pode ser um bom candidato como adjuvante no tratamento desta doença, uma vez que este mineral exerce efeitos antioxidantes (Amin et al., 2017).

Os pacientes incluídos neste estudo não apresentavam diagnóstico de NAFLD. Entretanto, o consumo de selênio através da castanha-do-Brasil foi capaz de reduzir sutilmente em 4,6% a concentração sérica da enzima GGT, sugerindo que o selênio poderia auxiliar na prevenção de possíveis complicações hepáticas no paciente com DM2. Os resultados observados poderiam estar associados à redução do estresse oxidativo, um importante mecanismo fisiopatológico envolvido na lesão hepática na NAFLD (Polimeni et al., 2015). Até o momento, não existem dados na literatura em relação a função do selênio sobre enzimas hepáticas em pacientes diabéticos. Entretanto, Lim e colaboradores (2004) verificaram que a concentração da GGT pode estar inversamente proporcional à concentração de alguns antioxidantes, como a vitamina C. Desta maneira, sugere-se que os achados deste trabalho podem estar associados a menor dano oxidativo e maior capacidade antioxidante observada nos pacientes incluídos neste estudo, dados estes que serão discutidos a seguir.

A progressão do DM2 também pode ser acompanhada dentre outras complicações microvasculares, de alteração da função renal, normalmente avaliada pelas dosagens séricas de uréia e creatinina e pelo índice de Cockcroft-Gault, que estima a taxa de filtração glomerular. Não obstante, o rastreamento da doença renal no DM2 deve ser iniciado logo após o diagnóstico da doença, e a monitorização deve ser constante (Wu et al., 2017). Muitas evidências associam o selênio a diversas condições

de saúde, mas esta relação ainda é pouco clara com relação à função renal, principalmente em pacientes diabéticos (Earle et al., 2016).

Neste estudo, os marcadores da função renal não sofreram alterações após seis meses de consumo da castanha-do-Brasil. Dados similares foram descritos por Stockler-Pinto e colaboradores (2010; 2012; 2015), que avaliaram os efeitos da intervenção dietética com esta oleaginosa durante 3 meses, por pacientes em hemodiálise. Os autores concluíram que apesar do aumento nas concentrações séricas de selênio e da GPx, os marcadores da função renal permaneceram iguais.

A formação de ERO é um evento fisiológico do metabolismo. Entretanto, a hiperglicemia, característica comum dos pacientes com diabetes, pode levar a auto-oxidação da glicose, maior entrada de NADH e FADH₂ na cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, glicosilação de proteínas, entre outras mudanças metabólicas que aceleram e aumentam a formação de ERO conforme demonstrado por vários autores (Lodovici et al., 2008; Shen, 2010; Nowotny et al., 2015). O aumento na produção de radicais livres, pode ser prevenido ou diminuído através da atuação dos sistemas antioxidantes, capazes de eliminar ERO ou transformá-las em produtos menos reativos e reduzindo seus efeitos deletérios. Entretanto, o desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses gera a instalação do processo de estresse oxidativo (Sies, 2015).

Sabe-se que indivíduos diabéticos, apresentam uma redução das defesas antioxidantes biológicas (Ott et al., 2007; Shen, 2010). Estes dados corroboram-se com os achados de Aouacheri et al. (2015), os quais verificaram redução significativa das enzimas antioxidantes em pacientes diabéticos quando comparados com os indivíduos não diabéticos, incluindo depleção de GSH. Adicionalmente, o selênio, um oligoelemento essencial, é um importante componente das enzimas antioxidantes, incluindo as peroxidases, como a GPx. Com base na propriedade antioxidante, este mineral ganhou atenção na prevenção e redução dos danos causados pelo estresse oxidativo em várias doenças, incluindo o DM2. Portanto, manter as concentrações de selênio pelo menos nos valores mínimos de referência parece ser valioso, especialmente nessa população.

Neste contexto, os objetivos 3, 4 e 5 deste estudo foram avaliar os efeitos da ingestão de selênio através da castanha-do-Brasil durante 6 meses sobre parâmetros de estresse oxidativo (oxidantes, dano oxidativo e atividade antioxidante), em indivíduos com DM2. Os resultados revelaram uma redução significativa dos níveis de DCF, sugerindo uma

redução no *pool* de ERO, tais como o H_2O_2 , peroxinitrito, $OH\cdot$ e em menor grau, $O_2\cdot^-$. Além disso, o conteúdo de nitritos, que avalia subprodutos do metabolismo do NO, também foi reduzido após o consumo da castanha-do-Brasil. Estes achados parecem estar associados com maiores concentrações séricas de selênio, como demonstrado pela correlação de Spearman na Figura 12.

O aumento na produção de ERO em indivíduos com DM2 pode ocorrer por diferentes vias metabólicas. O aumento dos níveis de glicose na corrente sanguínea pode levar diretamente à formação de ERO, pois há um aumento na atividade do ciclo do ácido cítrico, que gera um excesso do NADH, acentuando o extravasamento de elétrons da cadeia transportadora mitocondrial. Os elétrons que escapam da cadeia podem levar à geração de $O_2\cdot^-$ (Valko et al., 2004). Além disso, altos níveis desta hexose podem acarretar em auto-oxidação da mesma, através da enolização, gerando um radical enediol (Giacco e Brownlee, 2010). Este radical enediol transfere seu elétron não pareado a uma molécula de O_2 , gerando um $O_2\cdot^-$ e uma dicarbonila (Halliwell e Gutteridge, 2007). Normalmente o $O_2\cdot^-$ é catabolizado pela SOD, gerando H_2O_2 . Entretanto, esta reação é três vezes mais lenta do que a do superóxido com NO. O NO é uma molécula reguladora chave com efeitos metabólicos, vasculares e celulares extensivos (Tessari et al., 2010). Embora baixos níveis de NO sejam benéficos para várias funções fisiológicas e celulares, altos níveis de NO podem causar efeitos prejudiciais nas células. Assim, quanto maior forem os níveis de NO, maior será a velocidade de reação com ânion superóxido, gerando peroxinitrito, que se liga às proteínas e, portanto, afetando suas funções (Pacher et al., 2007). Embora existam controvérsias, algumas pesquisas já relataram uma associação positiva entre a hiperglicemia e a produção de NO, tanto *in vitro* quanto em pacientes diabéticos (Maejima et al., 2001; Ghosh et al., 2011; Adela et al., 2015).

Baseado nisto, e no fato desta intervenção nutricional não ter mostrado efeitos positivos sobre o perfil glicêmico, mantendo-se os níveis de glicose no sangue, especulou-se que a diminuição de oxidantes encontrada neste trabalho, seria resultado de uma melhora na capacidade antioxidante plasmáticas destes pacientes. Confirmando esta hipótese, o consumo de uma castanha-do-Brasil por dia durante seis meses, foi capaz de aumentar os níveis de GSH e aumentar a atividade das enzimas antioxidantes GPx e CAT. Além disso, os achados deste estudo mostraram uma correlação positiva entre as concentrações séricas de selênio e estes marcadores do *status* antioxidante. Neste contexto, esta propriedade antioxidante é relevante para reduzir o risco de

desenvolvimento das complicações diabéticas (Dincer et al., 2002; Calabrese et al., 2012).

O aumento nas concentrações séricas de selênio está diretamente associado ao aumento nos níveis de GPx e GSH. A GPx é uma enzima antioxidante que além de remover o H_2O_2 e peróxidos orgânicos, promove a manutenção de grupos sulfídricos na forma reduzida (Tsai et al., 2012). Para inativar um agente oxidante, a GPx utiliza GSH que é um componente muito importante do sistema de defesa antioxidante (Halliwell e Guteridge, 2007). Parece que indivíduos diabéticos refratários ao tratamento convencional com hipoglicemiante oral, apresentam baixos níveis de GSH em detrimento de uma deficiência nutricional dos seus precursores (Sekhar et al, 2011). Assim, visto que a castanha-do-Brasil apresenta um aminograma com boas quantidades de metionina e cisteína, isto poderia explicar o aumento dos níveis deste poderoso antioxidante não enzimático, observado neste estudo.

Por outro lado, os mecanismos pelas quais o selênio pode impactar no aumento da CAT ainda são escassos na literatura. Tomados em conjunto, os dados discutidos até o momento, poderiam explicar, pelo menos em parte o aumento da CAT, uma vez que os pacientes mantiveram o quadro hiperglicêmico e hiperinsulinêmico, outrora mencionados como fatores importantes na produção indireta de H_2O_2 .

Ensaio clínico que exploram a influência da suplementação de selênio em pacientes com diabetes são muito limitados. Nesta população, entretanto, o selênio parece reduzir substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), um parâmetro de peroxidação lipídica. A lipoperoxidação é uma reação bioquímica decorrente da ação de ERO sobre as membranas celulares, que leva a sérios danos de estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos, e em condição extrema, à morte celular. Um dos produtos gerados por esta reação é o MDA, que possui ação citotóxica e genotóxica e já foi visto estar aumentado no DM2 (Kumawat et al., 2012). Ao avaliar os níveis de MDA, antes e depois do consumo da castanha-do-Brasil, foi verificado uma redução deste marcador. Além disso, esta redução está associada à maiores concentrações de selênio.

Em se tratando de proteínas, o excesso na produção de ERO também pode atacar tais macromoléculas, resultando em oxidação das cadeias laterais de aminoácidos e formação de novos grupamentos, tais como os grupamentos carbonila, levando à perda funcional de proteínas (Hawkins e Davies, 2001). A literatura diz que indivíduos com DM2 possuem maiores níveis de proteínas oxidadas quando comparados com indivíduos não diabéticos (Narasimhan et al., 2010) e isso está associado

às complicações desta doença (Martin-Gallan et al., 2003). Neste estudo, uma menor oxidação de proteínas foi observada, uma vez que os grupamentos carbonila diminuíram e os níveis de tióis totais aumentaram.

Poucos estudos com seres humanos avaliaram o efeito da suplementação com selênio sobre os marcadores de estresse oxidativo em pacientes com DM2, ao passo que o presente estudo, é o primeiro a investigar estes efeitos através do consumo de um alimento fonte. Adicionalmente, pesquisas analisando os efeitos do consumo da castanha-do-Brasil em outras condições clínicas já foram realizadas, entretanto os achados ainda são controversos.

O estudo SETCAP conduzido com a população alemã, verificou que a suplementação com 200 µg e 500 µg de selenito de sódio por dia durante 12 semanas aumentou a atividade da enzima GPx nos eritrócitos dos pacientes com doença arterial coronariana, no entanto, os marcadores de estresse oxidativo, isoprostanos e SOD, não foram alterados após a suplementação com ambas as concentrações (Schnabel et al., 2008). Por outro lado, um estudo suplementando selenito de sódio (100 µg/dia) em pacientes diabéticos tipo 2 descompensados, durante 3 meses, apresentou redução nas concentrações de TBA-RS quando comparado ao grupo controle-diabético (Kähler et al., 1993).

Um estudo clínico randomizado, duplo-cego e controlado, realizado entre 60 pacientes com DM2 e doença arterial coronariana, mostrou que a suplementação de selênio (200 µg/dia) por 8 semanas aumentou significativamente a capacidade antioxidante total, sem alterar os níveis de GSH e MDA (Farrokhian et al. 2016). Ainda, diferentemente dos achados do presente estudo, Faghihi et al. (2014) não encontraram alterações nos níveis de TBA-RS e capacidade antioxidante total, ao suplementarem selênio (200 µg/dia) em indivíduos com DM2.

As castanhas-do-Brasil podem melhorar o sistema antioxidante e diminuir os danos oxidativos não somente por ser uma ótima fonte de selênio, mas também por possuírem um alto teor de compostos fenólicos. *In vitro*, estas oleaginosas demonstraram alta atividade antioxidante, inibiram a lipoperoxidação e reduziram os níveis de radicais livres (Pires et al., 2011). Neste trabalho, o aumento na atividade da GPx após 6 meses de ingestão diária de castanha-do-Brasil foi corroborado pelos resultados de outros estudos (Stockler-Pinto et al., 2010; Cominetti et al., 2012; Huguenin et al., 2015; Rita Cardoso et al., 2016). Desta maneira, espera-se que o aumento na atividade desta enzima reduza a produção de H₂O₂, o que, por sua vez, reduziria os estímulos de peroxidação lipídica e de oxidação às proteínas como sugerido por Padurariu et al. (2010). Em indivíduos sob hemodiálise, o consumo de uma castanha-do-Brasil por

seis meses ($\approx 290 \mu\text{g}/\text{dia}$) reduziu os danos oxidativos avaliados através dos níveis de 8-isoprostanos e 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG) (Stockler-Pinto et al., 2014). Os parâmetros avaliados neste estudo estão entre os marcadores de estresse oxidativo mais utilizados na pesquisa científica. Em detrimento disto, os mesmos não podem ser considerados uma indicação sólida do estado redox porque ainda não estão bem esclarecidos os mecanismos pelas quais o selênio desempenha seu papel.

A hiperglicemia, característica do DM2, aumenta a produção de ERO e induz dano em DNA (Giacco e Brownlee 2010). Em conjunto, estes fatores têm sido associados ao aumento do risco de câncer (Lee e Chan, 2015). Sabe-se que o aumento da instabilidade genômica é considerado uma das causas fundamentais para o desenvolvimento desta doença (Ip et al., 2000; Fenech, 2008) e o selênio poderia desempenhar um papel importante na proteção celular contra estes danos através da GPx e outras selenoproteínas, capazes de neutralizar ERO (Rayman, 2012). No entanto, os efeitos do selênio sobre a estabilidade cromossômica ainda não estão claros.

Estudos de Xavier e colaboradores (2015), observaram que indivíduos diabéticos sem controle glicêmico ($\text{HbA1c} > 7\%$) possuem aumento dos danos em DNA quando comparados com DM2 controlado ($\text{HbA1c} > 7\%$), mesmo utilizando hipoglicemiante oral. Além disso, existem evidências de que indivíduos com DM2 apresentam um sistema de reparo do DNA menos eficiente (Sliwinska et al., 2008). Blasiak et al. (2004) comparam a eficiência de reparo, em um grupo de pacientes DM2 com a doença descontrolada em relação a um grupo de indivíduos saudáveis, em resposta ao dano causado por H_2O_2 . Além de apresentarem um nível de dano basal maior do que indivíduos saudáveis, quando expostos à um agente mutagênico, os pacientes com DM2 apresentaram também uma menor eficiência de reparo.

Um aumento na produção das ERO poderia também estar envolvido no dano ao DNA induzido pela homocisteína. A homocisteína induz dano ao DNA e leva à apoptose celular, ambos processos mediados pela elevação intracelular de H_2O_2 . Uma vez que esse agente mutagênico já foi visto causar necrose e instabilidade genômica em linfócitos humanos, Crott e Fenech (2001) sugeriram que em concentrações elevadas, como visto nos participantes deste estudo, a homocisteína também desempenha papel genotóxico.

O Ensaio Cometa é utilizado para analisar lesões genômicas, tais como quebras de fita simples e dupla do DNA, sítios alcali-lábeis e lesões oxidativas específicas, as quais são passíveis de reparo (Tice et al., 2000). Adicionando DNA glicosilases à versão clássica deste ensaio, é possível

medir danos de DNA específicos, como bases oxidadas. A enzima mais comumente utilizada é a FPG, que detecta purinas oxidadas, incluindo 8-oxoguanina, uma das lesões de DNA mais comuns resultantes do ataque de ERO, sendo um importante biomarcador de estresse oxidativo (Danielsen et al., 2008). Assim, a incubação com esta enzima específica permite uma estimativa dos níveis de dano oxidativo em DNA (Azqueta et al., 2009). Os resultados do presente estudo avaliados através do Ensaio Cometa demonstraram que a ingestão de selênio através da castanha-do-Brasil pode ter um grande potencial antígeno-tóxico. Além disso, houve uma redução no dano oxidativo ao DNA, avaliado através do Ensaio Cometa modificado com o uso da enzima FPG.

Um outro teste utilizado neste estudo para análise da instabilidade genômica foi o teste do MN em células esfoliadas da mucosa bucal, conhecido como *the buccal micronucleus cytome (BMCyt) assay* (Thomas et al., 2009). É um ensaio cuja utilização para o biomonitoramento de alterações genéticas em seres humanos têm crescido, uma vez que apresenta algumas vantagens por ser minimamente invasivo e de rápido preparo, sem necessidade de cultivo celular (Bonassi et al., 2011). Além disso, o ensaio BMCyt é bastante versátil, pois podem ser feitas análises de avaliação de danos no DNA, proliferação celular, diferenciação celular e morte celular (Bolognesi et al., 2015). As células da mucosa bucal são importantes fontes de informações citogenéticas, pois constituem a primeira barreira na rota de inalação ou ingestão, e são capazes de metabolizar ERO (Blasiak et al., 2004; Holland et al., 2008; Bolognesi et al., 2013). Em indivíduos com DM2 e com idade avançada pode haver uma maior prevalência de MN, e isto pode estar associado ao estresse oxidativo, ocasionando maior grau de genotoxicidade (Blasiak et al., 2004; Zuniga-Gonzalez et al., 2007; Martínez-Pérez et al., 2007; Corbi, 2014).

Através do teste de MN em células esfoliadas da mucosa bucal, foram analisadas as frequências de anormalidades nucleares e dano nuclear, referentes às últimas 3 semanas antes do teste, uma vez que tempo de migração celular desde a camada basal até à superfície queratinizada é de 7 a 21 dias (Thomas et al., 2009). Os dados revelaram que o consumo de uma castanha-do-Brasil ao dia, durante seis meses, por pacientes diabéticos, apresentou potencial antimutagênico, capaz de diminuir a frequência de células binucleadas, células com brotamento nuclear e células com MN. A não incorporação do fragmento cromossômico leva à exteriorização nuclear do mesmo, ao passo que dependendo do momento da análise, sugere-se que o brotamento nuclear

seja um estágio precoce ou inicial do processo de micronucleação (Salazar et al., 2009).

Poucas publicações em humanos correlacionam as quatro variáveis essenciais abordadas neste estudo: ingestão de selênio através da castanha-do-Brasil, DM2, estresse oxidativo e dano em DNA. O presente trabalho é o primeiro a avaliar os efeitos do consumo de selênio através de um alimento sobre danos em DNA avaliados pelo ensaio cometa e BMCyt. Entretanto, a literatura descreve outros estudos que utilizaram intervenções nutricionais e medicamentosas, como a suplementação de ácido fólico, consumo de vegetais e o próprio tratamento convencional do DM2, com consequente redução de dano em DNA característico do paciente diabético (Shaik et al. 2010; Bonassi et al., 2011; Lazalde-Ramos et al. 2012; Müllner et al. 2013). Lazalde-Ramos et al. (2012) por exemplo, trataram indivíduos diabéticos com 5 mg de ácido fólico durante um mês. Estes autores observaram um aumento do número de MN, níveis elevados de 8-OHdG e peroxidação de lipídeos nestes pacientes, quando comparados com indivíduos controle, e após a intervenção, esses marcadores de dano oxidativo e dano em DNA foram reduzidos. Ainda, Müllner e colaboradores (2013) ofereceram 300 g de vegetais e 25 mL de ácidos graxos poli-insaturados por dia à pacientes diabéticos e controles, durante 8 semanas. Os autores observaram uma correlação positiva entre glicemia de jejum aumentada, HbA1c e a frequência de MN, e a intervenção realizada nos participantes não foi capaz de reverter esta frequência. Assim, estes autores também chegaram à conclusão do quadro de instabilidade genômica em pacientes diabéticos.

Quanto aos efeitos do selênio por si só, Wu e colaboradores (2009) descreveram que o uso de SeMet *in vitro*, pode melhorar a instabilidade genômica em linfócitos de seres humanos, quando este mineral encontra-se em níveis de até 430 µg/L, mas que, acima disto poderia exercer efeito citotóxico.

A castanha-do-Brasil é reconhecida por ser a melhor fonte vegetal de selênio encontrada na natureza, além de possuir boas quantidades de compostos fenólicos e ácidos graxos insaturados. A simples recomendação diária desta oleaginosa, parece ser uma opção efetiva para a modulação da instabilidade genômica apresentada pelos pacientes avaliados neste estudo, uma vez que os resultados mostraram uma redução significativa nos dados obtidos a partir do ensaio cometa e BMCyt. Está bem claro na literatura, que um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e um aumento na produção de ERO fazem parte da fisiopatologia do DM2 (Giacco e Brownlee, 2010). Adicionalmente, o

dano oxidativo em DNA tem papel fundamental no aparecimento de mutações, portanto, compostos que previnam, revertam ou reduzam essas alterações são pensados como potenciais substâncias para a prevenção de doenças associadas à instabilidade genômica (Wang et al., 2016), um fator decisivo na iniciação e progressão do câncer (Ferguson et al., 2015).

Os mecanismos pelos quais o selênio atua sobre os danos em DNA ainda não estão claros. Entretanto, alguns estudos afirmam que há uma associação entre este mineral e fatores responsáveis pelo reparo do DNA, o que auxiliaria na manutenção da estabilidade genômica (Bera et al., 2013). Os achados de Jung et al. (2013), sugerem que compostos orgânicos de selênio podem aumentar a interação das proteínas Gadd45, PCNA e APE1. A APE 1 é uma endonuclease chave da via de reparo do DNA por excisão de bases (BER). Os autores ainda descrevem que esta interação seria mediada por p53, que é considerado um “guardião” do genoma. Este trabalho não avaliou tais proteínas, portanto, é plausível propor que os resultados do presente trabalho sugerem que a modulação dos danos em DNA observados em indivíduos com DM2 possivelmente ocorre através do aumento na capacidade antioxidante, levando à uma redução dos níveis de oxidantes, e conseqüentemente menores danos em DNA.

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo demonstraram que indivíduos diabéticos podem beneficiar-se do consumo diário da castanha-do-Brasil, pois os participantes apresentaram uma melhora no perfil lipídico, redução na produção de oxidantes, aumento no *status* antioxidante e redução dos danos oxidativos a proteínas, lipídios e DNA. Além disso, esta intervenção nutricional apresentou potencial efeito antígeno-tóxico e antimutagênico, por reduzir a fragmentação do DNA e a frequência de MN, essenciais na instabilidade genômica observada no DM2. Entretanto, estas alterações positivas não foram acompanhadas de melhora da homeostase glicêmica.

Sendo assim, é importante ressaltar que a suplementação de micronutrientes não deve ser uma prática rotineira porque precisa ser individualizada e mediante sua deficiência. Por isso, mais estudos são necessários a fim de se comprovarem os reais efeitos do uso de selênio, em forma de suplemento ou através do consumo da castanha-do-Brasil, por indivíduos com DM2, e avaliar possíveis efeitos colaterais.

REFERÊNCIAS

- Abramson JH. WINPEPI updated: computer programs for epidemiologists, and their teaching potential. *Epidemiol Perspect Innov.* 2011;8(1):1.
- Adela R, Nethi SK, Bagul PK, Barui AK, Mattapally S, Kuncha M, Patra CR, Reddy PN, Banerjee SK. Hyperglycaemia enhances nitric oxide production in diabetes: a study from South Indian patients. *PLoS One.* 2015;10(4):e0125270.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.
- Akash MS, Rehman K, Chen S. Role of inflammatory mechanisms in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Cell Biochem.* 2013;114(3):525-31.
- Akbaraly TN, Arnaud J, Rayman MP, Hininger-Favier I, Roussel AM, Berr C, Fontbonne A. Plasma selenium and risk of dysglycemia in an elderly French population: results from the prospective Epidemiology of Vascular Ageing Study. *Nutr Metab (Lond).* 2010;7:21.
- Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2001;302(2-3):141-5.
- Al-Salmani K, Abbas HH, Schulpen S, Karbaschi M, Abdalla I, Bowman KJ, So KK, Evans MD, Jones GD, Godschalk RW, Cooke MS. Simplified method for the collection, storage, and comet assay analysis of DNA damage in whole blood. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(3):719-25.
- American Diabetes Association (USA). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2012;35 Suppl 1:S64-71.
- Amin KA, Hashem KS, Alshehri FS, Awad ST, Hassan MS. Antioxidant and Hepatoprotective Efficiency of Selenium Nanoparticles Against Acetaminophen-Induced Hepatic Damage. *Biological trace element research.* 2017;175(1):136-45.
- Anstee QM, McPherson S, Day CP. How big a problem is non-alcoholic fatty liver disease? *BMJ.* 2011;343:d3897.

Aouacheri O, Saka S, Krim M, Messaadia A, Maida I. The investigation of the oxidative stress-related parameters in type 2 diabetes mellitus. *Can J Diabetes*. 2015;39(1):44-9.

Arnaud J, Akbaraly TN, Hininger I, Roussel AM, Berr C. Factors associated with longitudinal plasma selenium decline in the elderly: the EVA study. *J Nutr Biochem*. 2007;18(7):482-7.

Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett WC, Krauss RM. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA*. 1988;260(13):1917-21.

Azimi-Nezhad M, Ghayour-Mobarhan M, Parizadeh MR, Safarian M, Esmaili H, Parizadeh SM, Khodae G, Hosseini J, Abasalti Z, Hassankhani B, Ferns G. Prevalence of type 2 diabetes mellitus in Iran and its relationship with gender, urbanisation, education, marital status and occupation. *Singapore Med J*. 2008;49(7):571-6.

Azqueta A, Collins AR. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch Toxicol*. 2013;87(6):949-68.

Azqueta A, Lorenzo Y, Collins AR. In vitro comet assay for DNA repair: a warning concerning application to cultured cells. *Mutagenesis*. 2009;24(4):379-81.

Barreira E, Novo A, Vaz JA, Pereira AMG. Dietary program and physical activity impact on biochemical markers in patients with type 2 diabetes: A systematic review. *Aten Primaria*. 2017.

Bassing CH, Chua KF, Sekiguchi J, Suh H, Whitlow SR, Fleming JC, Monroe BC, Ciccone DN, Yan C, Vlasakova K, Livingston DM, Ferguson DO, Scully R, Alt FW. Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(12):8173-8.

Battell ML, Delgatty HL, McNeill JH. Sodium selenate corrects glucose tolerance and heart function in STZ diabetic rats. *Mol Cell Biochem*. 1998;179(1-2):27-34.

Becker DJ, Reul B, Ozcelikay AT, Buchet JP, Henquin JC, Brichard SM.

Oral selenate improves glucose homeostasis and partly reverses abnormal expression of liver glycolytic and gluconeogenic enzymes in diabetic rats. *Diabetologia*. 1996;39(1):3-11.

Beckett GJ, Arthur JR. Selenium and endocrine systems. *The Journal of endocrinology*. 2005;184(3):455-65.

Bera S, Rosa VD, Rachidi W, Diamond AM. Does a role for selenium in DNA damage repair explain apparent controversies in its use in chemoprevention? *Mutagenesis*. 2013;28(2):127-34.

Berg EA, Wu JY, Campbell L, Kagey M, Stapleton SR. Insulin-like effects of vanadate and selenate on the expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase and fatty acid synthase in diabetic rats. *Biochimie*. 1995;77(12):919-24.

Bermingham EN, Hesketh JE, Sinclair BR, Koolaard JP, Roy NC. Selenium-enriched foods are more effective at increasing glutathione peroxidase (GPx) activity compared with selenomethionine: a meta-analysis. *Nutrients*. 2014;6(10):4002-31.

Blasiak J, Arabski M, Krupa R, Wozniak K, Zadrozny M, Kasznicki J, Zurawska M, Drzewoski J. DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. *Mutat Res*. 2004;554(1-2):297-304.

Bleys J, Navas-Acien A, Stranges S, Menke A, Miller ER, 3rd, Guallar E. Serum selenium and serum lipids in US adults. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(2):416-23.

Bodo ET, Stefanka Z, Ipolyi I, Soros C, Dernovics M, Fodor P. Preparation, homogeneity and stability studies of a candidate LRM for Se speciation. *Anal Bioanal Chem*. 2003;377(1):32-8.

Bolognesi C, Bonassi S, Knasmueller S, Fenech M, Bruzzone M, Lando C, Ceppi M. Clinical application of micronucleus test in exfoliated buccal cells: A systematic review and metanalysis. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2015;766:20-31.

Bolognesi C, Knasmueller S, Nersesyan A, Thomas P, Fenech M. The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay - an update and expanded photogallery. *Mutat Res*. 2013;753(2):100-13.

Bonassi S, Coskun E, Ceppi M, Lando C, Bolognesi C, Burgaz S, Holland N, Kirsh-Volders M, Knasmueller S, Zeiger E, Carnesoltas D, Cavallo D, da Silva J, de Andrade VM, Demircigil GC, Dominguez Odio A, Donmez-Altuntas H, Gattas G, Giri A, Giri S, Gomez-Meda B, Gomez-Arroyo S, Hadjidekova V, Haveric A, Kamboj M, Kurteshi K, Martino-Roth MG, Montero Montoya R, Nersesyan A, Pastor-Benito S, Favero Salvadori DM, Shaposhnikova A, Stopper H, Thomas P, Torres-Bugarin O, Yadav AS, Zuniga Gonzalez G, Fenech M. The HUMAN MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutat Res.* 2011;728(3):88-97.

Boussageon R, Bejan-Angoulvant T, Saadatian-Elahi M, Lafont S, Bergeonneau C, Kassai B, Erpeldinger S, Wright JM, Gueyffier F, Cornu C. Effect of intensive glucose lowering treatment on all cause mortality, cardiovascular death, and microvascular events in type 2 diabetes: meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ.* 2011;343:d4169.

Broedbaek K, Siersma V, Henriksen T, Weimann A, Petersen M, Andersen JT, Jimenez-Solem E, Stovgaard ES, Hansen LJ, Henriksen JE, Bonnema SJ, Olivarius NF, Poulsen HE. Urinary markers of nucleic acid oxidation and long-term mortality of newly diagnosed type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2011;34(12):2594-6.

Brown KM, Arthur JR. Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutr.* 2001;4(2B):593-9.

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001;414(6865):813-20.

Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes.* 2005;54(6):1615-25.

Burgering BM, Coffey PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature.* 1995;376(6541):599-602.

Calabrese V, Cornelius C, Leso V, Trovato-Salinaro A, Ventimiglia B, Cavallaro M, Scuto M, Rizza S, Zanoli L, Neri S, Castellino P. Oxidative stress, glutathione status, sirtuin and cellular stress response in type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822(5):729-36.

Cardoso BR. Efeitos do consumo de castanha-do-brasil (*Bertholetia excelsa* H.B.K.) sobre o estresse oxidativo em pacientes com comprometimento cognitivo leve e a relação com variações em genes de selenoproteínas [tese de doutorado]. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas/ Universidade de São Paulo; 2014.

Carvalho RF, Huguenin GV, Luiz RR, Moreira AS, Oliveira GM, Rosa G. Intake of partially defatted Brazil nut flour reduces serum cholesterol in hypercholesterolemic patients--a randomized controlled trial. *Nutr J*. 2015;14:59.

Castelli WP, Abbott RD, Mcnamara PM. Summary estimates of cholesterol used to predict coronary heart disease. *Circulation*. 1983;67(4):730-4.

Castilho INB. Desenvolvimento de métodos para a determinação de selênio em solo por espectrometria de absorção atômica [tese de doutorado]. Programa de Pós-Graduação em Química. Florianópolis: Centro de Ciências Físicas e Matemáticas/ Universidade Federal de Santa Catarina; 2016.

Cebioglu M, Schild HH, Golubnitschaja O. Cancer predisposition in diabetics: risk factors considered for predictive diagnostics and targeted preventive measures. *EPMA J*. 2010;1(1):130-7.

Cebioglu M, Schild HH, Golubnitschaja O. Diabetes mellitus as a risk factor for cancer: stress or viral etiology? *Infect Disord Drug Targets*. 2008;8(2):76-87.

Celeste A, Difilippantonio S, Difilippantonio MJ, Fernandez-Capetillo O, Pilch DR, Sedelnikova OA, Eckhaus M, Ried T, Bonner WM, Nussenzweig A. H2AX haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility. *Cell*. 2003;114(3):371-83.

Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA, Reina-San-Martin B, Coppola V, Meffre E, Difilippantonio MJ, Redon C, Pilch DR, Oлару A, Eckhaus M, Camerini-Otero RD, Tessarollo L, Livak F, Manova K, Bonner WM, Nussenzweig MC, Nussenzweig A. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science*. 2002;296(5569):922-7.

Chae SY, Lee M, Kim SW, Bae YH. Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin. *Biomaterials*. 2004;25(5):843-50.

Chakravarty S, Rizvi SI. Day and Night GSH and MDA Levels in Healthy Adults and Effects of Different Doses of Melatonin on These Parameters. *Int J Cell Biol*. 2011;2011:404591.

Chan JM, Darke AK, Penney KL, Tangen CM, Goodman PJ, Lee GM, Sun T, Peisch S, Tinianow AM, Rae JM, Klein EA, Thompson IM, Jr., Kantoff PW, Mucci LA. Selenium- or Vitamin E-Related Gene Variants, Interaction with Supplementation, and Risk of High-Grade Prostate Cancer in SELECT. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2016;25(7):1050-8.

Chang J, Gutenmann W, Reid C, Lisk D. Selenium content of brazil nuts from two geographic locations in Brazil. *Chemosphere*. 1995;30:801-2.

Chen J. An original discovery: selenium deficiency and Keshan disease (an endemic heart disease). *Asia Pac J Clin Nutr*. 2012;21(3):320-6.

Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron*. 1976;16(1):31-41.

Collins AR, Raslova K, Somorovska M, Petrovska H, Ondrusova A, Vohnout B, Fabry R, Dusinska M. DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. *Free radical biology & medicine*. 1998;25(3):373-7.

Cominetti C, de Bortoli MC, Garrido AB, Jr., Cozzolino SM. Brazilian nut consumption improves selenium status and glutathione peroxidase activity and reduces atherogenic risk in obese women. *Nutr Res*. 2012;32(6):403-7.

Contois JH, Warnick GR, Sniderman AD. Reliability of low-density lipoprotein cholesterol, non-high-density lipoprotein cholesterol, and apolipoprotein B measurement. *J Clin Lipidol*. 2011;5(4):264-72.

Cooke MS, Evans MD, Dove R, Rozalski R, Gackowski D, Siomek A, Lunec J, Olinski R. DNA repair is responsible for the presence of oxidatively damaged DNA lesions in urine. *Mutat Res*. 2005;574(1-2):58-66.

Corbi SCT. Avaliação da Expressão Gênica e de Lesões no DNA de Indivíduos Portadores de Diabetes Mellitus Tipo 2, Dislipidemia e Periodontite Crônica [tese de doutorado]. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Araraquara: Faculdade de Odontologia/ Universidade Estadual Paulista; 2014.

Costa S, Coelho P, Costa C, Silva S, Mayan O, Santos LS, Gaspar J, Teixeira JP. Genotoxic damage in pathology anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde. *Toxicology*. 2008;252(1-3):40-8.

Cozzolino SMF. Biodisponibilidade de Nutrientes. 5. ed. São Paulo: Manole; 2016.

Cozzolino SMF. Recomendações de Nutrientes: Força-tarefa Alimentos Fortificados e Suplementos. Série de Publicações International Life Sciences Institute Brasil. 2009.

Crott JW, Fenech M. Preliminary study of the genotoxic potential of homocysteine in human lymphocytes in vitro. *Mutagenesis*. 2001;16(3):213-7.

Czernichow S, Couthouis A, Bertrais S, Vergnaud AC, Dauchet L, Galan P, Hercberg S. Antioxidant supplementation does not affect fasting plasma glucose in the Supplementation with Antioxidant Vitamins and Minerals (SU.VI.MAX) study in France: association with dietary intake and plasma concentrations. *Am J Clin Nutr*. 2006;84(2):395-9.

Da Luz PL, Cesena FH, Favarato D, Cerqueira ES. Comparison of serum lipid values in patients with coronary artery disease at <50, 50 to 59, 60 to 69, and >70 years of age. *Am J Cardiol*. 2005;96(12):1640-3.

Da Luz PL, Favarato D, Faria Neto JR Jr, Lemos P, Chagas ACP. High Ratio of triglycerides to HDL cholesterol predicts extensive coronary disease. *Clinics (São Paulo)*. 2008;63(4):427-32.

Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, Lin JK, Farzadfar F, Khang YH, Stevens GA, Rao M, Ali MK, Riley LM, Robinson CA, Ezzati M, Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating G. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet*.

2011;378(9785):31-40.

Danielsen PH, Brauner EV, Barregard L, Sallsten G, Wallin M, Olinski R, Rozalski R, Moller P, Loft S. Oxidatively damaged DNA and its repair after experimental exposure to wood smoke in healthy humans. *Mutat Res.* 2008;642(1-2):37-42.

De Beer JC, Liebenberg L. Does cancer risk increase with HbA1c, independent of diabetes? *Br J Cancer.* 2014;110(9):2361-8.

DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, Henry RR, Herman WH, Holst JJ, Hu FB, Kahn CR, Raz I, Shulman GI, Simonson DC, Testa MA, Weiss R. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15019.

Despres JP, Lemieux I. Review Article Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature.* 2006;444:881-7.

Dincer Y, Akcay T, Alademir Z, Ilkova H. Assessment of DNA base oxidation and glutathione level in patients with type 2 diabetes. *Mutat Res.* 2002;505(1-2):75-81.

Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(2):98-107.

Dong J, Sulik KK, Chen SY. The role of NOX enzymes in ethanol-induced oxidative stress and apoptosis in mouse embryos. *Toxicol Lett.* 2010;193(1):94-100.

Dumont E, De Pauw L, Vanhaecke F, Cornelis R. Speciation of Se in *Bertholletia excelsa* (Brazil nut): A hard nut to crack? *Food Chem.* 2006;95:684-92.

Earle KA, Zitouni K, Pepe J, Karaflou M, Godbold J, Jr. Modulation of endogenous antioxidant defense and the progression of kidney disease in multi-heritage groups of patients with type 2 diabetes: PROspective EVALuation of Early Nephropathy and its Treatment (PREVENT). *J Transl Med.* 2016;14(1):234.

Eckel RH, Kahn SE, Ferrannini E, Goldfine AB, Nathan DM, Schwartz MW, Smith RJ, Smith SR, Endocrine S, American Diabetes A, European Association for the Study of D. Obesity and type 2 diabetes: what can be unified and what needs to be individualized? *Diabetes Care.*

2011;34(6):1424-30.

Elias LG, Bressani R. The nutritive value of the Brazil nut oil. *J American Oil Chem Soc.* 1961;38:450-2.

Erbayraktar Z, Yilmaz O, Artmann AT, Cehreli R, Coker C. Effects of selenium supplementation on antioxidant defense and glucose homeostasis in experimental diabetes mellitus. *Biological trace element research.* 2007;118(3):217-26.

Faghihi T, Radfar M, Barmal M, Amini P, Qorbani M, Abdollahi M, Larijani B. A randomized, placebo-controlled trial of selenium supplementation in patients with type 2 diabetes: effects on glucose homeostasis, oxidative stress, and lipid profile. *Am J Ther.* 2014;21(6):491-5.

Farrokhian A, Bahmani F, Taghizadeh M, Mirhashemi SM, Aarabi MH, Raygan F, Aghadavod E, Asemi Z. Selenium Supplementation Affects Insulin Resistance and Serum hs-CRP in Patients with Type 2 Diabetes and Coronary Heart Disease. *Horm Metab Res.* 2016;48(4):263-8.

Fatehi-Hassanabad Z, Chan CB, Furman BL. Reactive oxygen species and endothelial function in diabetes. *Eur J Pharmacol.* 2010;636(1-3):8-17.

Febiyanto N, Yamazaki C, Kameo S, Sari DK, Puspitasari IM, Sunjaya DK, Herawati DMD, Nugraha GI, Fukuda T, Koyama H. Effects of Selenium Supplementation on the Diabetic Condition Depend on the Baseline Selenium Status in KKAY Mice. *Biological trace element research.* 2017.

Fenech M. Genome health nutrigenomics and nutrigenetics--diagnosis and nutritional treatment of genome damage on an individual basis. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(4):1365-70.

Ferguson LR, Karunasinghe N, Zhu S, Wang AH. Selenium and its' role in the maintenance of genomic stability. *Mutat Res.* 2012;733(1-2):100-10.

Ferguson LR, Chen H, Collins AR, Connell M, Damia G, Dasgupta S, Malhotra M, Meeker AK, Amedei A, Amin A, Ashraf SS, Aquilano K, Azmi AS, Bhakta D, Bilsland A, Boosani CS, Chen S, Ciriolo MR, Fujii

H, Guha G, Halicka D, Helferich WG, Keith WN, Mohammed SI, Nicolai E, Yang X, Honoki K, Parslow VR, Prakash S, Rezazadeh S, Shackelford RE, Sidransky D, Tran PT, Yang ES, Maxwell CA. Genomic instability in human cancer: Molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition. *Semin Cancer Biol.* 2015;35 Suppl:S5-S24.

Ferreira IMC, Jorcelino SPN, Cabral JM. Tratamento da diabetes mellitus tipo 2 e comorbidades hepáticas. Relato de caso e revisão da literatura. *Rev Bras Clin Med.* 2013;11(2):183-93.

Ferreira KS, Gomes JC, Bellato CR, Jordão CP. Concentrações de selênio em alimentos consumidos no Brasil. *Rev Panam Salud Publica.* 2002;11(3):172-7, 2002.

Finley JW. Selenium accumulation in plant foods. *Nutr Rev.* 2005;63(6 Pt 1):196-202.

Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984;105:114-21.

Flohe L, Gunzler WA, Schock HH. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.* 1973;32(1):132-4.

Fox TE, Van den Heuvel EG, Atherton CA, Dainty JR, Lewis DJ, Langford NJ, Crews HM, Luten JB, Lorentzen M, Sieling FW, van Aken-Schneyder P, Hoek M, Kotterman MJ, van Dael P, Fairweather-Tait SJ. Bioavailability of selenium from fish, yeast and selenate: a comparative study in humans using stable isotopes. *Eur J Clin Nutr.* 2004;58(2):343-9.

Friedberg EC. DNA damage and repair. *Nature.* 2003;421(6921):436-40.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972;18(6):499-502.

Friso S, Choi SW. Gene-nutrient interactions in one-carbon metabolism. *Curr Drug Metab.* 2005;6(1):37-46.

Fu CC, Wu DA, Wang JH, Yang WC, Tseng CH. Association of C-reactive protein and hyperuricemia with diabetic nephropathy in Chinese

type 2 diabetic patients. *Acta Diabetol.* 2009;46(2):127-34.

Geloneze B, Repetto EM, Geloneze SR, Tambascia MA, Ermetice MN. The threshold value for insulin resistance (HOMA-IR) in an admixed population IR in the Brazilian Metabolic Syndrome Study. *Diabetes Res Clin Pract.* 2006;72(2):219-20.

Geloneze B, Tambascia MA. Avaliação laboratorial e diagnóstica da resistência insulínica. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006;50(2):208-15.

Ghosh A, Sherpa ML, Bhutia Y, Pal R, Dahal S. Serum nitric oxide status in patients with type 2 diabetes mellitus in Sikkim. *Int J Appl Basic Med Res.* 2011;1(1):31-5.

Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res.* 2010;107(9):1058-70.

Gomes EC, Silva AN, de Oliveira MR. Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:756132.

Gonçalves AM, Fernandes KG, Ramos LA, Cavalheiro ETG, Nóbrega JA. Determination and fractionation of barium in Brazil nuts. *J Braz Chem Soc.* 2009;20(4):760-9.

Greenfield JR, Campbell LV. Relationship between inflammation, insulin resistance and type 2 diabetes: 'cause or effect'? *Curr Diabetes Rev.* 2006;2(2):195-211.

Gromadzinska J, Reszka E, Bruzelius K, Wasowicz W, Akesson B. Selenium and cancer: biomarkers of selenium status and molecular action of selenium supplements. *Eur J Nutr.* 2008;47 Suppl 2:29-50.

Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S, Valentini J, Charao MF, Moro AM, Nascimento PC, Pomblum VJ, Garcia SC. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *J Pharm Biomed Anal.* 2007;43(2):619-24.

Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014;103(2):137-49.

Gupta S, Gambhir JK, Kalra O, Gautam A, Shukla K, Mehndiratta M, Agarwal S, Shukla R. Association of biomarkers of inflammation and oxidative stress with the risk of chronic kidney disease in Type 2 diabetes mellitus in North Indian population. *J Diabetes Complications*. 2013;27(6):548-52.

Ha CY, Kim JY, Paik JK, Kim OY, Paik YH, Lee EJ, Lee JH. The association of specific metabolites of lipid metabolism with markers of oxidative stress, inflammation and arterial stiffness in men with newly diagnosed type 2 diabetes. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;76(5):674-82.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. Oxford: Clarendon; 2007.

Hawkins CL, Davies MJ. Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1504(2-3):196-219.

Hercberg S, Bertrais S, Czernichow S, Noisette N, Galan P, Jaouen A, Tichet J, Briancon S, Favier A, Mennen L, Roussel AM. Alterations of the lipid profile after 7.5 years of low-dose antioxidant supplementation in the SU.VI.MAX Study. *Lipids*. 2005;40(4):335-42.

Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*. 1976;74(1):214-26.

Holben DH, Smith AM. The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. *Journal of the American Dietetic Association*. 1999;99(7):836-43.

Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res*. 2008;659:93-108.

Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz G, Liu S, Solomon CG, Willett WC. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N Engl J Med*. 2001;345(11):790-7.

Huang Z, Rose AH, Hoffmann PR. The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2012;16(7):705-43.

Huguenin GV, Moreira AS, Siant'Pierre TD, Goncalves RA, Rosa G, Oliveira GM, Luiz RR, Tibirica E. Effects of Dietary Supplementation with Brazil Nuts on Microvascular Endothelial Function in Hypertensive and Dyslipidemic Patients: A Randomized Crossover Placebo-Controlled Trial. *Microcirculation*. 2015;22(8):687-99.

Ibrahim M, Muhammad N, Naeem M, Deobald AM, Kamdem JP, Rocha JB. In vitro evaluation of glutathione peroxidase (GPx)-like activity and antioxidant properties of an organoselenium compound. *Toxicol In Vitro*. 2015;29(5):947-52.

Institute of Medicine (US) Panel on Dietary A, Related C. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Washington (DC): National Academies Press (US); 2000.

International Diabetes Federation (USA). *Diabetes Atlas (7th Edition)*. 2015.

Ip C, Birringer M, Block E, Kotrebai M, Tyson JF, Uden PC, Lisk DJ. Chemical speciation influences comparative activity of selenium-enriched garlic and yeast in mammary cancer prevention. *J Agric Food Chem*. 2000;48(9):4452.

Ip C, Lisk DJ. Bioactivity of selenium from Brazil nut for cancer prevention and selenoenzyme maintenance. *Nutr Cancer*. 1994;21(3):203-12.

Jacobson BE, Lockitch G. Direct determination of selenium in serum by graphite-furnace atomic absorption spectrometry with deuterium background correction and a reduced palladium modifier: age-specific reference ranges. *Clin Chem*. 1988;34(4):709-14.

Jager A, van Hinsbergh VW, Kostense PJ, Emeis JJ, Yudkin JS, Nijpels G, Dekker JM, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwer CD. von Willebrand factor, C-reactive protein, and 5-year mortality in diabetic and nondiabetic subjects: the Hoorn Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(12):3071-8.

Jenkins DJ, Kendall CW, Josse AR, Salvatore S, Brighenti F, Augustin LS, Ellis PR, Vidgen E, Rao AV. Almonds decrease postprandial glycemia, insulinemia, and oxidative damage in healthy individuals. *J Nutr*. 2006;136(12):2987-92.

Jerome-Morais A, Bera S, Rachidi W, Gann PH, Diamond AM. The effects of selenium and the GPx-1 selenoprotein on the phosphorylation of H2AX. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(6):3399-406.

Jung HJ, Kim HL, Kim YJ, Weon J-I, Seo YR. A novel chemopreventive mechanism of selenomethionine: Enhancement of APE1 enzyme activity via a Gadd45a, PCNA and APE1 protein complex that regulates p53-mediated base excision repair. *Oncol Rep*. 2013;30(4):1581-6.

Kahn SE. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2003;46(1):3-19.

Kahler W, Kuklinski B, Ruhlmann C, Plotz C. [Diabetes mellitus--a free radical-associated disease. Results of adjuvant antioxidant supplementation]. *Z Gesamte Inn Med*. 1993;48(5):223-32.

Kumawat M, Sharma TK, Singh I, Singh N, Ghalaut VS, Vardey SK, et al. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in type 2 Diabetes mellitus patients with and without nephropathy. *N Am J Med Sci*. 2013;5(3):213-9.

Kannamkumarath SS, Wrobel K, Wrobel K, Vonderheide A, Caruso JA. HPLC-ICP-MS determination of selenium distribution and speciation in different types of nut. *Anal Bioanal Chem*. 2002;373(6):454-60.

Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, Quon MJ. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(7):2402-10.

Kendall CW, Esfahani A, Truan J, Srichaikul K, Jenkins DJ. Health benefits of nuts in prevention and management of diabetes. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2010;19(1):110-6.

Khazrai YM, Defeudis G, Pozzilli P. Effect of diet on type 2 diabetes mellitus: a review. *Diabetes Metab Res Rev*. 2014;30 Suppl 1:24-33.

Kim Y, Keogh JB, Clifton PM. Benefits of Nut Consumption on Insulin Resistance and Cardiovascular Risk Factors: Multiple Potential Mechanisms of Actions. *Nutrients*. 2017;9(11).

- Kitamura T. The role of FOXO1 in beta-cell failure and type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9(10):615-23.
- Kocyigit A, Koylu AA, Keles H. Effects of pistachio nuts consumption on plasma lipid profile and oxidative status in healthy volunteers. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2006;16(3):202-9.
- Kohrl J, Brigelius-Flohe R, Bock A, Gartner R, Meyer O, Flohe L. Selenium in biology: facts and medical perspectives. *Biological chemistry*. 2000;381(9-10):849-64.
- Kornhauser C, Garcia-Ramirez JR, Wrobel K, Perez-Luque EL, Garay-Sevilla ME, Wrobel K. Serum selenium and glutathione peroxidase concentrations in type 2 diabetes mellitus patients. *Prim Care Diabetes*. 2008;2(2):81-5.
- Laclaustra M, Stranges S, Navas-Acien A, Ordovas JM, Guallar E. Serum selenium and serum lipids in US adults: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2004. *Atherosclerosis*. 2010;210(2):643-8.
- Laaksonen MA, Knekt P, Rissanen H, Harkanen T, Virtala E, Marniemi J, Aromaa A, Heliovaara M, Reunanen A. The relative importance of modifiable potential risk factors of type 2 diabetes: a meta-analysis of two cohorts. *Eur J Epidemiol*. 2010;25(2):115-24.
- Lazalde-Ramos BP, Zamora-Perez AL, Sosa-Macías M, Guerrero-Velázquez C, Zúñiga-González GM. DNA and oxidative damages decrease after ingestion of folic acid in patients with type 2 diabetes. *Arch Med Res*. 2012; 43(6): 476-81.
- Leahy JL. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res*. 2005;36(3):197-209.
- Lee SC, Chan JC. Evidence for DNA damage as a biological link between diabetes and cancer. *Chin Med J (Engl)*. 2015;128(11):1543-8.
- Lemire M, Philibert A, Fillion M, Passos CJ, Guimaraes JR, Barbosa F, Jr., Mergler D. No evidence of selenosis from a selenium-rich diet in the Brazilian Amazon. *Environ Int*. 2012;40:128-36.
- Letsiou S, Nomikos T, Panagiotakos D, Pergantis SA, Fragopoulou E,

Antonopoulou S, Pitsavos C, Stefanadis C. Serum total selenium status in Greek adults and its relation to age. The ATTICA study cohort. *Biological trace element research*. 2009;128(1):8-17.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1990;186:464-78.

Li N, Jia X, Chen CY, Blumberg JB, Song Y, Zhang W, Zhang X, Ma G, Chen J. Almond consumption reduces oxidative DNA damage and lipid peroxidation in male smokers. *J Nutr*. 2007;137(12):2717-22.

Lim JS, Choi YJ, Kim SK, Huh BW, Lee EJ, Huh KB. Optimal Waist Circumference Cutoff Value Based on Insulin Resistance and Visceral Obesity in Koreans with Type 2 Diabetes. *Diabetes Metab J*. 2015;39(3):253-63.

Lim JS, Yang JH, Chun BY, Kam S, Jacobs DR, Jr., Lee DH. Is serum gamma-glutamyltransferase inversely associated with serum antioxidants as a marker of oxidative stress? *Free Radic Biol Med*. 2004;37(7):1018-23.

Liontiris MI, Mazokopakis EE. A concise review of Hashimoto thyroiditis (HT) and the importance of iodine, selenium, vitamin D and gluten on the autoimmunity and dietary management of HT patients. Points that need more investigation. *Hell J Nucl Med*. 2017;20(1):51-6.

Lodovici M, Giovannelli L, Pitozzi V, Bigagli E, Bardini G, Rotella CM. Oxidative DNA damage and plasma antioxidant capacity in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. *Mutat Res*. 2008;638(1-2):98-102.

Lowndes NF, Toh GW. DNA repair: the importance of phosphorylating histone H2AX. *Curr Biol*. 2005;15(3):R99-R102.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.

Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(5):3143-53.

Maejima K, Nakano S, Himeno M, Tsuda S, Makiishi H, Ito T, Nakagawa

A, Kigoshi T, Ishibashi T, Nishio M, Uchida K. Increased basal levels of plasma nitric oxide in Type 2 diabetic subjects. Relationship to microvascular complications. *J Diabetes Complications*. 2001;15(3):135-43.

Maihara VA, Gonzaga IB, Silva VL, Fávoro DIT, Vasconcellos MAB, Cozzolino SMF. Daily dietary selenium intake of selected Brazilian population groups. *J Radioanal Nucl Chem*. 2004;259:465.

Manoel-Caetano FS, Xavier DJ, Evangelista AF, Takahashi P, Collares CV, Puthier D, Foss-Freitas MC, Foss MC, Donadi EA, Passos GA, Sakamoto-Hojo ET. Gene expression profiles displayed by peripheral blood mononuclear cells from patients with type 2 diabetes mellitus focusing on biological processes implicated on the pathogenesis of the disease. *Gene*. 2012;511(2):151-60.

Mao S, Zhang A, Huang S. Selenium supplementation and the risk of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Endocrine*. 2014;47(3):758-63.

Maranhao PA, Kraemer-Aguiar LG, de Oliveira CL, Kuschnir MC, Vieira YR, Souza MG, Koury JC, Bouskela E. Brazil nuts intake improves lipid profile, oxidative stress and microvascular function in obese adolescents: a randomized controlled trial. *Nutr Metab (Lond)*. 2011;8(1):32.

Martin-Gallan P, Carrascosa A, Gussinye M, Dominguez C. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Radic Biol Med*. 2003;34(12):1563-74.

Martínez-Pérez LM, Cerda-Flores RM, Gallegos-Cabriales EC, Dávila-Rodríguez MI, Ibarra-Costilla E, Cortés-Gutiérrez EI. Frequency of micronuclei in Mexicans with type 2 diabetes mellitus. *Prague Med Rep*. 2007;108(3):248-55.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412-9.

Mattmiller SA, Carlson BA, Sordillo LM. Regulation of inflammation by

selenium and selenoproteins: impact on eicosanoid biosynthesis. *J Nutr Sci.* 2013;2:e28.

Mazokopakis EE, Liontiris MI. Commentary: Health Concerns of Brazil Nut Consumption. *J Altern Complement Med.* 2017.

McKelvey-Martin VJ, Green MH, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Meo MP, Collins A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat Res.* 1993;288(1):47-63.

McNeill JH, Delgatty HL, Battell ML. Insulinlike effects of sodium selenate in streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes.* 1991;40(12):1675-8.

Meier JJ, Nauck MA. Is the diminished incretin effect in type 2 diabetes just an epi-phenomenon of impaired beta-cell function? *Diabetes.* 2010;59(5):1117-25.

Meplan C. Selenium and chronic diseases: a nutritional genomics perspective. *Nutrients.* 2015;7(5):3621-51.

Merecz A, Markiewicz L, Sliwinska A, Kosmalski M, Kasznicki J, Drzewoski J, Majsterek I. Analysis of oxidative DNA damage and its repair in Polish patients with diabetes mellitus type 2: Role in pathogenesis of diabetic neuropathy. *Adv Med Sci.* 2015;60(2):220-30.

Mittelman SD, Van Citters GW, Kirkman EL, Bergman RN. Extreme insulin resistance of the central adipose depot in vivo. *Diabetes.* 2002;51(3):755-61.

Morris D, Khurasany M, Nguyen T, Kim J, Guilford F, Mehta R, Gray D, Saviola B, Venketaraman V. Glutathione and infection. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(5):3329-49.

Mueller AS, Mueller K, Wolf NM, Pallauf J. Selenium and diabetes: an enigma? *Free Radic Res.* 2009;43(11):1029-59.

Mukherjee B, Anbazhagan S, Roy A, Ghosh R, Chatterjee M. Novel implications of the potential role of selenium on antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic mice. *Biomed Pharmacother.* 1998;52(2):89-95.

Müllner E, Brath H, Pleifer S, Schiermayr C, Baierl A, Wallner M, Fastian T, Millner Y, Paller K, Henriksen T, Poulsen HE, Forster E, Wagner KH. Vegetables and PUFA-rich plant oil reduce DNA strand breaks in individuals with type 2 diabetes. *Mol Nutr Food Res*. 2013;57(2):328-38.

Narasimhan S, Gokulakrishnan K, Sampathkumar R, Farooq S, Ravikumar R, Mohan V, Balasubramanyam M. Oxidative stress is independently associated with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in subjects with and without type 2 diabetes. *Clin Biochem*. 2010;43(10-11):815-21.

Navarro-Alarcon M, Cabrera-Vique C. Selenium in food and the human body: a review. *Sci Total Environ*. 2008;400(1-3):115-41.

Nazare JA, Smith J, Borel AL, Aschner P, Barter P, Van Gaal L, Tan CE, Wittchen HU, Matsuzawa Y, Kadowaki T, Ross R, Brulle-Wohlhueter C, Alméras N, Haffner SM, Balkau B, Després JP. Usefulness of measuring both body mass index and waist circumference for the estimation of visceral adiposity and related cardiometabolic risk profile (from the INSPIRE ME IAA study). *Am J Cardiol*. 2015;115(3):307-15.

Nishikawa T, Sasahara T, Kiritoshi S, Sonoda K, Senokuchi T, Matsuo T, Kukidome D, Wake N, Matsumura T, Miyamura N, Sakakida M, Kishikawa H, Araki E. Evaluation of urinary 8-hydroxydeoxy-guanosine as a novel biomarker of macrovascular complications in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2003;26(5):1507-12.

Nolan CJ, Damm P, Prentki M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet*. 2011;378(9786):169-81.

Nolan CJ, Prentki M. The islet beta-cell: fuel responsive and vulnerable. *Trends Endocrinol Metab*. 2008;19(8):285-91.

Nowotny K, Jung T, Hohn A, Weber D, Grune T. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules*. 2015;5(1):194-222.

Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*. 2007;12(5):913-22.

Padurariu M, Ciobica A, Hritcu L, Stoica B, Bild W, Stefanescu C. Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2010;469(1):6-10.

Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007;87(1):315-424.

Pandey KB, Mishra N, Rizvi SI. Protein oxidation biomarkers in plasma of type 2 diabetic patients. *Clin Biochem*. 2010;43(4-5):508-11.

Pires LV. Efeito da suplementação com castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) na expressão gênica de citocinas inflamatórias e sua relação com o estresse oxidativo em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 [tese de doutorado]. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas/ Universidade de São Paulo; 2012.

Pires LV, Silva AMDO, Alencar LL, Pimentel JA, Mancini- Filho J, Cozzolino SM. Investigação da concentração de selênio e dos compostos fenólicos presentes na castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) e sua atividade antioxidante in vitro. *Nutrire*. 2011;36s:7s.

Pitozzi V, Giovannelli L, Bardini G, Rotella CM, Dolara P. Oxidative DNA damage in peripheral blood cells in type 2 diabetes mellitus: higher vulnerability of polymorphonuclear leukocytes. *Mutat Res*. 2003;529(1-2):129-33.

Planas M, Conde M, Audivert S, Perez-Portabella C, Burgos R, Chacon P, Rossello J, Boada M, Tarraga LL. Micronutrient supplementation in mild Alzheimer disease patients. *Clin Nutr*. 2004;23(2):265-72.

Polimeni L, Del Ben M, Baratta F, Perri L, Albanese F, Pastori D, Violi F, Angelico F. Oxidative stress: New insights on the association of non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis. *World J Hepatol*. 2015;7(10):1325-36.

Prabhu KS, Lei XG. Selenium. *Adv Nutr*. 2016;7(2):415-7.

Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 2006;116(7):1802-12.

- Qi L, Hu FB, Hu G. Genes, environment, and interactions in prevention of type 2 diabetes: a focus on physical activity and lifestyle changes. *Curr Mol Med*. 2008;8(6):519-32.
- Rayman MP. Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. *Br J Nutr*. 2008;100(2):254-68.
- Rayman MP. Selenium and human health. *Lancet*. 2012;379(9822):1256-68.
- Rayman MP, Blundell-Pound G, Pastor-Barriuso R, Guallar E, Steinbrenner H, Stranges S. A randomized trial of selenium supplementation and risk of type-2 diabetes, as assessed by plasma adiponectin. *PLoS One*. 2012;7(9):e45269.
- Rayman MP, Stranges S, Griffin BA, Pastor-Barriuso R, Guallar E. Effect of supplementation with high-selenium yeast on plasma lipids: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2011;154(10):656-65.
- Reich HJ, Hondal RJ. Why Nature Chose Selenium. *ACS Chem Biol*. 2016;11(4):821-41.
- Reszka E, Jablonska E, Gromadzinska J, Wasowicz W. Relevance of selenoprotein transcripts for selenium status in humans. *Genes Nutr*. 2012;7(2):127-37.
- Rita Cardoso B, Apolinario D, da Silva Bandeira V, Busse AL, Magaldi RM, Jacob-Filho W, Cozzolino SM. 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*. 2016;55(1):107-16.
- Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci*. 2009;84(21-22):705-12.
- Roman M, Jitaru P, Barbante C. Selenium biochemistry and its role for human health. *Metallomics*. 2014;6(1):25-54.
- Ros E. Nuts and novel biomarkers of cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 2009;89(5):1649s-56s.
- Ros E, Nunez I, Perez-Heras A, Serra M, Gilabert R, Casals E, Deulofeu

R. A walnut diet improves endothelial function in hypercholesterolemic subjects: a randomized crossover trial. *Circulation*. 2004;109(13):1609-14.

Salazar AM, Sordo M, Ostrosky-Wegman P. Relationship between micronuclei formation and p53 induction. *Mutat Res*. 2009;67(2):124-8.

Santilli F, D'ardes D, Davi G. Oxidative stress in chronic vascular disease: From prediction to prevention. *Vascul Pharmacol*. 2015;74:23-7.

Schindhelm RK, Diamant M, Dekker JM, Tushuizen ME, Teerlink T, Heine RJ. Alanine aminotransferase as a marker of non-alcoholic fatty liver disease in relation to type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Diabetes Metab Res Rev*. 2006;22(6):437-43.

Schinner S, Scherbaum WA, Bornstein SR, Barthel A. Molecular mechanisms of insulin resistance. *Diabet Med*. 2005;22(6):674-82.

Schnabel R, Lubos E, Messow CM, Sinning CR, Zeller T, Wild PS, Peetz D, Handy DE, Munzel T, Loscalzo J, Lackner KJ, Blankenberg S. Selenium supplementation improves antioxidant capacity in vitro and in vivo in patients with coronary artery disease The Selenium Therapy in Coronary Artery disease Patients (SETCAP) Study. *Am Heart J*. 2008;156(6):1201 e1-11.

Schwarz K, Foltz CM. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J Am Chem Soc*. 1957;79(12):3292-3.

Sekhar RV, McKay SV, Patel SG, Guthikonda AP, Reddy VT, Balasubramanyam A, Jahoor F. Glutathione synthesis is diminished in patients with uncontrolled diabetes and restored by dietary supplementation with cysteine and glycine. *Diabetes Care*. 2011;34(1):162-7.

Sen CK. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med Sci Sports Exerc*. 2001;33(3):368-70.

Sengupta A, Carlson BA, Hoffmann VJ, Gladyshev VN, Hatfield DL. Loss of housekeeping selenoprotein expression in mouse liver modulates lipoprotein metabolism. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;365(3):446-52.

Shaik NA, Shaik JP, Ali S, Imran A, Rao DK. Increased frequency of micronuclei in diabetes mellitus patients using pioglitazone and glimepiride in combination. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(12):3432-5.

Shen GX. Oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders: roles of mitochondria and NADPH oxidase. *Can J Physiol Pharmacol.* 2010;88(3):241-8.

Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006;116(7):1793-801.

Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015;4:180-3.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988;175(1):184-91.

Siqueira AFA, Abdalla DSP, Ferreira SRG. LDL: da síndrome metabólica à instabilização da placa aterosclerótica. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006;50(2):334-43.

Sliwinska A, Blasiak J, Kasznicki J, Drzewoski J. In vitro effect of gliclazide on DNA damage and repair in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM). *Chem Biol Interact.* 2008;173(3):159-65.

Slyskova J, Lorenzo Y, Karlsen A, Carlsen MH, Novosadova V, Blomhoff R, Vodicka P, Collins AR. Both genetic and dietary factors underlie individual differences in DNA damage levels and DNA repair capacity. *DNA Repair (Amst).* 2014;16:66-73.

Sociedade Brasileira de Diabetes (BR). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016). São Paulo: A.C. Farmacêutica, 2016.

Souza RG, Gomes AC, Naves MM, Mota JF. Nuts and legume seeds for cardiovascular risk reduction: scientific evidence and mechanisms of action. *Nutr Rev.* 2015;73(6):335-47.

Sokoloff L. Kashin-Beck disease: current status. *Nutr Rev.* 1988;46(3):113-9.

Stefani GP, Baldissera G, Nunes RB, Heck TG, Rhoden CR. Metabolic

Syndrome and DNA Damage: The Interplay of Environmental and Lifestyle Factors in the Development of Metabolic Dysfunction. *OJEMD*. 2015;5:65-76.

Steinbrenner H, Speckmann B, Pinto A, Sies H. High selenium intake and increased diabetes risk: experimental evidence for interplay between selenium and carbohydrate metabolism. *J Clin Biochem Nutr*. 2011;48(1):40-5.

Stockler-Pinto MB, Lobo J, Moraes C, Leal VO, Farage NE, Rocha AV, Boaventura GT, Cozzolino SM, Malm O, Mafra D. Effect of Brazil nut supplementation on plasma levels of selenium in hemodialysis patients: 12 months of follow-up. *J Ren Nutr*. 2012;22(4):434-9.

Stockler-Pinto MB, Mafra D, Farage NE, Boaventura GT, Cozzolino SM. Effect of Brazil nut supplementation on the blood levels of selenium and glutathione peroxidase in hemodialysis patients. *Nutrition*. 2010;26(11-12):1065-9.

Stockler-Pinto MB, Malm O, Azevedo SR, Farage NE, Dorneles PR, Cozzolino SM, Mafra D. Selenium plasma levels in hemodialysis patients: comparison between North and Southeast of Brazil. *J Bras Nefrol*. 2014;36(4):490-5.

Stockler-Pinto MB, Malm O, Moraes C, Farage NE, Silva WS, Cozzolino SM, Mafra D. A follow-up study of the chronic kidney disease patients treated with Brazil nut: focus on inflammation and oxidative stress. *Biological trace element research*. 2015;163(1-2):67-72.

Stranges S, Laclaustra M, Ji C, Cappuccio FP, Navas-Acien A, Ordovas JM, Rayman M, Guallar E. Higher selenium status is associated with adverse blood lipid profile in British adults. *J Nutr*. 2010;140(1):81-7.

Stranges S, Marshall JR, Natarajan R, Donahue RP, Trevisan M, Combs GF, Cappuccio FP, Ceriello A, Reid ME. Effects of long-term selenium supplementation on the incidence of type 2 diabetes: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2007;147(4):217-23.

Tabrizi R, Akbari M, Moosazadeh M, Lankarani KB, Heydari ST, Kolahdooz F, Mohammadi AA, Shabani A, Badehnoosh B, Jamilian M, Assarian A, Asemi Z. The Effects of Selenium Supplementation on Glucose Metabolism and Lipid Profiles Among Patients with Metabolic

Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Horm Metab Res.* 2017;49(11):826-30.

Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(2):85-96.

Tessari P, Cecchet D, Cosma A, Vettore M, Coracina A, Millioni R, Iori E, Puricelli L, Avogaro A, Vedovato M. Nitric oxide synthesis is reduced in subjects with type 2 diabetes and nephropathy. *Diabetes.* 2010;59(9):2152-9.

Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000;279(6):L1005-28.

Thiriet C, Hayes JJ. Chromatin in need of a fix: phosphorylation of H2AX connects chromatin to DNA repair. *Mol Cell.* 2005;18(6):617-22.

Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc.* 2009;4(6):825-37.

Thomson CD, Chisholm A, McLachlan SK, Campbell JM. Brazil nuts: an effective way to improve selenium status. *Am J Clin Nutr.* 2008;87(2):379-84.

Thomson CD. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. *Eur J Clin Nutr.* 2004;58(3):391-402.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000;35(3):206-21.

Tinggi U. Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environmental health and preventive medicine.* 2008;13(2):102-8.

Tiwari BK, Pandey KB, Abidi AB, Rizvi SI. Markers of Oxidative Stress during Diabetes Mellitus. *J Biomark.* 2013;2013:378790.

Tornovsky-Babeay S, Dadon D, Ziv O, Tzipilevich E, Kadosh T, Schyr-Ben Haroush R, Hija A, Stolovich-Rain M, Furth-Lavi J, Granot Z, Porat

S, Philipson LH, Herold KC, Bhatti TR, Stanley C, Ashcroft FM, In't Veld P, Saada A, Magnuson MA, Glaser B, Dor Y. Type 2 diabetes and congenital hyperinsulinism cause DNA double-strand breaks and p53 activity in beta cells. *Cell Metab.* 2014;19(1):109-21.

Tsai CJ, Hsieh CJ, Tung SC, Kuo MC, Shen FC. Acute blood glucose fluctuations can decrease blood glutathione and adiponectin levels in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2012;98(2):257-63.

Tubbs A, Nussenzweig A. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. *Cell.* 2017;168(4):644-56.

Tupe RS, Diwan AG, Mittal VD, Narayanam PS, Mahajan KB. Association of plasma proteins at multiple stages of glycation and antioxidant status with erythrocyte oxidative stress in patients with type 2 diabetes. *Br J Biomed Sci.* 2014;71(3):93-9; quiz 138.

Unger RH, Scherer PE. Gluttony, sloth and the metabolic syndrome: a roadmap to lipotoxicity. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(6):345-52.

Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* 2004;266(1-2):37-56.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006;160(1):1-40.

Van Der Torre HW, Van Dokkum W, Schaafsma G, Wedel M, Ockhuizen T. Effect of various levels of selenium in wheat and meat on blood Se status indices and on Se balance in Dutch men. *Br J Nutr.* 1991;65(1):69-80.

Vigneri P, Frasca F, Sciacca L, Pandini G, Vigneri R. Diabetes and cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2009;16(4):1103-23.

Vijayakumar A, Kim EK, Kim H, Choi YJ, Huh KB, Chang N. Effects of folic acid supplementation on serum homocysteine levels, lipid profiles, and vascular parameters in post-menopausal Korean women with type 2 diabetes mellitus. *Nutr Res Pract.* 2017;11(4):327-33.

Vonderheide AP, Wrobel K, Kannamkumarath SS, B'Hymer C, Montes-Bayon M, Ponce De Leon C, Caruso JA. Characterization of selenium species in Brazil nuts by HPLC-ICP-MS and ES-MS. *J Agric Food Chem.* 2002;50(20):5722-8.

Wang XL, Yang TB, Wei J, Lei GH, Zeng C. Association between serum selenium level and type 2 diabetes mellitus: a non-linear dose-response meta-analysis of observational studies. *Nutr J.* 2016;15(1):48.

Weir GC, Laybutt DR, Kaneto H, Bonner-Weir S, Sharma A. Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes.* 2001;50 Suppl 1:S154-9.

Whiting PH, Kalansooriya A, Holbrook I, Haddad F, Jennings PE. The relationship between chronic glycaemic control and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Br J Biomed Sci.* 2008;65(2):71-4.

World Health Organization. The World Health Organization Report 2002: reducing risks, promoting healthy life. Geneva: WHO, 2002.

World Health Organization, Food and Agricultural Organization of the United Nations. Vitamin and mineral requirements in human nutrition. 2nd ed. World Health Organization, 2004.

Wu B, Zhang S, Lin H, Mou S. Prevention of renal failure in Chinese patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a cost-effectiveness analysis. *J Diabetes Investig.* 2017.

Wu J, Lyons GH, Graham RD, Fenech MF. The effect of selenium, as selenomethionine, on genome stability and cytotoxicity in human lymphocytes measured using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Mutagenesis.* 2009;24(3):225-32.

Xavier DJ, Takahashi P, Evangelista AF, Foss-Freitas MC, Foss MC, Donadi EA, Passos GA, Sakamoto-Hojo ET. Assessment of DNA damage and mRNA/miRNA transcriptional expression profiles in hyperglycemic versus non-hyperglycemic patients with type 2 diabetes mellitus. *Mutat Res.* 2015;776:98-110.

Xavier DJ, Takahashi P, Manoel-Caetano FS, Foss-Freitas MC, Foss MC, Donadi EA, Passos GA, Sakamoto-Hojo ET. One-week intervention period led to improvements in glycemic control and reduction in DNA

damage levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014;105(3):356-63.

Xiang N, Zhao R, Song G, Zhong W. Selenite reactivates silenced genes by modifying DNA methylation and histones in prostate cancer cells. *Carcinogenesis.* 2008;29(11):2175-81.

Xun P, Liu K, Morris JS, Daviglus ML, He K. Longitudinal association between toenail selenium levels and measures of subclinical atherosclerosis: the CARDIA trace element study. *Atherosclerosis.* 2010;210(2):662-7.

Zeng H, Davis CD, Finley JW. Effect of selenium-enriched broccoli diet on differential gene expression in min mouse liver(1,2). *J Nutr Biochem.* 2003;14(4):227-31.

Zeng H. Selenite and selenomethionine promote HL-60 cell cycle progression. *J Nutr.* 2002;132(4):674-9.

Zhang R, Cheng K, Xu S, Li S, Zhou Y, Zhou S, Kong R, Li L, Li J, Feng J, Wu L, Liu T, Xia Y, Lu J, Guo C, Zhou Y. Metformin and Diammonium Glycyrrhizinate Enteric-Coated Capsule versus Metformin Alone versus Diammonium Glycyrrhizinate Enteric-Coated Capsule Alone in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Type 2 Diabetes Mellitus. *Gastroenterol Res Pract.* 2017;2017:8491742.

Zimmet P, Alberti KG, Magliano DJ, Bennett PH. Diabetes mellitus statistics on prevalence and mortality: facts and fallacies. *Nat Rev Endocrinol.* 2016;12(10):616-22.

Zuniga-Gonzalez GM, Batista-Gonzalez CM, Gomez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Zamora-Perez AL, Munoz-Magallanes T, Ramos-Valdes C, Gallegos-Arreola MP. Micronuclei in diabetes: folate supplementation diminishes micronuclei in diabetic patients but not in an animal model. *Mutat Res.* 2007;634(1-2):126-34.

ANEXO I
Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DO EXTREMO
SUL CATARINENSE - UNESC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeitos da ingestão de selênio através da castanha do Brasil sobre parâmetros genéticos, epigenéticos e bioquímicos em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2.

Pesquisador: Vanessa Moraes de Andrade

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 45245515.1.0000.0119

Instituição Proponente: Universidade do Extremo Sul Catarinense

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.086.099

Data da Relatoria: 28/05/2015

Apresentação do Projeto:

Este trabalho busca avaliar os efeitos da ingestão de selênio através da castanha do Brasil sobre a modulação da instabilidade genômica e metabólica através de parâmetros genéticos, epigenéticos e bioquímicos em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2. Serão avaliados 268 portadores de DMT2, que frequentam as Clínicas Integradas, e submetidos ao consumo de 1 unidade de castanha do Brasil por dia, durante 6 meses.

Serão realizadas duas coletas de sangue e de mucosa oral, sendo a primeira imediatamente antes do início do estudo e após 6 meses de tratamento, para as análises laboratoriais necessárias ao estudo.

Além disso, será aplicado aos participantes: i) questionário de frequência alimentar;

ii) questionário de hábitos de vida e; iii) escore de Framingham.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar os efeitos do consumo de selênio através da castanha do Brasil sobre a instabilidade genômica, o descontrolado metabólico e possíveis efeitos epigenéticos em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2.

Objetivo Secundário:

Endereço: Avenida Universitária, 1105

Bairro: Universitário

CEP: 88.806-000

UF: SC

Município: CRICIUMA

Telefone: (48)3431-2723

Fax: (48)3431-2750

E-mail: cetica@unesc.net

Continuação do Parecer: 1.086.099

Quantificar os níveis de selênio e selenoproteína P antes e depois da ingestão da castanha do Brasil em soro de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2; Avaliar os efeitos da ingestão de selênio através da castanha do Brasil sobre danos em DNA em sangue periférico e mucosa bucal de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2; Analisar os efeitos da ingestão de selênio através da castanha do Brasil sobre parâmetros de estresse oxidativo em soro de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2; Investigar os efeitos da ingestão de selênio através da castanha do Brasil sobre o metabolismo da glutatona em soro de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2; Avaliar a capacidade do consumo de selênio através da castanha do Brasil em auxiliar no controle dos perfis glicêmico, lipídico, hepático, tireoidiano e hematológico em soro de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2; Verificar os hábitos de vida, frequência alimentar e risco de doença coronariana em indivíduos com diabetes

mellitus tipo 2; Investigar a capacidade da ingestão de selênio através da castanha do Brasil em modular a instabilidade genômica em sangue de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2; Avaliar os possíveis efeitos da ingestão de selênio através da castanha do Brasil sobre a modulação de moléculas das vias de sinalização intracelular da insulina e inflamação em linfócitos de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2; Investigar os possíveis efeitos da ingestão de selênio através da castanha do Brasil sobre a modulação de parâmetros epigenéticos em sangue de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2; Avaliar os efeitos da ingestão da castanha do Brasil sobre o conteúdo de metais em sangue total de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Considere-se o desconforto previsto por ocasião da retirada de amostra de sangue venoso do braço direito ou esquerdo e amostra do epitélio bucal direito e esquerdo. Os pesquisadores comprometem-se a, Durante a aplicação do projeto de pesquisa, analisar frequentemente a possibilidade de danos imediatos ou posteriores, em cada voluntário ou na coletividade. Os riscos serão avaliados considerando a dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual do ser humano. Detectado qualquer risco ou dano ao voluntário, previsto, ou não neste documento o pesquisador comunicará imediatamente o CEP/CONEP, e avaliará em caráter emergencial a adequação ou suspensão do estudo. O pesquisador garante assistência integral e gratuita pelo tempo que for necessário em casos de danos decorrentes direta ou indiretamente da participação.

BENEFÍCIOS: Aprofundar o conhecimento da ação do selênio através do consumo de castanha do Brasil no controle do estado hiperglicêmico e consequente modulação da instabilidade genômica

| | |
|--|---------------------------------|
| Endereço: Avenida Universitária, 1105 | CEP: 88.806-000 |
| Bairro: Universitário | |
| UF: SC | Município: CRICIUMA |
| Telefone: (48)3431-2723 | Fax: (48)3431-2750 |
| | E-mail: cetica@unesc.net |

Continuação do Parecer: 1.086.099

avaliada nos pacientes diagnosticados com DMT2. Além disso, será disponibilizado aos participantes deste projeto o acesso aos resultados de todos os exames bioquímicos realizados durante a execução do projeto de pesquisa, e orientação nutricional, visando à melhora da qualidade de vida dos participantes, ao final desta.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Relevante por buscar ampliar o conhecimento sobre fatores de proteção e enfrentamento das alterações metabólicas decorrentes do diabetes tipo II, condição mórbida bastante prevalente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Presentes e adequados.

Recomendações:

Desnecessárias.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CRICIUMA, 29 de Maio de 2015

Assinado por:
RENAN ANTONIO CERETTA
(Coordenador)

Endereço: Avenida Universitária, 1105

Bairro: Universitário

CEP: 88.806-000

UF: SC **Município:** CRICIUMA

Telefone: (48)3431-2723

Fax: (48)3431-2750

E-mail: cetica@unesc.net

ANEXO II
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

1. Dados do projeto

1.1 Título: Efeitos da ingestão de selênio através da castanha do Brasil sobre parâmetros genéticos, epigenéticos e bioquímicos em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2.

1.2 Unidade executora: Universidade do Extremo Sul Catarinense.

1.3 Locais de coleta: A pesquisa será realizada nas Clínicas Integradas da UNESC, uma das estruturas da Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde (UNASAU).

1.4 Pesquisadores: Dra. Vanessa Moraes de Andrade
Tamires Pavei Macan

Endereço eletrônico: tamiresmacan@gmail.com

1.5 Telefone da pesquisadora responsável: (48) 3431 2758.

1.6 Justificativa: A diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) é uma doença metabólica cada vez mais prevalente que ocorre em grande parte, devido às mudanças ambientais e no estilo de vida. Os estados crônicos de hiperglicemia, hiperlipidemia e hiperinsulinemia podem levar ao estresse oxidativo, que também está envolvido na progressão da doença e contribui para o aparecimento das complicações associadas a DMT2 e à oxidação do ácido desoxirribonucleico (DNA). Portanto, a qualidade do controle glicêmico é fundamental para prevenir a oxidação do DNA e para isso, a dieta torna-se fundamental. A ingestão de micronutrientes a partir de fontes alimentares é preferível às práticas de suplementação alternativas quando o objetivo é melhorar o estado nutricional de uma população, pois os alimentos apresentam baixo custo, são sustentáveis e têm menor risco de toxicidade. Sabe-se que a castanha do Brasil apresenta diversos benefícios à saúde é considerada até o momento, a melhor fonte alimentar vegetal de selênio. Diversos estudos já demonstraram o papel do selênio na manutenção da estabilidade genômica, protegendo contra a formação de adutos de DNA, quebras cromossômicas ou de DNA e contra o ganho ou perda de cromossomos, além ter impacto sobre a capacidade de reparo do DNA. Dado o fato que o selênio apresenta efeitos benéficos para a homeostase glicêmica, o objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos da ingestão de selênio através da castanha do Brasil sobre a modulação da instabilidade genômica e metabólica através de parâmetros genéticos, epigenéticos e bioquímicos em indivíduos com DMT2.

1.7 Objetivos do projeto: Investigar os efeitos do consumo de selênio através da castanha do Brasil sobre a instabilidade genômica, o

descontrole metabólico e possíveis efeitos epigenéticos em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2.

2. Informações ao voluntário

2.1 Participação no projeto: o voluntário participará deste projeto através da doação de sangue e células esfoliadas da mucosa da bucal para a realização de todas as análises. Além disso, deverá responder a um questionário sobre hábitos de vida.

2.2 Duração da atividade: aproximadamente 30 minutos.

2.3 Riscos e desconfortos: durante a elaboração do projeto de pesquisa, não foram detectados riscos para o voluntário participante do projeto. O desconforto previsto resume-se à retirada de uma amostra de sangue venoso do braço direito ou esquerdo e amostra de células esfoliadas da mucosa bucal de ambos os lados, direito e esquerdo. Durante a aplicação do projeto de pesquisa será analisada frequentemente a possibilidade de danos imediatos ou posteriores, em cada voluntário ou na coletividade, bem como de riscos que não se justificam pelo benefício esperado. Os riscos serão avaliados considerando a dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual do ser humano. Detectado qualquer risco ou dano ao voluntário, previsto, ou não neste documento o pesquisador comunicará imediatamente o CEP/CONEP, e avaliará em caráter emergencial a adequação ou suspensão do estudo. O pesquisador garante assistência integral e gratuita pelo tempo que for necessário em casos de danos decorrentes direta ou indiretamente da participação do estudo.

2.4 Benefícios esperados: Existe uma forte ligação entre a DMT2 e a presença de danos ao DNA, uma vez que a persistência do estado hiperglicêmico, característico da DMT2, gera uma produção excessiva de radicais livres. Os estudos que buscam soluções para o controle da geração de radicais livres, consequente do estado hiperglicêmico em pacientes diabéticos são cada vez mais comuns, e o selênio é um dos focos desses estudos. Dessa forma, com esse trabalho pretende-se aprofundar o conhecimento da ação do selênio através do consumo de castanha do Brasil no controle do estado hiperglicêmico e consequente modulação da instabilidade genômica avaliada nos pacientes diagnosticados com DMT2. Além disso, será disponibilizado aos participantes deste projeto o acesso aos resultados de todos os exames bioquímicos realizados durante a execução do projeto de pesquisa, e orientação nutricional, visando à melhora da qualidade de vida dos participantes, ao final desta.

2.5 Critérios de confidencialidade, privacidade, anonimato e sigilo: todas as análises serão realizadas de forma confidencial, sem identificação do voluntário. Os resultados serão informados diretamente ao voluntário pela coordenação do projeto. As publicações provenientes do projeto não incluirão o nome do doador nem qualquer outra informação que possa identificá-lo. Os prontuários dos participantes serão acessados, visando obtenção de informações de contato pessoal, e de diagnóstico de DMT2, e será garantido o sigilo dos dados obtidos.

2.6 Destino do material biológico coletado: As amostras ficarão armazenadas sob a forma de biorrepositório no Laboratório de Genética Toxicológica da UNESC, sob responsabilidade da Dra. Vanessa Moraes de Andrade. As amostras serão coletadas e armazenadas para as análises propostas, apenas com autorização do participante. Depois de efetuadas as avaliações previstas neste projeto, as amostras serão descartadas, não podendo ser reutilizadas para outros fins.

2.7 Este documento será elaborado e assinado em duas vias, sendo uma retida com o pesquisador responsável e outra ficará com o participante.

2.8 O participante tem plena liberdade de recusar-se a participar dessa pesquisa ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem que sofra qualquer tipo de penalização.

Consentimento do voluntário

Eu,, após ler este documento e uma vez esclarecida minha participação no projeto de pesquisa aqui referido, concordo em:

- (a) Responder adequadamente o questionários em anexo (anexo III);
- (b) Doar uma amostra de sangue venoso e amostra de células esfoliadas da mucosa bucal, coletada por profissional habilitado, com material totalmente estéril e descartável, a qual será utilizada para realização de análises bioquímicas e moleculares.

Assinatura do voluntário:

Assinatura do coordenador do projeto:

Local e data: