



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E SAÚDE

MAYARA MONTE FEITOSA

**ESTADO NUTRICIONAL RELATIVO AO SELÊNIO E SUA RELAÇÃO COM  
MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM MULHERES OBESAS**

TERESINA

2016

MAYARA MONTE FEITOSA

**ESTADO NUTRICIONAL RELATIVO AO SELÊNIO E SUA RELAÇÃO COM  
MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM MULHERES OBESAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Saúde da Universidade Federal do Piauí como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências e Saúde.

**Área de concentração:** Métodos Diagnósticos e Análise das Condições de Saúde

**Linha de Pesquisa:** Nutrição e Saúde

**Orientadora:** Profa. Dra. Dilina do Nascimento Marreiro

TERESINA

2016

MAYARA MONTE FEITOSA

**ESTADO NUTRICIONAL RELATIVO AO SELÊNIO E SUA RELAÇÃO COM  
MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM MULHERES OBESAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Saúde da Universidade Federal do Piauí como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências e Saúde.

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banca examinadora:

---

Presidente: Profa. Dra. Dilina do Nascimento Marreiro

---

1º Examinador: Prof. Dr. Gilberto Simeone Henriques

---

2º Examinador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

---

Examinador Suplente: Prof<sup>a</sup>. Dra. Betânia de Jesus e Silva Almendra Freitas

*Dedico esta conquista aos meus pais,  
Pedro Mendes Feitosa e Irlamar  
Maria do Monte Feitosa, sem eles  
nada seria possível. Obrigada por  
tudo. Amo muito vocês!!!*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por estar sempre me iluminando e guiando meus passos com toda a sua bondade e misericórdia infinita. Obrigada por todas as bênçãos e graças alcançadas em minha vida!

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Saúde, pela oportunidade de crescimento acadêmico e ao corpo docente do Programa, pelos conhecimentos transmitidos.

À minha turma do Programa de Pós-graduação em Ciências e Saúde, por todos os momentos que passamos juntos e que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos funcionários do Departamento de Nutrição, pela atenção e disponibilidade em todos os momentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

Ao Hospital Getúlio Vargas, pelo apoio para a realização deste estudo.

A minha orientadora Profa. Dra. Dilina do Nascimento Marreiro, que me incentivou e me deu a oportunidade de iniciar na pesquisa científica ainda na graduação. Agradeço por todo o carinho, dedicação e acima de tudo paciência para transmitir seus conhecimentos e contribuir para o meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada por ser essa orientadora atenciosa e sempre disposta a ajudar. Serei sempre grata por todos esses anos de convivência e aprendizado. Obrigada por tudo!

À todas as mulheres que participaram da pesquisa. Obrigada pelo tempo dedicado a essa pesquisa, pela confiança e colaboração, o que tornou esse trabalho possível.

À Narlene Fontenelle, por todo o carinho e atenção nas coletas e por todo o auxílio durante a realização deste estudo.

À Profa. Dra. Regina Célia, por ter gentilmente cedido equipamentos e reagentes para a realização de análise para esta pesquisa.

Às minhas companheiras e amigas da turma 2014/2016 do Programa de Pós-graduação em Ciências e Saúde Deylane Teles, Mayara Storel e Susy Érika, pelo apoio, pelas risadas, pelas discussões científicas e por todos os momentos alegres e difíceis que juntas compartilhamos e que construíram a nossa relação e nossa amizade. Obrigada por tudo!

Às amigadas que conquistei ao longo desse mestrado, Thiago Maciel e Ana Sousa pelo apoio nessa caminhada. Obrigada!

A minha parceira de pesquisa e amiga Larissa Cristina. Obrigada pelo convívio maravilhoso, pelas palavras certas nos momentos em que mais precisei, pelas longas conversas sobre os mais diversos temas que sempre me ajudaram a ver tudo de outra forma, pela pessoa que você é e o que representa em minha vida. Agradeço a Deus por ter colocado você no meu caminho.

As minhas queridas colaboradoras Jennifer Beatriz, Juliana Severo, Taynáh Coelho, pela importante contribuição em todas as etapas deste trabalho. Obrigada por todo o carinho e apoio meninas!

À Profa. Dra. Carla Soraya Costa Maia e a Mestra Camila Oliveira pelo apoio e contribuição para a realização de análise bioquímica para esta pesquisa. Obrigada por todo o carinho e atenção.

Ao Laboratório Med Imagem representado pelo bioquímico Francisco Erasmo de Oliveira, pelas contribuições nas análises bioquímicas.

Ao Prof. Dr. José Machado Moita Neto, pelo auxílio nas análises e interpretação dos dados estatísticos.

À Profa. Dra. Kaluce Almondes, por estar sempre disponível para tirar nossas dúvidas com toda a atenção e carinho.

À nutricionista Veritas Ibiapina, por ter auxiliado no recrutamento das participantes da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Gilberto Simeone pela importante contribuição na realização da análise do selênio. Obrigada por todo o apoio e atenção!

À família LANEX, aqui representadas por Ana Raquel, Kyria Jayanne, Daila Bezerra, Priscyla Mendes, Nina Rosa pela carinho e apoio, e em especial a Stefany Rodrigues, Raísa Santos e Loanne Rocha pela ajuda no recrutamento das pacientes. Obrigada meninas!

A todos os meus amigos, pelo apoio e incentivo em todos os momentos. Obrigada por fazerem parte da minha vida!!!

Aos meus pais, Pedro Mendes e Irlamar Maria, pelos ensinamentos, pelo apoio e amor incondicional que tive em toda a minha vida. Meu pai, que sempre fez tudo para pagar a melhor educação para seus filhos, homem determinado e dedicado a família, e minha mãe pela mulher forte e guerreira, que sempre me levou para os caminhos de Deus e que com sua fé me motiva sempre a lutar. Admiro e amo muito vocês!!!

Aos meus irmãos, Mayron e Júnior pelo apoio nesta fase da minha vida. Amo muito vocês!!!

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada.

## RESUMO

FEITOSA, M. M. **Estado Nutricional Relativo ao Selênio e sua Relação com Marcadores do Estresse Oxidativo em Mulheres Obesas**. 2016. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências e Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI.

**INTRODUÇÃO:** Estudos têm mostrado concentrações séricas reduzidas de selênio em obesos, o que parece comprometer a defesa antioxidante nesses indivíduos e, conseqüentemente, acentuar a produção de espécies reativas de oxigênio.

**OBJETIVO:** O estudo avaliou a relação entre o estado nutricional relativo ao selênio e marcadores do estresse oxidativo em mulheres obesas. **MÉTODOS:** Estudo transversal, envolvendo 89 mulheres, com idade entre 18 e 50 anos, sendo distribuídas em dois grupos: grupo caso (obesas, n=44) e grupo controle (mulheres eutróficas, n=45). Foram realizadas medidas do índice de massa corporal e da circunferência da cintura, bem como analisadas a ingestão de selênio, concentrações plasmáticas, eritrocitárias e urinárias desse mineral, além das concentrações plasmáticas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e da atividade da enzima glutathione peroxidase. A análise da ingestão de selênio foi realizada por meio do registro alimentar de três dias, utilizando o programa *Nutwin* versão 1.5. As concentrações do selênio plasmático, eritrocitário e urinário foram determinadas segundo o método de espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente. O estresse oxidativo foi analisado pelo método das concentrações plasmáticas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. A determinação da atividade da enzima glutathione peroxidase eritrocitária foi realizada em analisador bioquímico automático, utilizando kit *Ransel* 505. Os dados foram analisados no programa estatístico SPSS for Windows 22.0. **RESULTADOS:** Os valores médios da quantidade de selênio nas dietas estavam acima do valor de EAR, sem diferença estatística entre os grupos estudados ( $p>0,05$ ). As concentrações médias de selênio plasmático das mulheres obesas estavam reduzidas em relação ao grupo controle ( $p<0,05$ ). Os valores médios do selênio eritrocitário nas mulheres obesas estavam reduzidos em relação ao grupo controle ( $p<0,05$ ) e adequados segundo os valores de referência. A excreção urinária deste mineral não apresentou diferença significativa em ambos os grupos ( $p>0,05$ ). No entanto, o *clearance* de selênio apresentou diferença significativa, com valores elevados nas mulheres obesas ( $p<0,05$ ). A concentração média das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico estava elevada nas mulheres obesas em relação ao grupo controle ( $p<0,05$ ). Os valores médios da atividade da enzima glutathione peroxidase estava elevada nas mulheres obesas em relação ao grupo controle ( $p<0,05$ ). O estudo também mostrou correlação positiva significativa entre o selênio eritrocitário e a atividade da glutathione peroxidase. Entretanto, a análise de correlação entre os biomarcadores do estado nutricional relativo ao selênio e as concentrações plasmáticas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico ( $p>0,05$ ) não revelou resultado significativo. **CONCLUSÃO:** A partir dos resultados deste estudo pode-se concluir que a ingestão acima do valor da EAR de selênio parece contribuir para manter as concentrações eritrocitárias do mineral. Associado a isso, os dados dessa pesquisa mostram a importância do selênio como nutriente antioxidante, por influenciar a atividade da enzima glutathione peroxidase nos eritrócitos.

**Palavras-chave:** Obesidade. Selênio. Estresse oxidativo.



## ABSTRACT

FEITOSA, M. M. **Selenium Status and its Relation to Markers Stress Oxidative in Obese Women.** 2016. Thesis (Master) - Master's Graduate Program in Science and Health, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí.

**INTRODUCTION:** Studies have shown reduced serum concentrations of selenium in obese, which seems to impair the antioxidant defense in these individuals and, consequently, enhance the production of reactive oxygen species. **OBJECTIVE:** The study evaluated the relationship between selenium status and markers of oxidative stress in obese women. **METHODS:** A cross-sectional study involving 89 women, aged 18 and 50, being divided into two groups: case group (obese,  $n = 44$ ) and control group (normal weight women  $n = 45$ ). Body mass index and waist circumference, as well as analyzed selenium intake, plasma concentrations, erythrocyte and urinary this mineral were performed, besides to the plasma concentrations of substances reactive to thiobarbituric acid and glutathione peroxidase enzyme activity. The analysis of selenium intake was carried out using a three-day food record and analyzed on Nutwin software version 1.5. The selenium concentrations in plasma, erythrocytes and urine were determined by the method of optical emission spectrometry with inductively coupled plasma. Oxidative stress was analyzed by the method of plasma concentrations of substances reactive to thiobarbituric acid. The determination of erythrocyte glutathione peroxidase enzyme activity was carried out in automatic biochemical analyzer, using Ransel kit 505. The data were analyzed with SPSS for Windows 22.0. **RESULTS:** The mean values of the selenium content in the diets were above the EAR value, with no statistical difference between the groups ( $p > 0.05$ ). The mean concentrations of plasma selenium obese women were reduced compared to the control group ( $p < 0.05$ ). The mean values of erythrocyte selenium in obese women were reduced compared to the control group ( $p < 0.05$ ) and adequate according to the reference values. Urinary excretion of this mineral no significant difference in both groups ( $p > 0.05$ ). However, the clearance of selenium significant difference, with high levels in obese women ( $p < 0.05$ ). The mean concentration of substances reactive to thiobarbituric acid was elevated in obese women in the control group ( $p < 0.05$ ). The mean values of the glutathione peroxidase enzyme activity was elevated in obese women in the control group ( $p < 0.05$ ). The study also shows a significant positive correlation between the erythrocyte selenium and glutathione peroxidase activity. However, the analysis of correlation between selenium status biomarkers and plasma concentrations of substances reactive to thiobarbituric acid ( $p > 0.05$ ) did not show significant results. **CONCLUSION:** From the results of this study it can be concluded that intake above the EAR value of selenium seems to contribute to maintain erythrocyte concentration of the mineral. Associated with this, the data from this study show the importance of selenium as an antioxidant nutrient, by influencing the enzyme glutathione peroxidase activity in erythrocytes.

**Keywords:** Obesity. Selenium. Oxidative stress.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Reação redox catalisada pela glutathiona peroxidase.	19
<b>Figura 2</b> - Mecanismos da inserção de selenocisteína na síntese das selenoproteínas.	20
<b>Figura 3</b> - Fatores associados ao estresse oxidativo na obesidade.	25
<b>Figura 4</b> - Fluxograma do recrutamento e seleção das participantes do estudo.	31
<b>Figura 5</b> - Fluxograma das etapas realizadas pelas participantes do estudo.	32
<b>Quadro 1</b> - Classificação do estado nutricional, segundo o índice de massa corporal, em adultos.	33
<b>Figura 6</b> - Distribuição percentual das mulheres obesas e grupo controle segundo os valores de referência de ingestão de selênio. Teresina-PI, Brasil, 2016.	46
<b>Figura 7</b> - Atividade da enzima glutathiona peroxidase eritrocitária nas mulheres obesas e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2016.	47
<b>Figura 8</b> - Concentração plasmática das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico nas mulheres obesas e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2016.	48

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Valores médios e desvios padrão da idade, peso corporal, estatura, índice de massa corporal e circunferência da cintura das mulheres obesas e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2016. 44
- Tabela 2** - Valores médios e desvios padrão da ingestão de energia e macronutrientes das mulheres obesas e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2016. 45
- Tabela 3** - Valores de mediana, mínimo e máximo da ingestão de selênio das mulheres obesas e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2016. 45
- Tabela 4** - Valores médios e desvios padrão das concentrações plasmáticas, eritrocitárias e urinárias de selênio das mulheres obesas e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2016. 47
- Tabela 5** - Análise de correlação linear simples entre os biomarcadores do estado nutricional relativo ao selênio e atividade da enzima glutathione peroxidase eritrocitária nas mulheres obesas e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2016. 49
- Tabela 6** - Análise de correlação linear simples entre os biomarcadores do estado nutricional relativo ao selênio com marcador da peroxidação lipídica nas mulheres obesas e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2016. 49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AGE** – Produtos de glicação avançada
- AMDR** -intervalo aceitável de distribuição de macronutrientes
- ANOVA** - Análise de variância
- CAAE** - Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
- CAPES** - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CC** - Circunferência da cintura
- CuZn-SOD** -Superóxido dismutase com cobre e zinco
- DP** - Desvio padrão
- DRI's** –*Dietary Reference Intakes*
- EAR** - Necessidade média estimada
- EDTA** -Ácido etileno diaminotetracético
- EFSec**- fator de alongação de tradução para inserção de selenocisteína
- EIF4a3** - fator de iniciação da tradução
- EROS** -Espécies reativas de oxigênio
- FADH<sub>2</sub>** . Dinucleótido de flavina e adenina reduzida
- GPX** -Glutathione peroxidase
- GSH** -Glutathione reduzida
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** -Peróxido de hidrogênio
- Hb** -Hemoglobina
- HDL**-Lipoproteína de alta densidade
- HNO<sub>3</sub>** -Ácido nítrico
- IBGE** - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- ICP-OES** -Espectrômetro de emissão óptica com plasma acopladoindutivamente
- IL-6** - Interleucina-6
- IL-1** -Interleucina 1
- IMC** - Índice de massa corporal
- L30** - proteína de ligação ao SECIS
- LDL** - lipoproteína de baixa densidade
- MAPK** -Proteínas quinases ativadas por mitógenos
- MDA** - Malondialdeído
- NaBH<sub>4</sub>** -Borohidreto de sódio
- NADH** - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

**NADPH oxidase** -Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

**NF-kB** -Fator nuclear kappa B

**ONOO<sup>-</sup>** - Peroxinitrito

**PI3K** -Fosfatidilinositol 3-quinase

**PKC** -Proteína C quinase

**PON-1** -Paraoxonase 1

**RDA** -Ingestão dietética recomendada

**RNA<sup>m</sup>** - Ácido ribonucleico mensageiro

**RNA<sup>t</sup>** -Ácido ribonucleico transportador

**SBP2** -Proteína de ligação ao SECIS 2

**SDS** -Dodecil sulfato de sódio

**SECIS** -Sequência de inserção de selenocisteína

**SeO<sub>3</sub><sup>2-</sup>** -Selenito

**SeO<sub>4</sub><sup>2-</sup>** - Selenato

**SeIP** - Selenoproteína P

**SOD** -Superóxido dismutase

**SPSS** - *Statistical Package for the Social Sciences*

**TACO** - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos

**TBA** -Ácido tiobarbitúrico

**TBARS** - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

**TCLE** - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**TEP** -Tetraetoxipropano

**TNF $\alpha$**  -Fator de necrose tumoralalfa

**TR** - Tioredoxina redutase

**Trx** -Tioredoxina

**UFPI** - Universidade Federal do Piauí

**UGA** - Códon de parada

**UL** -Ingestão superior tolerável

**WHO** - *World Health Organization*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	15
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b>	17
2.1 Aspectos metabólicos e fisiológicos do selênio	17
2.2 Obesidade e estresse oxidativo	22
2.3 Selênio, obesidade e estresse oxidativo	25
<b>3 OBJETIVOS</b>	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivos específicos	29
<b>4 CASUÍSTICA E MÉTODOS</b>	30
<b>4.1 Caracterização do estudo e protocolo experimental</b>	30
<b>4.2 Avaliação antropométrica</b>	32
4.2.1 Peso corporal (kg) e estatura (cm)	32
4.2.2 Índice de massa corporal (IMC)	33
4.2.3 Circunferência da cintura (cm)	33
<b>4.3 Avaliação do consumo alimentar</b>	34
4.3.1 Análise dos dados dietéticos	35
<b>4.4 Coleta do material biológico</b>	37
<b>4.5 Determinação dos parâmetros bioquímicos</b>	38
4.5.1 Controle de contaminação e preparo dos reagentes	38
4.5.2 Separação dos componentes do sangue	38
4.5.3 Determinação de selênio plasmático, eritrocitário e urinário	39
4.5.4 Determinação do <i>clearance</i> de selênio	40
4.5.5 Determinação da hemoglobina	40
4.5.6 Determinação da creatinina urinária de 24 horas	41
4.5.7 Determinação da atividade da glutathione peroxidase eritrocitária	41
4.5.8 Determinação das concentrações plasmáticas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	42
<b>4.6 Análise Estatística</b>	42
<b>5 RESULTADOS</b>	44
5.1 Parâmetros antropométricos das participantes	44
5.2 Consumo Alimentar	44

5.3 Parâmetros bioquímicos de avaliação do selênio	46
5.4 Atividade da enzima glutathiona peroxidase	47
5.5 Concentrações plasmáticas do marcador da peroxidação lipídica	48
5.6 Estudo de correlação entre biomarcadores do estado nutricional relativo ao selênio e marcadores do estresse oxidativo	48
<b>6 DISCUSSÃO</b>	50
<b>7 CONCLUSÃO</b>	54
<b>REFERÊNCIAS</b>	55
<b>APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b>	65
<b>APÊNDICE B - FICHA DE CADASTRO DAS PARTICIPANTES DA PESQUISA</b>	68
<b>APÊNDICE C - REGISTRO ALIMENTAR</b>	70
<b>APÊNDICE D - INSTRUÇÕES ÀS PARTICIPANTES QUANTO À OBTENÇÃO DE URINA DE 24 HORAS</b>	72
<b>ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA/UFPI</b>	73
<b>ANEXO B - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA / HOSPITAL GETÚLIO VARGAS</b>	76

## 1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal e possui etiologia complexa, envolvendo fatores ambientais, metabólicos e moleculares. Essa doença é considerada um dos principais fatores de risco para diversas comorbidades como o diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares, principalmente doenças cardíacas e acidente vascular cerebral e alguns tipos de câncer (CODOÑER-FRANCH et al., 2011; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011; SAVINI et al., 2013).

A disfunção do tecido adiposo, na obesidade, contribui para a manifestação de complicações metabólicas, a exemplo da inflamação crônica de baixo grau, disfunção endotelial, alterações no metabolismo da glicose e dos lipídeos, as quais possuem implicações relevantes na produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, contribuindo para o estresse oxidativo na obesidade (NORRIS et al., 2011; NIKI, 2014; VASCONCELOS et al., 2007; WAROLIN et al., 2014).

Nesse sentido, os distúrbios bioquímicos e nutricionais presentes em indivíduos obesos têm sido investigados com a finalidade de esclarecer os mecanismos envolvidos na patogênese dessa doença. Assim, os minerais têm sido alvo de diversas pesquisas na perspectiva de identificar a participação desses nutrientes no estresse oxidativo. O selênio, em particular, é importante por exercer função essencial no controle da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (LABUNSKYY; HATFIELD; GLADYSHEV, 2014; WEEKS; HANNA, COOPERSTEIN, 2012).

Não obstante, é fundamental destacar que a ação antioxidante do selênio é realizada por meio de selenoproteínas, proteínas nas quais o mineral compõe o sítio catalítico. Dentre as selenoproteínas com função antioxidante, destaca-se a glutathione peroxidase (GPx), a tioredoxina redutase (TR) e a selenoproteína P (SelP), que atuam reduzindo peróxidos de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), hidroperóxidos orgânicos livres, hidroperóxidos fosfolipídicos e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), inibindo a oxidação de proteínas e lipídios e ainda participando na regulação da sinalização redox (BRENNEISEN; STEINBRENNER; SIES, 2005; COMINETTI et al., 2011).

Um aspecto relevante diz respeito ao fato de que as selenoproteínas GPx1, GPx3, GPx4 e SelP são hiperexpressas no tecido adiposo branco e participam no equilíbrio redox intracelular durante a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos



maduros, demonstrando a importância da ação dessas selenoproteínas no controle do estresse oxidativo na obesidade (STEINBRENNER; SPECKMANN; KLOTZ, 2016).

Nessa perspectiva, estudos recentes têm demonstrado alterações na homeostase de selênio e comprometimento na atividade das selenoproteínas em indivíduos obesos, o que parece limitar a defesa antioxidante nesse grupo populacional, embora os dados existentes ainda não permitam a elucidação total dos mecanismos nos quais o mineral encontra-se envolvido (ALASFAR et al., 2011; AZAB et al., 2014; DAMMS-MACHADO; WESER; BISCHOFF, 2012).

Portanto, considerando as repercussões metabólicas na obesidade, a exemplo do estresse oxidativo, bem como a importância da atuação do selênio nesse processo, a determinação do estado nutricional relativo ao mineral e sua possível relação com marcadores do estresse oxidativo foram realizadas visando contribuir para um melhor entendimento acerca do papel desse nutriente em mecanismos envolvidos nos distúrbios metabólicos associados à obesidade.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos metabólicos e fisiológicos do selênio

O selênio é um mineral traço isolado pela primeira vez em 1817 pelo químico sueco Jacob Berzelius Jöns, sendo conhecido pela sua toxicidade. A importância desse mineral foi evidenciada em 1957, quando foi demonstrada a sua relevância na saúde animal, e somente em 1979, foi descoberta a essencialidade para humanos, por ser componente estrutural de várias selenoproteínas antioxidantes em mamíferos (FAIRWEATHER-TAIT et al., 2011; MEHDI et al., 2013; THIRY et al., 2013).

Na natureza, o selênio está presente nas formas orgânicas e/ou inorgânicas. Nos alimentos de origem vegetal e animal é encontrado principalmente na forma orgânica, como selenometionina, selenocisteína e Se-metilselenocisteína. Em vegetais, como alho, cebola, caules e flores de brócolis, o principal composto de selênio encontrado é o Se-metilselenocisteína. Na forma inorgânica, como selenito ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) e selenato ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ), é utilizado principalmente em suplementos, pois estas formas existem em alimentos em quantidades reduzidas. As diferentes formas de selênio são responsáveis por sua biodisponibilidade e distribuição tecidual (COMINETTI et al., 2011; RAYMAN; INFANTE; SARGENT, 2008)

Vale destacar que, a absorção do selênio no trato gastrointestinal ocorre principalmente no duodeno, ceco e cólon, e os mecanismos dependem da sua forma química. A selenometionina e a selenocisteína parecem compartilhar um sistema de transporte ativo (Bo), comum aos aminoácidos, o selenato por meio de carreadores mediados por sódio, enquanto que o selenito é absorvido por difusão simples (FAIRWEATHER-TAIT et al., 2011; NAVARRO-ALARCON; CABRERA-VIQUE, 2008).

As formas químicas de selênio absorvidas no trato gastrointestinal são transportadas para o fígado, onde a maior parte dos compostos do mineral são metabolizados, sendo convertidos em seleneto, composto importante na regulação do metabolismo de selênio. O selênio é transportado no sangue predominantemente pela SeIP, GPx3 e ligado a albumina. Além do fígado, as formas químicas do mineral são armazenadas nos músculos, esqueleto, eritrócitos, pâncreas, rins, estômago, cérebro, pele, mucosa gastrointestinal e plasma, no qual é encontrado principalmente na forma de SeIP (60 a 70%), responsável pela distribuição de selênio para outros órgãos

(MEHDI et al., 2013; ROMAN; JITARUB; BARBANTE, 2014; WEEKS; HANNA, COOPERSTEIN, 2012).

A excreção do mineral ocorre principalmente pela via urinária, sendo que, os compostos de selênio, tanto aqueles que entram no *pool* de seleneto, quanto os convertidos a metilselenol, são metilados por metiltransferases e geram diferentes formas metabólicas de selênio. Destaca-se as formas monometiladas, quando o mineral é consumido em quantidades reduzidas, e as formas dimetilseleneto e trimetilselênio, quando consumido em quantidades elevadas, que são excretadas para manter sua homeostase (FAIRWEATHER-TAIT et al., 2011; MEHDI et al., 2013; NAVARRO-ALARCON; CABRERA-VIQUE, 2008).

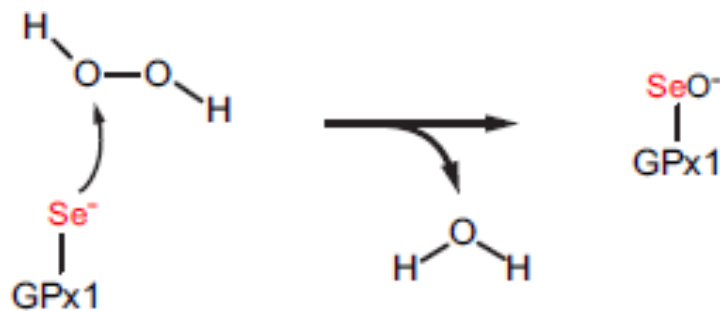
O selênio é parte integrante de determinadas proteínas, as selenoproteínas, nas quais o mineral compõe o sítio catalítico com a incorporação da selenocisteína ao seu centro ativo, sendo sua ligação essencial ao funcionamento enzimático e por meio delas que exerce suas funções. A incorporação da selenocisteína no sítio ativo das selenoproteínas é essencial para a sua função adequada, visto que a substituição da selenocisteína por cisteína promove redução da atividade das selenoproteínas. Associado a isso, a selenocisteína é menos sensível a superoxidação e inativação na presença de peróxidos em comparação com a cisteína (LUBOS; LOSCALZO, HANDY, 2011).

Nesse sentido, das 25 selenoproteínas já identificadas, apenas algumas foram caracterizadas funcionalmente. De modo geral, estão envolvidas em atividades catalíticas e antioxidantes, no metabolismo dos hormônios tireoidianos, na resposta imune e são fundamentais para fertilidade, por serem proteínas estruturais do esperma. Dentre as selenoproteínas com função antioxidante, destaca-se a GPx, a TR e a SeIP (DUNTAS; BENVENGA, 2015; LABUNSKYY; HATFIELD; GLADYSHEV, 2014; RAYMAN, 2012; WEEKS; HANNA, COOPERSTEIN, 2012).

Nesse contexto, há cinco GPxs que contêm resíduo de selenocisteína em seu sítio ativo, e que possuem diferentes especificidades a substratos e são expressas em tecidos específicos que são: GPx1, GPx2, GPx3, GPx4 e GPx6. Dessa forma, a GPx1 é uma enzima citosólica, a GPx2 é específica do trato gastrointestinal e tem papel importante na proteção do cólon, a GPx3 é uma proteína glicosilada secretada para compartimentos extracelulares, a GPx4 atua em lipídios oxidados e a GPx6 só é encontrado no epitélio olfativo e durante desenvolvimento embrionário. A função antioxidante dessas enzimas ocorre pela redução de peróxidos de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),

hidroperóxidos orgânicos livres e hidroperóxidos fosfolipídicos (somente a GPx4), necessitando da glutathiona reduzida (GSH) como co-substrato (ALMONDES et al., 2010; BELLINGER et al., 2009; BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013; COMINETTI et al., 2011; KUROKAWA; BERRY, 2013).

**Figura 1-** Reação redox catalisada pela glutathiona peroxidase.



Início da reação redox catalisada pela enzima glutathiona peroxidase 1 (GPx1). Fonte: Labunskyy; Hatfield; Gladyshev, 2014.

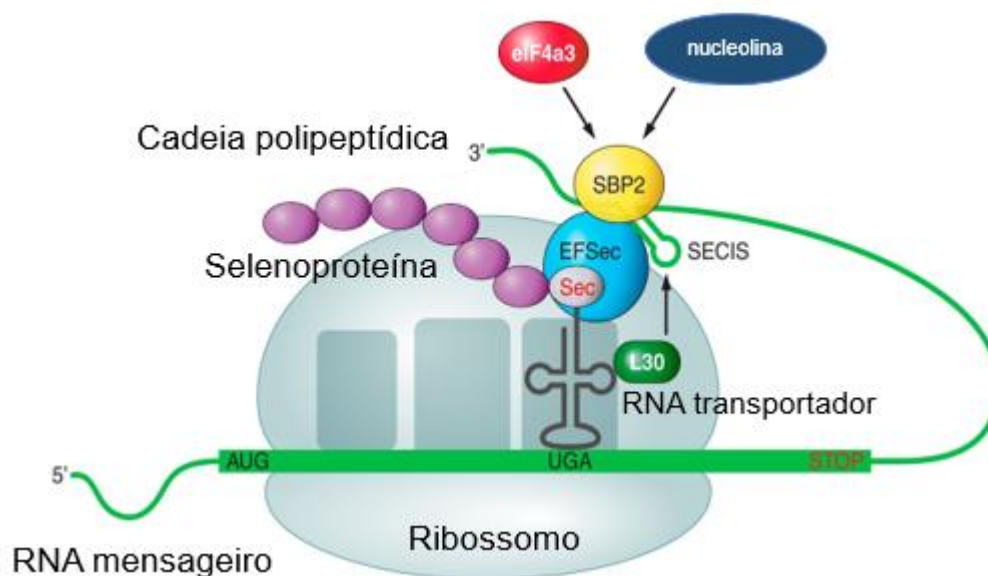
Nessa abordagem, além da GPx a TR também é capaz de degradar hidroperóxidos e juntamente com tioredoxina (Trx) e NADPH constitui o sistema tioredoxina, um importante sistema redox. As TRs (TR1, TR2 e TR3) agem controlando a função da tioredoxina, que é a molécula central do sistema redox, e reduzindo diversos substratos, desempenhando um importante papel na resposta biológica ao estresse oxidativo (ALMONDES et al., 2010; COMINETTI et al., 2011; PAPP et al., 2007).

Outra selenoproteína que atua como um antioxidante é a SelP, que além do transporte de selênio, apresenta função no espaço extracelular e pode reduzir peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) e hidroperóxidos de fosfolipídios e inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (COMINETTI et al., 2011; PAPP et al., 2007; ROMAN; JITARUB; BARBANTE, 2014).

É importante destacar alguns aspectos envolvidos na participação do selênio na síntese dessas selenoproteínas. A incorporação desse mineral na biossíntese das selenoproteínas ocorre por códons UGA presentes em ácidos ribonucleicos mensageiros (RNAm) e um complexo mecanismo de proteínas específicas, durante o processo de tradução. Essa incorporação inicia-se por meio da conversão do seleneto

em selenofosfato em reação catalisada pela enzima selenofosfato sintetase. O selenofosfato reage com resíduos de serina ligados ao RNAt para formar RNAt de selenocisteína, denominado fator de elongação Sec (EFSec). Este fator de elongação juntamente com a proteína ligadora SBP2 formam um complexo denominado elemento SECIS (sequência de inserção da selenocisteína), o qual é localizado na região 3' não traduzida do RNAm, permitindo a incorporação do aminoácido selenocisteína na síntese das selenoproteínas por meio da co-tradução do códon de parada UGA pelos ribossomos (BULTEAU; CHAVATTE, 2015; KUROKAWA; BERRY, 2013; LABUNSKYY; HATFIELD; GLADYSHEV, 2014; WEEKS; HANNA, COOPERSTEIN, 2012).

**Figura 2-** Mecanismos da inserção de selenocisteína na síntese das selenoproteínas.



SBP2= Proteína de ligação ao SECIS 2; SECIS =Sequência de inserção de selenocisteína; EFSec= fator de elongação de tradução para inserção de selenocisteína; L30=proteína de ligação ao SECIS; EIF4a3= fator de iniciação da tradução; Nucleolína = proteína de ligação SECIS. Fonte: Adaptado de Labunskyy; Hatfield; Gladyshev, 2014.

Outro ponto relevante, diz respeito aos fatores contribuintes para a quantidade de selênio nos alimentos. O conteúdo desse mineral nas plantas depende principalmente das formas químicas existentes no solo, do tipo de rochas, do pH e do potencial redox do solo, enquanto que a quantidade nos alimentos de origem animal reflete as concentrações de selênio por eles consumidas (FAIRWEATHER-TAIT et al., 2011; MEHDI et al., 2013; ROMAN; JITARUB; BARBANTE, 2014).

Assim, a quantidade desse nutriente nos alimentos apresenta variações, sendo que, no Brasil, é elevada em produtos de origem animal, sobretudo em pescados. Alimentos como a castanha-do-brasil, carne bovina, frango, peixe, ovos e pescados são fontes de selênio e as frutas e vegetais geralmente apresentam baixas concentrações do mineral (FAIRWEATHER-TAIT et al., 2011; FERREIRA et al., 2002; MEHDI et al., 2013; ROMAN; JITARUB; BARBANTE, 2014).

A biodisponibilidade do selênio pode ser influenciada por fatores facilitadores da absorção, como metionina e proteínas, vitaminas E e A, e também por inibidores, como os metais chumbo, cádmio e mercúrio. Dessa forma, tanto a biodisponibilidade quanto a distribuição tecidual desse mineral, dependem da forma ingerida (COMINETTI et al., 2011).

A recomendação de ingestão de selênio para adultos baseou-se no valor necessário para a maximização da atividade de selenoproteínas como a GPx3. De acordo com a *Dietary Reference Intakes* (DRI's) a necessidade média estimada (EAR) para indivíduos com idade a partir de 19 anos para os sexos masculino e feminino é de 45 µg/dia. Enquanto que a ingestão dietética recomendada (RDA) para indivíduos de ambos os sexos e mesma faixa etária é de 55 µg/dia. O limite de ingestão superior tolerável (UL) de 400 µg/dia foi estabelecido segundo o aparecimento de sintomas de selenose, doença caracterizada pelo consumo excessivo de selênio (INSTITUTE OF MEDICINE, 2000; ROMAN; JITARUB; BARBANTE, 2014).

Nesta perspectiva, a deficiência grave de selênio, descrita na China, manifesta-se por duas enfermidades: a doença de Keshan, uma cardiomiopatia, e a doença de Kashin-Beck, uma osteoartrite endêmica. Por outro lado, embora menos comum do que a deficiência, a sua toxicidade pode afetar grupos populacionais expostos a concentrações elevadas desse micronutriente na dieta, e podem apresentar cabelos quebradiços e frágeis, odor de alho na respiração e na pele e vômitos (COMBS, 2015; FAIRWEATHER-TAIT et al., 2011).

Com relação a avaliação do estado nutricional relativo ao selênio, a mensuração de suas concentrações nas unhas e cabelos são considerados biomarcadores de longo prazo, e os níveis plasmáticos, eritrocitários e urinários, de curto a médio prazo. Atualmente as selenoproteínas também são utilizadas para avaliar o estado nutricional relativo ao selênio, visto que quando há deficiência do mineral as enzimas dependentes dele reduzem suas atividades. Nesse sentido, considerando a hierarquia da síntese dessas enzimas a GPx3 e SelP são utilizadas

como biomarcadores do estado nutricional relativo ao selênio (COMBS, 2015; HURST et al., 2013; MEHDI et al., 2013; NAVARRO-ALARCON; CABRERA-VIQUE, 2008; RESZKA et al., 2012; ROMAN; JITARUB; BARBANTE, 2014).

## **2.2 Obesidade e estresse oxidativo**

O tecido adiposo, além de contribuir para a homeostase energética e regulação térmica, tem sido reconhecido como um órgão endócrino devido à sua capacidade de secretar adipocinas, substâncias biologicamente ativas. Na obesidade, a disfunção desse tecido está relacionada a diversas complicações metabólicas, a exemplo do estresse oxidativo, cujos principais fatores contribuintes parecem ser: hiperglicemia, hiperlipidemia, hiperleptinemia, inflamação crônica de baixo grau, aumento do sistema renina-angiotensina-aldosterona e o comprometimento da defesa antioxidante (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011; LAY et al., 2014; SAVINI et al., 2013).

Sobre a influência da hiperglicemia no estresse oxidativo, esse estado metabólico favorece aumento da via glicolítica e do ciclo do ácido tricarboxílico, que conduz ao excesso da produção de NADH e FADH<sub>2</sub>, o que aumenta o gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna, contribuindo para produção excessiva do radical ânion superóxido. Nesse sentido, destaca-se que os radicais livres inibem o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e com isso redirecionam os metabólitos em quatro vias alternativas: a glicose é deslocada para a via do polioliol, a frutose-6-fosfato é transferida para a via da hexosamina, a triose fosfato produz metilglioxal, principal precursor dos produtos de glicação avançada (AGE) e o fosfato de dihidroxiacetona é convertido para diacilglicerol que ativa a via da proteína C quinase (PKC) (LAY et al., 2014; MANNA; JAIN, 2015; SAVINI et al., 2013).

A ativação da via polioliol aumenta a conversão da glicose a sorbitol, que pode causar danos celulares e ativar vias inflamatórias como as proteínas quinases ativadas por mitógenos MAPK p38 e JNK. A formação da glucosamina-6-fosfato na via da hexosamina inibe a atividade da tioredoxina e induz dano oxidativo. Os AGEs e a PKC estimulam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), ativando o NF-κB e a NADPH-oxidase, compostos que aumentam a produção do radical superóxido (LAY et al., 2014; MANNA; JAIN, 2015; SAVINI et al., 2013; VINCENT; TAYLOR, 2006).

Outro ponto importante a ser destacado, diz respeito ao aumento dos ácidos graxos livres no plasma de indivíduos obesos, o que pode favorecer a geração do composto ânion superóxido na cadeia transportadora de elétrons por meio da inibição da translocação de nucleotídeos de adenina. Além disso, os ácidos graxos livres também podem estimular a produção de radicais livres por ativar a PKC, a qual por sua vez estimula a atividade da NADPH oxidase (INOBUCHI et al., 2000; LAY et al., 2014; MANNA; JAIN, 2015).

A leptina, hormônio produzido no adipócito, também é considerada fator contribuinte para o estresse oxidativo na obesidade por ativar a enzima NADPH-oxidase. Essa ativação ocorre tanto pelo fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e PKC, quanto pelo aumento das concentrações de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), contribuindo para a formação de EROS. A leptina também parece reduzir a atividade da paraoxonase 1 (PON-1), enzima ligada ao HDL, que protege as lipoproteínas plasmáticas da oxidação pelas EROS (BELTOWSKI; WÓJCICKA; JAMROZ, 2003; FORTUÑO et al., 2010; MANNA; JAIN, 2015; PANDEY et al., 2015; VINCENT; TAYLOR, 2006; ZHANG et al., 2009).

Krzystek-Korpacka et al. (2013) verificaram atividade da enzima PON-1 reduzida em crianças e adolescentes com excesso de peso e obesidade e correlação inversa entre as concentrações dessa enzima e o índice de massa corporal. De modo semelhante, na pesquisa de Zaki et al. (2014) foi observado concentrações significativamente reduzidas da PON-1 em adolescentes obesos quando comparado com os de peso adequado. Além disso, o estudo mostrou correlação negativa significativa entre as concentrações da PON-1 e o malondialdeído (MDA), marcador da peroxidação lipídica.

A inflamação crônica de baixo grau presente na obesidade, também constitui causa importante para a produção de EROS, pois o excesso de tecido adiposo aumenta a produção de adipocinas pró-inflamatórias pelos adipócitos, a exemplo do TNF- $\alpha$ , interleucina 1 (IL-1) e da interleucina 6 (IL-6), que ativam a enzima NADPH-oxidase, promovendo a produção de EROS na mitocôndria e no retículo endoplasmático (CODOÑER-FRANCH et al., 2011; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011; LAY et al., 2014; MONTEIRO; AZEVEDO, 2010).

Nessa temática, os componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona e seus receptores, envolvidos na manutenção da pressão arterial sistêmica, estão elevados na obesidade. Dessa forma, a angiotensina II por meio de seus receptores

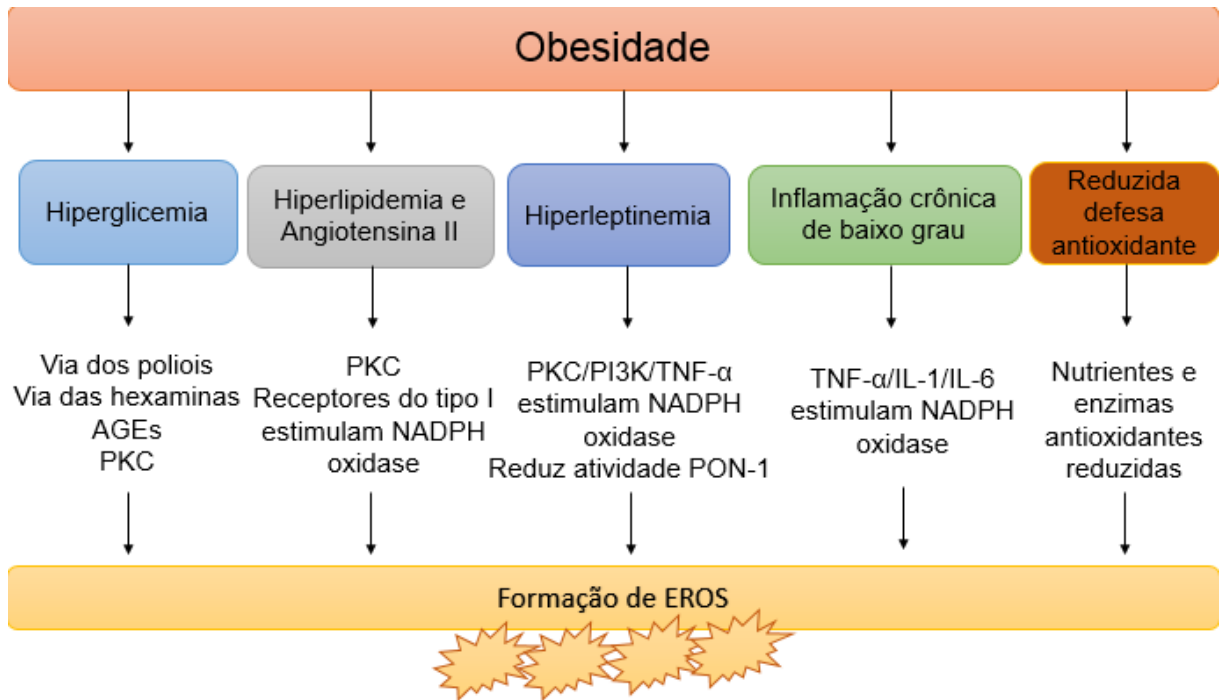


do tipo 1 pode estimular a atividade da NADPH oxidase em diferentes tipos de células vasculares, aumentando a produção de EROS (BRANDES; KREUZER, 2005; GRIENGLING et al., 1993; KURATA et al., 2006; LAY et al., 2014). Nesse sentido, no estudo de Mollnau et al. (2002) foi observado influência do tratamento da angiotensina II em ratos sobre a função endotelial e expressão das subunidades das NADPH oxidases e verificaram que a angiotensina II induz a expressão e atividade das NADPH oxidases pela ativação da PKC, contribuindo para a produção do ânion superóxido na parede vascular.

Nessa perspectiva, os indivíduos obesos podem apresentar comprometimento da defesa antioxidante, sendo evidenciado pelas concentrações reduzidas de nutrientes e enzimas antioxidantes (KAIDAR-PERSON et al., 2008; MANNA; JAIN, 2015; REITMAN et al., 2002; TASCILAR et al., 2011). Nesse contexto, no estudo de Zhu et al. (2006) foi observado atividade reduzida das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase em crianças com excesso de peso e obesidade, bem como aumento das concentrações de MDA nesses indivíduos quando comparado com as crianças saudáveis. Sobre este aspecto, ressalta-se o estudo realizado por Albuali et al. (2014) no qual foram observados valores reduzidos da atividade da GPx, SOD e catalase no grupo de crianças obesas quando comparado com as crianças de peso adequado e com excesso de peso.

Olusi (2002) observou que a concentração de MDA em indivíduos com peso corporal saudável era significativamente inferior àquela encontrada nos pacientes com índice de massa corporal superior a 40 kg/m<sup>2</sup>. O estudo revelou correlação positiva entre o índice de massa corporal e as concentrações plasmáticas do MDA, e ainda demonstrou atividade da GPx e da CuZn-SOD reduzida com o aumento dos valores do índice de massa corporal. Segundo os autores, a obesidade parece ser um fator de risco independente para o aumento do estresse oxidativo e, conseqüentemente para a manifestação da peroxidação lipídica.

**Figura 3** - Fatores associados ao estresse oxidativo na obesidade.



AGEs = produtos de glicação avançada; PKC = proteína C quinase; PI3K = fosfatidilinositol 3-quinase; TNF $\alpha$  = fator de necrose tumoral alfa; PON-1 = paraoxonase 1; IL-1 = interleucina 1; IL-6 = interleucina 6. Fonte: Elaborado pela autora.

### 2.3 Selênio, obesidade e estresse oxidativo

A prevalência da deficiência de nutrientes em indivíduos com excesso de peso e obesidade vem sendo descrita na literatura, e sugere-se que os obesos mesmo consumindo uma dieta hipercalórica, podem não alcançar as necessidades de vários micronutrientes essenciais, a exemplo do selênio. Além disso, a absorção, distribuição, metabolismo e excreção desses nutrientes podem ser alteradas na obesidade, comprometendo a biodisponibilidade (BŁAŻEWICZ et al., 2013; GARCÍA; LONG; ROSADO, 2009; KAIDAR-PERSON et al., 2008; MADAN et al., 2006).

Nesse sentido, Damms-Machado, Weser e Bischoff (2012) observaram deficiência de selênio em indivíduos obesos após três meses submetidos à intervenção com dieta hipocalórica, mas com quantidade adequada do mineral, sugerindo que a deficiência de selênio em obesos não é apenas causada pela sua baixa ingestão, mas também por alterações metabólicas e estresse oxidativo presente nesses indivíduos.

Sobre este aspecto, o estudo de Wang et al. (2016) verificou ingestão de selênio reduzida em 15% das mulheres com excesso de peso e 31% nas mulheres obesas, bem como 15% da ingestão desse mineral foi reduzida em homens com excesso de peso e 28% em homens obesos, quando comparado com o grupo de peso adequado, após o controle de idade, ingestão de calorias e atividade física.

Nessa abordagem, ressalta-se algumas pesquisas que evidenciam concentrações séricas reduzidas de selênio em obesos, a exemplo do estudo de Azab et al. (2014) que observaram níveis séricos reduzidos do mineral em crianças obesas quando comparado as crianças eutróficas, e Błażewicz et al. (2015) que também verificaram concentrações séricas e urinárias reduzidas de selênio em crianças obesas quando comparado ao grupo controle.

Kimmons et al. (2006) observaram que o aumento do índice de massa corporal em adultos foi associado com concentrações séricas reduzidas de selênio nesses indivíduos. Nessa perspectiva, Alasfar et al. (2011) verificaram baixa concentração de selênio em mulheres obesas mórbidas antes do tratamento com cirurgia bariátrica, enquanto que no estudo de Papamargaritis et al. (2015) foi verificada tendência para a redução de selênio nos pacientes após a intervenção com a cirurgia.

A deficiência de selênio constitui um fator importante para o aumento do estresse oxidativo em indivíduos obesos, pois esse mineral possui ação antioxidante, por compor o sítio catalítico de selenoproteínas essenciais para o controle do estado redox no organismo, a exemplo da GPx, TR e da SelP (BRENNEISEN; STEINBRENNER; SIES, 2005; LABUNSKYY; HATFIELD; GLADYSHEV, 2014; WEEKS; HANNA, COOPERSTEIN, 2012).

Sobre este aspecto, no estudo de Galan-Chilet et al. (2014) a concentração plasmática de selênio em adultos saudáveis foi inversamente associada ao MDA. De forma semelhante, na pesquisa de Helmersson et al. (2005) que acompanhou um grupo de adultos saudáveis por 27 anos foi observada correlação inversa entre as concentrações séricas de selênio e o 8-iso-PGF<sub>2</sub>α.

Nessa perspectiva, Murer et al. (2013) suplementaram crianças e adolescentes obesos com vitamina E, C e selênio e verificaram melhora significativa da capacidade antioxidante. Esse resultado pode ser atribuído ao aumento das concentrações sanguíneas desses nutrientes e a redução da concentração do MDA e do isoprostano-F<sub>2</sub> urinário. Nesse sentido, Cominetti et al. (2012) avaliaram o efeito da suplementação com castanha-do-brasil, fonte de selênio, por dois meses em mulheres obesas e

observaram aumento significativo nas concentrações plasmáticas e eritrocitárias do mineral e na atividade da GPx. Além disso, o estudo também revelou correlação significativa entre a concentração de selênio eritrocitário e a atividade da GPx eritrocitária.

Na pesquisa conduzida por Maranhão et al. (2011), adolescentes obesas foram suplementadas por quatro meses com castanha-do-brasil e foi verificado aumento das concentrações séricas de selênio quando comparado com o grupo placebo. Além disso, o 8-epi-PGF<sub>2α</sub> apresentou valores reduzidos no grupo suplementado com a castanha. No entanto, os valores de GPx3 não mostraram diferenças entre os grupos.

De modo semelhante, na pesquisa realizada por Cominetti et al. (2011), pacientes obesas foram suplementadas por dois meses com castanha-do-brasil e distribuídas em três grupos com frequências genótípicas diferentes para o polimorfismo da enzima GPx1 Pro198Leu. O estudo mostrou aumento significativo nas concentrações plasmáticas e eritrocitárias de selênio e na atividade da enzima GPx1 entre os grupos após a suplementação.

É importante ressaltar que a deficiência de selênio reduz a síntese de selenoproteínas, e os RNAs dessas enzimas podem tornar-se susceptíveis a mutações e o códon UGA pode funcionar como um códon de parada prematuro. As diferenças na estabilidade dos RNAs específicos de cada selenoproteína parece influenciar no direcionamento do selênio para cada uma delas. Portanto, a síntese de selenoproteínas é diferencialmente regulada pela disponibilidade do mineral, sendo que em condições de deficiência, a expressão de algumas dessas enzimas é significativamente reduzida, a exemplo da GPx1 (COMINETTI et al., 2011; LABUNSKYY; HATFIELD; GLADYSHEV, 2014; OTTAVIANO; HANDY; LOSCALZO, 2008; THOMSON, 2004; TOUAT-HAMICI et al., 2014; ZHANG et al., 2013). Nesse sentido, foi observado redução na atividade dessa selenoproteína e nas concentrações de RNAm no fígado e em outros tecidos de ratos em condições de baixa disponibilidade de selênio (EVENSON et al., 2004; LEI et al., 1995).

No entanto, a deficiência de selênio parece não comprometer de forma homogênea a atividade das diferentes selenoproteínas. Vale ressaltar que existe uma hierarquia na expressão dessas enzimas, as quais podem ser classificadas de acordo com a importância das suas funções no organismo. Dessa forma, entre as GPxs a GPx2 e a GPx4 parecem ter prioridade em relação à GPx1 e a GPx3, e a SelP ocupa posição intermediária, bem como a TR1 e TR3 parece ser menos regulada pelo

selênio dietético (HESKETH, 2008; SCHOMBURG; SCHWEIZER, 2009; LABUNSKYY; HATFIELD; GLADYSHEV, 2014).

Vale ressaltar que a biossíntese das selenoproteínas também é regulada por mecanismos que alteram a síntese dessas enzimas, como por exemplo em resposta ao estresse oxidativo, inflamação e doenças crônicas, por meio da indução da sua expressão gênica e pelas alterações na atividade e localização celular. Nesse contexto, as TRs e GPx1 parecem ser preferencialmente traduzidas em resposta ao estresse oxidativo (COMINETTI et al., 2011; LUBOS; LOSCALZO; HANDY, 2011; MARTITZ et al., 2015; MICKIEWICZ et al., 2014; PAPP et al., 2007; SCHWEIZER; DEHINA; SCHOMBURG, 2011; TOUAT-HAMICI et al., 2014).

Outro ponto importante a ser mencionado, é a possível associação do selênio com mecanismos da adipogênese. Nessa perspectiva, Kim et al. (2012) observaram que o selênio pode inibir a adipogênese por meio da regulação gênica da  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos no fígado e no tecido adiposo abdominal de ratos. Além disso, em outra pesquisa foi observado que injeções intraperitoneais de selenito de sódio reduziu o acúmulo de gordura abdominal e o tamanho dos adipócitos em ratos (KIM et al., 2012).

Estudo recente como o de Wang et al. (2016), no qual os indivíduos foram agrupados em tercís (baixo, médio ou alto) de acordo com o selênio dietético ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ ) foi verificado que o aumento da ingestão desse mineral estava associado a redução nos parâmetros de adiposidade, a exemplo do índice de massa corporal, circunferência da cintura e relação cintura-quadril.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a relação entre o estado nutricional relativo ao selênio e marcadores do estresse oxidativo em mulheres obesas.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Estimar a quantidade de selênio e macronutrientes nas dietas consumidas;
- Determinar as concentrações do selênio plasmático, eritrocitário e urinário em mulheres obesas e seus respectivos controles;
- Determinar as concentrações plasmáticas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a atividade da enzima glutathione peroxidase eritrocitária;
- Investigar a existência de correlação entre os parâmetros dietéticos e bioquímicos do selênio e marcadores do estresse oxidativo em mulheres obesas.

## 4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 4.1 Caracterização do estudo e protocolo experimental

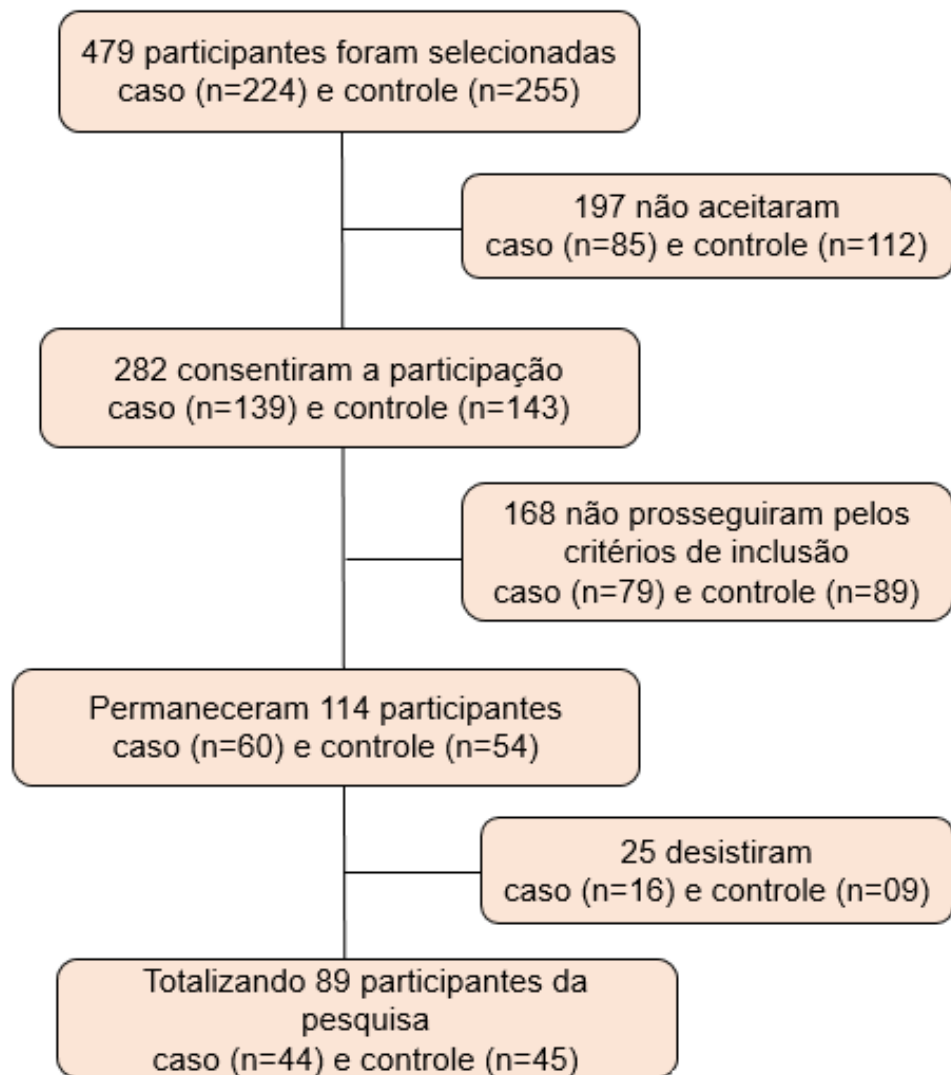
Estudo transversal desenvolvido com 44 mulheres obesas (grupo caso) e 45 mulheres eutróficas (grupo controle), na faixa etária entre 18 e 50 anos de idade, atendidas no ambulatório do Hospital Getúlio Vargas em Teresina (PI). As participantes do estudo foram selecionadas por meio de entrevista realizada no ambulatório, no momento da espera ou após a consulta, no qual receberam informações sobre a pesquisa e foi solicitado o seu consentimento para a participação.

Para a seleção das participantes foram considerados os seguintes critérios de inclusão: apresentar índice de massa corporal entre 18,5 e 24,9 kg/m<sup>2</sup> (grupo controle) e entre 30 e 39,9 kg/m<sup>2</sup> (grupo caso), não fumar, não ingerir álcool de forma crônica, não apresentar diabetes mellitus, hipertensão, insuficiência renal, doenças hepáticas, doenças cardiovasculares, câncer, doenças inflamatórias intestinais ou infecções recentes, não estar grávida ou amamentando, não estar em tratamento para perda de peso e não fazer uso de medicamentos e/ou suplemento nutricional que possam interferir no estado nutricional relativo ao selênio.

Todas as participantes que aceitaram participar assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A) e em seguida foi preenchido uma ficha de cadastro (Apêndice B) após receberem informações detalhadas sobre a pesquisa com linguagem adequada, conforme estabelecido pela Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 2012). Após assinatura do termo, foram entregues formulário para o registro alimentar (Apêndices C) e material para coleta da urina de 24 horas (Apêndice D), bem como foram agendadas datas para obtenção das medidas antropométricas (peso corporal, estatura e circunferência da cintura), coleta de sangue e entrega do registro alimentar e urina de 24 horas.

A definição da amostra do estudo foi baseada nos critérios de inclusão apresentados e na demanda de atendimentos no ambulatório do Hospital Getúlio Vargas no período de fevereiro a novembro de 2015. O recrutamento e a seleção das participantes do estudo estão descritos na figura 4.

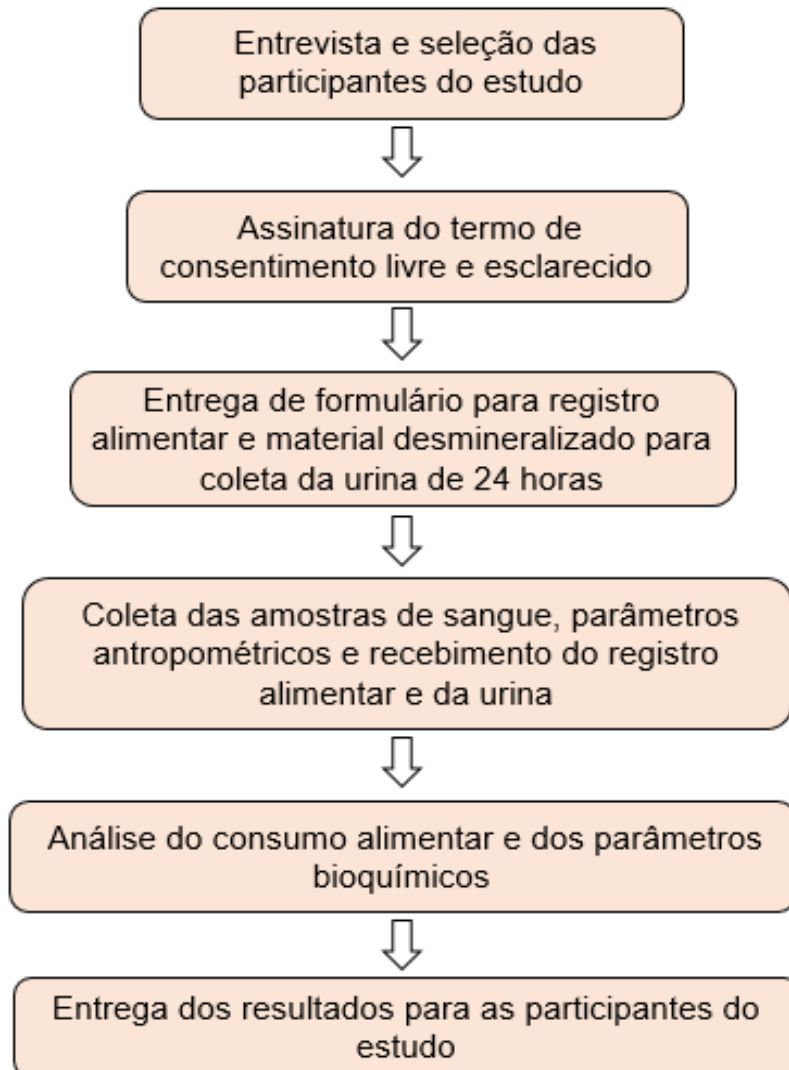
**Figura 4** - Fluxograma do recrutamento e seleção das participantes do estudo.



O projeto foi cadastrado na Plataforma Brasil e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí, CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) nº 31879614.5.0000.5214 e número do parecer 894.181 (ANEXO A) e aprovado também pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Getúlio Vargas, CAAE nº 31879614.5.3001.5613 e número do parecer 933.363 (ANEXO B). As etapas realizadas pelas participantes do estudo estão descritas na figura 5.



**Figura 5** - Fluxograma das etapas realizadas pelas participantes do estudo.



## 4.2 Avaliação antropométrica

### 4.2.1 Peso corporal (kg) e estatura (cm)

Anteriormente à coleta de sangue, o peso corporal foi determinado utilizando uma balança digital (Camry®, modelo EB9013), com capacidade máxima de 150 Kg, com as participantes do estudo descalças. A estatura foi medida com antropômetro (Welmy®, modelo R-110), graduado em centímetros e com barra vertical fixa para posicionamento sobre a cabeça, estando as participantes em posição ereta, descalças, com os braços estendidos ao longo do corpo, pés unidos, calcanhares

encostados no antropômetro, cabeça erguida e olhando para um ponto fixo na altura dos olhos (BRASIL, 2011).

#### 4.2.2 Índice de massa corporal (IMC)

O índice de massa corporal foi calculado a partir do peso da participante do estudo dividido por sua estatura elevada ao quadrado (WHO, 2000).

$$\text{IMC (kg/m}^2\text{)} = \frac{\text{Peso atual (kg)}}{\text{Estatura}^2 \text{ (m)}}$$

A classificação do estado nutricional a partir da distribuição do índice de massa corporal foi realizada segundo a recomendação da World Health Organization (WHO, 2000), apresentada no quadro 1.

**Quadro 1** - Classificação do estado nutricional, segundo o índice de massa corporal, em adultos.

Classificação	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )
Magreza classe III	<16
Magreza classe II	16 - 16,9
Magreza classe I	17 - 18,4
Eutrófico	18,5 - 24,9
Pré-obesidade	25,0 – 29,9
Obesidade classe I	30,0 – 34,9
Obesidade classe II	35,0 – 39,9
Obesidade classe III	≥ 40

Fonte: World Health Organization (2000).

#### 4.2.3 Circunferência da cintura (cm)

A medida da circunferência da cintura foi realizada utilizando uma fita métrica flexível e não extensível, com precisão de 0,1 centímetros, circundando a linha natural da cintura, na região mais estreita entre o tórax e o quadril, no ponto médio entre a

última costela e a crista íliaca. As participantes estavam em posição ereta, com abdômen relaxado, braços estendidos ao longo do corpo e pés afastados um do outro.

### **4.3 Avaliação do consumo alimentar**

Para a avaliação do consumo alimentar, foi utilizado um inquérito alimentar realizado de acordo com a técnica de registro alimentar de 3 dias (Apêndice C), compreendendo dois dias alternados durante a semana e um dia no final de semana (sábado ou domingo). No momento da entrega dos formulários, foi dada às participantes da pesquisa orientação quanto à forma correta de anotar os alimentos, como discriminar os tipos de refeições, preparações, porcionamento, medidas caseiras, quantidades e horários em que as mesmas foram consumidas.

A quantidade de energia, macronutrientes e selênio foram calculados pelo software “*Nutwin*”, versão 1.5 do Departamento de Informática em Saúde da Universidade Federal de São Paulo (ANÇÃO et al., 2002). As informações nutricionais dos alimentos e preparações consumidos pelas participantes foram adicionadas ao banco de dados do programa, sendo que para energia e macronutrientes considerou-se a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011) e a Tabela de Composição de Alimentos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2011). Em relação ao selênio, utilizou-se os dados de Ferreira et al. (2002), da Tabela de Composição de Alimentos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2011) e do *National Nutrient Database for Standard Reference* do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2015), de forma que todos os alimentos apresentassem informação nutricional.

As medidas caseiras foram convertidas em gramas de acordo com a tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras (PINHEIRO et al., 2009) e tabela de medidas referidas para os alimentos consumidos no Brasil (IBGE, 2011). Para verificar a ingestão alimentar dos macronutrientes foi utilizado como referência o intervalo aceitável de distribuição de macronutrientes (AMDR) (INSTITUTE OF MEDICINE, 2005) e para o selênio foi utilizado como referência a necessidade média estimada (EAR) (INSTITUTE OF MEDICINE, 2000), contidos nas *Dietary Reference Intakes* (DRI's).

#### 4.3.1 Análise dos dados dietéticos

Após verificar a normalidade da distribuição do selênio e macronutrientes, os valores de ingestão foram ajustados em relação à energia pelo cálculo dos nutrientes e corrigidos pela variabilidade intrapessoal e interpessoal, evitando distorções geradas por diferenças no consumo energético (FISBERG et al., 2005; JAIME et al., 2003; WILLETT; STAMPFER, 1986). O cálculo possui quatro etapas:

Inicialmente realizou-se análise de regressão linear simples, considerando-se o total de energia ingerida como variável independente e o valor absoluto do nutriente como variável dependente. Utilizando-se a equação geral da regressão linear, pôde-se determinar a quantidade estimada de nutriente ( $Y_e$ ) que o indivíduo deveria consumir com a sua média de consumo de energia.

$$\text{Equação 1: } Y_e = \beta_0 + \beta_1 \times \text{valor do consumo energético do indivíduo}$$

Onde:

$\beta_0$  = intercepto da regressão linear simples

$\beta_1$  = tangente

O resíduo da regressão ( $Y_r$ ) representa a diferença entre a ingestão atual observada ( $Y_o$ ) para cada indivíduo e a ingestão estimada.

$$\text{Equação 2: } Y_r = Y_o - Y_e$$

Por definição, o resíduo possui média zero e pode apresentar valores positivos e negativos. Com isso, faz-se necessária a adição de uma constante, que é estatisticamente arbitrária. Willett; Howe; Kushi (1997) propõem que a constante seja o consumo do nutriente estimado para a média do total de energia consumida pela população de estudo.

$$\text{Equação 3: } Y_c = \beta_0 + (\beta_1 \times \text{média do consumo energético do grupo})$$

O valor do nutriente ajustado ou residual ( $Y_a$ ) consiste na soma do  $Y_r$  e da constante  $Y_c$  e refere-se ao valor do nutriente ingerido não correlacionado com o total de energia consumida.

$$\text{Equação 4: } Y_a = Y_r + Y_c$$

Após o ajuste por energia, os valores de selênio e macronutrientes foram corrigidos pela variabilidade intrapessoal e interpessoal. Foi feita a análise de variância One-way ANOVA, para se obter o coeficiente de correlação corrigido pela variação intrapessoal e interpessoal. Por meio da média quadrática intrapessoal fornecida pela ANOVA têm-se o valor da variância intrapessoal ( $S_{intra}^2$ ), inerentes ao consumo de selênio e macronutrientes (SLATER; MARCHIONI; FISBERG, 2004).

$$S_{intra}^2 = MQ_{intra}$$

Onde,

$MQ_{intra}$  = Média quadrática intrapessoal

Além da variância intrapessoal também foi calculada a variância interpessoal ( $S_{inter}^2$ ):

$$S_{inter}^2 = (MQ_{inter} - S_{intra}^2) / K$$

Onde,

$MQ_{inter}$  = Média quadrática interpessoal

$K$  = número de dias de aplicação de inquérito alimentar

Em seguida, calculou-se a variância total ( $S_{obs}$ ) da distribuição observada, que é dada pela diferença das variâncias intra e interpessoal:

$$S_{obs} = S_{inter}^2 - S_{intra}^2 / K$$

Onde,

$S_{obs}$  = variância total

$S_{intra}$  = variância intrapessoal

$S_{inter}$  = variância interpessoal

Posteriormente, para remover a variância intrapessoal, utilizou-se a equação proposta pelo US National Academy of Science Subcommittee on Criteria for Dietary Evaluation:

$$\text{Valor ajustado do nutriente} = \text{média} + (x_1 - \text{média}) \times S_{\text{inter}}$$

Onde:

Média = valor médio de ingestão do grupo

$x_1$  = valor de ingestão de cada indivíduo

Utilizando a fórmula acima foi feita a distribuição do selênio ajustado do grupo, com redução do desvio padrão. A EAR utilizada foi de 45 µg/dia para mulheres adultas (INSTITUTE OF MEDICINE, 2000) e para macronutrientes foi utilizado como referência o intervalo aceitável de distribuição de macronutrientes (AMDR) (INSTITUTE OF MEDICINE, 2005).

#### **4.4 Coleta do material biológico**

##### **4.4.1 Coleta de sangue**

A coleta de sangue foi realizada por profissional técnico em enfermagem no período da manhã, entre 7 e 9 horas, estando as participantes em jejum de cerca de 12 horas. Foram coletados 20 mL de sangue, sendo 08 mL utilizados para análise dos parâmetros do estudo, os quais foram distribuídos em tubos distintos: (1) tubo a vácuo contendo ácido etileno diaminotetracético (EDTA) para análise do selênio (4 mL) e (2) tubo a vácuo contendo ácido etileno diaminotetracético (EDTA) para análise da atividade da glutatona peroxidase e das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (4 mL).

#### 4.4.2 Coleta de urina de 24 horas

A urina de 24 horas foi coletada em frasco plástico âmbar (2L) previamente desmineralizado. Após homogeneização do seu conteúdo total, foi retirado uma alíquota de 44 mL de urina, que foi transferida para um frasco coletor (40 mL) e microtubos (4 mL) devidamente desmineralizados e conservados em *freezer* a -20°C para posterior análise de creatinina e selênio, respectivamente. Para o cálculo do volume urinário considerou-se a densidade (1,015 g/mL) e a massa da urina (diferença entre o peso do frasco antes e após a coleta da urina de 24 horas), utilizando balança semianalítica, conforme fórmula abaixo.

$$\text{Densidade (g/mL)} = \frac{\text{Massa (g)}}{\text{Volume (mL)}}$$

#### 4.5 Determinação dos parâmetros bioquímicos

##### 4.5.1 Controle de contaminação e preparo dos reagentes

A fim de garantir o controle de contaminação por minerais, toda a vidraria e material de polipropileno utilizado para as análises foram desmineralizados antes do uso, por meio do banho em solução de ácido nítrico a 30%, durante um período mínimo de 12 horas. Posteriormente, foram enxaguados em água deionizada, no mínimo 10 vezes, secos em estufa e mantidos em depósitos fechados, até o momento da utilização (AOAC, 2012). Todas as soluções aquosas e as diluições foram preparadas com água ultrapura (18 MΩ.cm<sup>-1</sup>), obtida por meio de um sistema Milli-Q (Millipore®, Estados Unidos).

##### 4.5.2 Separação dos componentes do sangue

Para determinação do selênio plasmático, o plasma foi separado do sangue total por centrifugação (CT-5000R) a 1764 xg durante 15 minutos a 4 °C. Em seguida, o plasma foi extraído com pipeta automática e acondicionado em microtubos previamente desmineralizados, sendo posteriormente conservados a -20 °C.

Para determinação do selênio eritrocitário, a massa eritrocitária foi lavada com 03 mL de solução salina isotônica (NaCl a 0,9%), sendo cuidadosamente

homogeneizada por inversão e, posteriormente, centrifugada (CT-5000R) a 2401 xg por 10 minutos. Este procedimento foi repetido 3 vezes para remover contaminantes dos eritrócitos (plaquetas e leucócitos). Após a última centrifugação, a solução salina foi aspirada e descartada, e a massa eritrocitária foi extraída cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta automática e transferida para microtubos desmineralizados, que foram mantidos à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise (WHITEHOUSE et al., 1982).

#### 4.5.3 Determinação de selênio plasmático, eritrocitário e urinário

As análises de selênio plasmático, eritrocitário e urinário foram feitas no Laboratório de Espectrometria de Emissão Atômica - Embrapa (Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo). A análise de selênio foi realizada em espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (720 ICP/OES, *Varian Inc.*, Estados Unidos), utilizando sistema de gerador de hidretos ( $\text{NABH}_4$ ) montado sobre uma plataforma *V-Groove* com nebulizador do tipo *Babington*, com orifício de gás de 70 mm acoplado (BŁAŻEWICZ et al., 2015; HARRINGTON et al., 2014; NIEDZIELSKI; SIEPAK, 2003).

O aparelho foi configurado com as seguintes condições experimentais: Potência: 1,4 kW; Fluxo de plasma (gás): 15 L/min; Fluxo de gás auxiliar: 1,5 L/min; Tipo de câmara de *spray*: ciclônica; e Fluxo do nebulizador: 0,7 L/min.

As amostras de plasma foram diluídas em 1:20 (v/v) da seguinte forma: 3,0% (m/v) 1-butanol, 0,1% (v/v) TAMA (surfactante de alta pureza), 0,05% (v/v)  $\text{HNO}_3$ . As amostras de eritrócitos/papa de hemácias foram diluídas em 1:60 (v/v) da seguinte forma: 3,0% (m/v) 1-butanol, 0,2% (v/v) TAMA (surfactante de alta pureza), 0,1% (v/v)  $\text{HNO}_3$ . As amostras de urina foram diluídas em 1:40 v/v em água ultrapura ( $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ) e colocadas em frascos volumétricos de politetrafluoretileno e foi utilizado um sistema assistido de microondas CEM Mars 6 (CEM corporation, Mattheus, USA) com digestão ácida com  $\text{HNO}_3$  a 65% (1 mL de  $\text{HNO}_3$ : 9 mL de água deionizada).

O Se (VI) foi reduzido para Se (IV) em HCl 4 M, aquecendo a solução diluída a  $90^{\circ}\text{C}$  por 30 min. A escolha das linhas espectrais de análise foi baseada tanto na sua sensibilidade quanto na interferência espectral, sendo otimizadas para o selênio leituras nos comprimentos de onda de 196,026 nm e 203,985 nm. As amostras foram medidas em triplicata.



Solução estoque de 1000 µg/mL de selênio (*Spex®CertiPrep*, Estados Unidos) foi utilizada para preparar as curvas de calibração e otimização das condições analíticas. Todos os padrões foram preparados da mesma forma que as amostras. As curvas de calibração foram preparadas nas seguintes concentrações: 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µg/L em soluções diluentes contendo 3,0% (m/v) 1-butanol, 0,1% (v/v) TAMA (surfactante de alta pureza) e 0,05% (v/v) HNO<sub>3</sub>. Os limites de detecção foram determinados a partir da equação: 3 × desvio padrão de 10 medições do branco, dividido pela declividade da curva de calibração. Amostras de material de referência certificado (*Seronorm® Oligoelement Serum*, Noruega) foram determinadas para validar as medições analíticas em ICP-OES.

Para avaliação do estado nutricional relativo ao selênio foram adotados os seguintes valores de referência: selênio plasmático – 80 a 95 µg/L (para maximização da atividade da GPx plasmática) (THOMSON, 2004), e selênio eritrocitário – 0,18 a 0,55 µg/gHb (VITOUX; ARNAUD, CHAPPUIS, 1999). O selênio urinário foi avaliado segundo a quantidade excretada do mineral na urina de 24 horas e por meio do cálculo do seu *clearance*.

#### 4.5.4 Determinação do *clearance* de selênio

O *clearance* de selênio foi calculado a partir das concentrações plasmáticas desse mineral e das suas quantidades excretadas na urina de 24 horas, utilizando a seguinte fórmula (ROBINSON et al., 1985):

$$\text{Clearance de selênio} = \frac{\text{Selênio urinário (}\mu\text{g/L)} \times \text{taxa urinária (mL/min)}}{\text{Selênio plasmático (}\mu\text{g/mL)}}$$

#### 4.5.5 Determinação da hemoglobina

A concentração de hemoglobina na massa eritrocitária foi determinada conforme o método da cianometahemoglobina, para expressar as concentrações de selênio eritrocitário e atividade da glutathiona peroxidase (VAN ASSENDELFT, 1972).

Esse método se baseia na reação de oxidação do  $\text{Fe}^{+2}$  do grupo heme da hemoglobina pelo ferricianeto, e posterior reação com o cianeto de potássio para formar cianeto de hemoglobina. Inicialmente, em um microtubocontendo 300  $\mu\text{L}$  de massa eritrocitária foi adicionado 900  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, perfazendo um lisado com proporção 1:4. Em seguida, a uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  desse lisado foi acrescentado 5 mL de solução de Drabkin(Labtest<sup>®</sup>, Brasil). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV visível (Bel Photonics<sup>®</sup>, SP1102) considerando o comprimento de onda de 540 nm.

#### 4.5.6 Determinação da creatinina urinária de 24 horas

A determinação da creatinina urinária foi realizada em analisador bioquímico automático *Chem Well T* (*Awareness Technology Inc.*, Estados Unidos) utilizando kit Creatinina K (Labtest<sup>®</sup>, Brasil), com comprimento de onda de 510 nm, para expressar as concentrações de selênio urinário e como marcador da completude da urina 24 horas. O método adotado se baseia na reação de Jaffé, na qual a creatinina reage com o picrato alcalino, formando um complexo de cor vermelha. A creatinina urinária também foi utilizada como marcador da completude da urina de 24 horas, assim as participantes que excretaram quantidades inferiores a 791,82 mg/24h foram excluídas das análises relacionadas à variável selênio urinário (ROBINSON et al., 1997). Para o cálculo da creatinina urinária de 24 horas, considerou-se a seguinte fórmula (CLARKE, 1961):

$$\text{Creatinina urinária (mg/24h)} = \frac{\text{Creatinina urinária (mg/dL)} \times 25 \times \text{Volume urinário}}{100}$$

#### 4.5.7 Determinação da atividade da glutathiona peroxidase eritrocitária

A determinação da atividade da glutathiona peroxidase eritrocitária foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas do NAMI (Núcleo de Atendimento Médico Integrado) na Universidade de Fortaleza (UNIFOR), em analisador bioquímico automático Labmax 240 (Labtest<sup>®</sup>, Brasil), utilizando kit *Ransel 505* (*Randox Laboratories*<sup>®</sup>, Reino Unido), segundo metodologia proposta por Paglia e Valentine

(1967). A amostra foi preparada diluindo-se 100 µL de eritrócito em 100 µL de água ultrapura (lisado 1). Em seguida, adicionou-se 1 mL do diluente fornecido pelo kit a 50 µL do lisado 1, e após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, foi acrescentado 1 mL de solução de Drabkin (Labtest®, Brasil) (lisado 2). No analisador bioquímico, foram automaticamente adicionados 20 µL de hidroperóxido de cumeno e 500 µL do reagente, ambos fornecidos pelo kit, a 10 µL do lisado 2. O declínio na absorbância das amostras foi medido em comprimento de onda de 340 nm. Os resultados foram expressos em unidades de enzima por grama de hemoglobina (U/gHb). Para avaliação da glutathiona peroxidase foi adotado o valor de referência proposto pela RANDOX (27,5 a 73,6 U/gHb).

#### 4.5.8 Determinação das concentrações plasmáticas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

As concentrações plasmáticas de TBARS foram determinadas seguindo-se método descrito por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979), com adaptações. Antes do processamento das amostras, uma curva analítica de calibração foi preparada nas concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 nmol, utilizando-se o tetraetoxipropano (TEP) como padrão.

Em microtubos contendo 200 µL de plasma e um com 200 µL de água destilada (branco), foram adicionados 350 µL de ácido acético a 20% (pH 3,5) e 600 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5%, diluído em ácido acético. As amostras foram preparadas em triplicata e incubadas em banho-maria, com sistema de agitação a 85°C por uma hora e, após esse período, submetidos a banho de gelo por 15 minutos.

Em seguida, adicionou-se 50 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 8,1% nos microtubos, procedendo-se à centrifugação por 15 minutos a 13680 xg a 25°C. O sobrenadante foi extraído e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV visível (Bel Photonics®, SP1102), considerando o comprimento de onda de 532 nm. Os resultados foram expressos em nmol/mL.

#### 4.6 Análise estatística

Os dados foram organizados em planilhas do Excel®, para realização de análise descritiva das variáveis observadas nos grupos estudados. Posteriormente,

os dados foram exportados para o programa SPSS (for Windows® versão 22.0) para análise estatística dos resultados.

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para verificar a homocedasticidade dos dados. Em seguida, para fins de comparação entre os grupos estudados, o teste “t” de Student foi utilizado para as variáveis com distribuição normal, e o teste de Mann Whitney para aquelas com distribuição não paramétrica. A fim de identificar a existência de associações entre as variáveis analisadas, utilizou-se o teste qui-quadrado ( $X^2$ ). Para o estudo de correlações, o coeficiente de correlação linear de Pearson foi utilizado para os dados com distribuição normal. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando o valor de  $p < 0,05$ , admitindo-se um erro de 5%.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Parâmetros antropométricos das participantes

Os valores médios e desvios padrão da idade e dos parâmetros antropométricos utilizados na avaliação do estado nutricional das mulheres obesas e grupo controle estão apresentados na tabela 1. Verifica-se que houve diferença estatística significativa entre os grupos em relação ao peso corporal, o índice de massa corporal e a circunferência da cintura.

**Tabela 1** - Valores médios e desvios padrão da idade, peso corporal, estatura, índice de massa corporal e circunferência da cintura das mulheres obesas e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2016.

Parâmetros	Obesas	Controle	p
	(n=44) Média (DP)	(n=45) Média (DP)	
Idade (anos)	38,30 (6,68)	36,96 (7,33)	0,371
Peso corporal (kg)	83,30 (9,52)*	53,57 (5,02)	< 0,001
Estatura (m)	1,53 (0,68)	1,55 (0,55)	0,290
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	35,07 (2,43)*	22,10 (1,55)	< 0,001
CC (cm)	100,94 (8,46)*	72,58 (4,83)	< 0,001

\*Valores significativamente diferentes entre as mulheres obesas e grupo controle, teste *t* de Student ( $p < 0,05$ ). IMC = Índice de Massa Corporal; CC = Circunferência da Cintura.

### 5.2 Consumo alimentar

Os valores médios e desvios padrão para energia e macronutrientes encontrados nas dietas consumidas pelas mulheres obesas e grupo controle estão descritos na tabela 2. Verifica-se que não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

**Tabela 2** - Valores médios e desvios padrão da ingestão de energia e macronutrientes das mulheres obesas e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2016.

Energia/Nutrientes	Obesas	Controle	p
	(n=40)	(n=43)	
	Média (DP)	Média (DP)	
Energia (Kcal)	1580,93 (554,19)	1511,73 (337,39)	0,498
Carboidrato (%)	51,09 (8,09)	52,24 (7,71)	0,505
Proteína (%)	20,00 (5,31)	19,78 (4,77)	0,321
Lipídio (%)	27,63 (5,67)	28,09 (4,57)	0,492

Teste *t* de *Student* ( $p < 0,05$ ). Valores de referência: 10 a 35% de proteína, 20 a 35% de lipídio, 45 a 65% de carboidratos (Institute of Medicine, 2005).

Os valores da mediana, mínimo e máximo da ingestão de selênio encontrado nas dietas consumidas pelas mulheres obesas e grupo controle estão descritos na tabela 3. Verifica-se que não houve diferença estatística significativa entre os grupos em relação ao consumo de selênio.

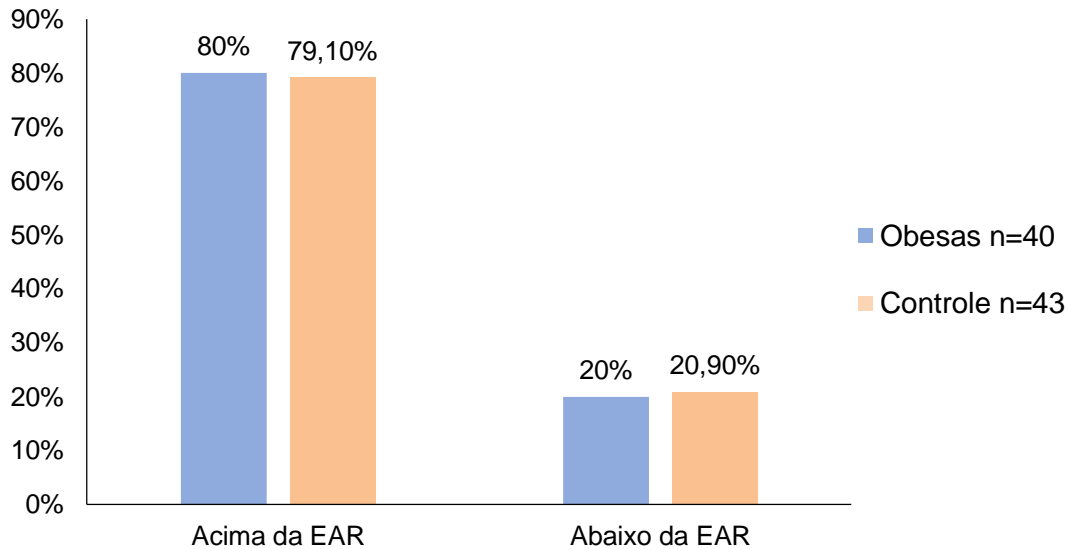
**Tabela 3** - Valores de mediana, mínimo e máximo da ingestão de selênio das mulheres obesas e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2016.

Nutriente	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	p
Selênio ajustado ( $\mu\text{g}/\text{dia}$ )	Obesas (n=40)	57,81	4,54	191,47	0,917
	Controle (n=43)	58,46	26,79	464,67	

Teste *deMann-Whitney* ( $p < 0,05$ ). Valores de referência para ingestão do selênio: EAR = 45  $\mu\text{g}/\text{dia}$  (Institute of Medicine, 2000).

A distribuição percentual das participantes do estudo segundo os valores de referência da ingestão de selênio está apresentada na figura 6. Verificou-se que 80% e 79,10% das mulheres obesas e controle, respectivamente, ingeriram quantidade acima da EAR do mineral.

**Figura 6-** Distribuição percentual das mulheres obesas e grupo controle segundo os valores de referência de ingestão de selênio. Teresina-PI, Brasil, 2016.



Teste qui-quadrado ( $p=0,916$ ). Valores de referência para ingestão do selênio: EAR = 45  $\mu\text{g}/\text{dia}$  (Institute of Medicine, 2000).

### 5.3 Parâmetros bioquímicos de avaliação do selênio

Na tabela 4 encontram-se as concentrações plasmáticas, eritrocitárias e urinárias de selênio das mulheres obesas e grupo controle. Verificou-se que houve diferença estatística significativa entre os grupos em relação ao selênio plasmático e eritrocitário. Em relação ao parâmetro urinário, verificou-se diferença estatística significativa entre os grupos quando avaliado apenas o *clearance* de selênio.

**Tabela 4** - Valores médios e desvios padrão das concentrações plasmáticas, eritrocitárias e urinárias de selênio das mulheres obesas e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2016.

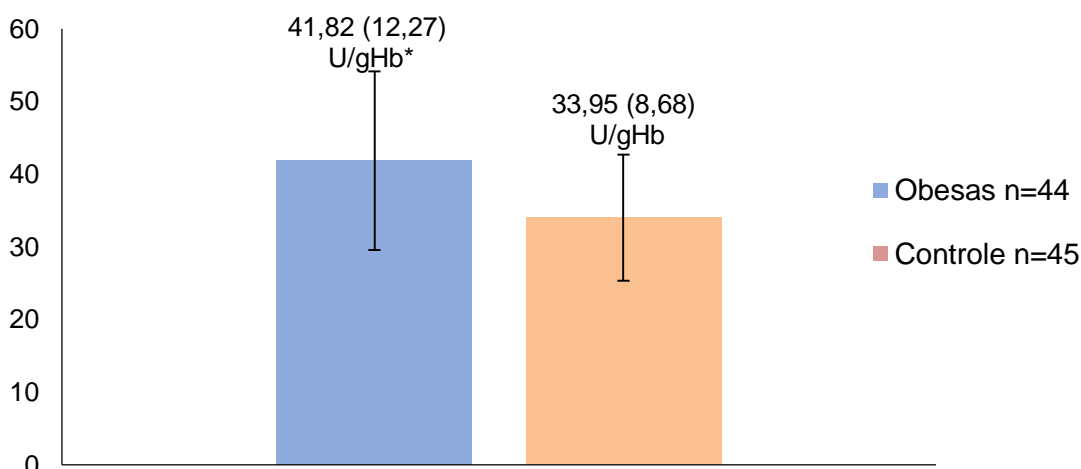
Parâmetros	Obesas (n=44) Média (DP)	Controle (n=45) Média (DP)	p
Selênio plasmático (µg/L)	62,12 (6,83)*	86,57 (10,31)	<0,001
Selênio eritrocitário (µg/gHb)	0,27 (0,06)*	0,33 (0,06)	<0,001
Selênio urinário <sup>a</sup> (µgSe/g creatinina)	45,04 (19,62)	45,33 (22,86)	0,960
Clearance de selênio (mL/min)	0,60 (0,21)*	0,40 (0,19)	<0,001

<sup>a</sup>Selênio urinário: obesas (n=30) e controle (n=28). \*Valores significativamente diferentes entre as mulheres obesas e grupo controle, teste *t* de *Student* ( $p < 0,05$ ). Valores de referência: Selênio Plasmático = 80 a 95 µg/L (Thomson, 2004); Selênio Eritrocitário = 0,18 a 0,55 µg/gHb (Vitoux; Arnaud, Chappuis, 1999).

#### 5.4 Atividade da enzima glutaciona peroxidase

O resultado da análise da atividade da glutaciona peroxidase eritrocitária está apresentado na figura 7. Verificou-se que houve diferença estatística significativa na atividade dessa enzima entre os grupos ( $p=0,001$ ).

**Figura 7-** Atividade da enzima glutaciona peroxidase eritrocitária nas mulheres obesas e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2016.



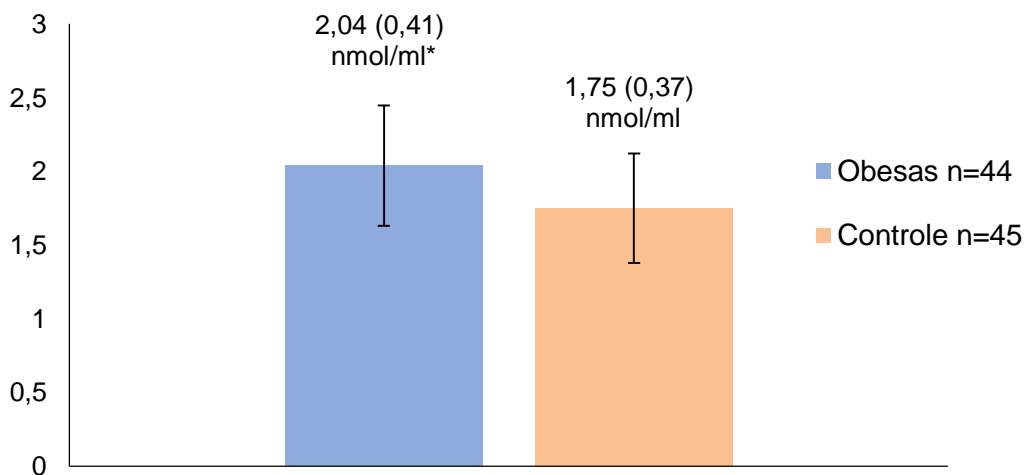
\*Valores significativamente diferentes entre as mulheres obesas e grupo controle, teste *t* de *Student* ( $p < 0,05$ )



### 5.5 Concentrações plasmáticas do marcador da peroxidação lipídica

Os valores das concentrações plasmáticas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), marcador da peroxidação lipídica, estão apresentados na figura 8. Verificou-se diferença estatística significativa nos valores desse biomarcador entre os grupos estudados ( $p=0,001$ ).

**Figura 8** – Concentração plasmática das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico nas mulheres obesas e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2016.



\*Valores significativamente diferentes entre as mulheres obesas e grupo controle, teste *t* de Student ( $p<0,05$ )

### 5.6 Estudo de correlação entre biomarcadores do estado nutricional relativo ao selênio e marcadores do estresse oxidativo

A tabela 5 apresenta os resultados da análise de correlação entre os biomarcadores do estado nutricional relativo ao selênio e a atividade da enzima glutatona peroxidase eritrocitária. Verificou-se que houve correlação positiva significativa entre a concentração de selênio eritrocitário e atividade da glutatona peroxidase nos grupos avaliados.

**Tabela 5** - Análise de correlação linear simples entre os biomarcadores do estado nutricional relativo ao selênio e atividade da enzima glutatona peroxidase eritrocitária nas mulheres obesas e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2016.

Parâmetros	GPx (U/gHb)			
	Obesas		Controle	
	r	p	r	p
Se plasmático (µg/L)	-0,255	0,095	-0,258	0,087
Se eritrocitário (µg/gHb)	0,386*	0,010	0,476*	0,001
Se urinário <sup>a</sup> (µgSe/g creatinina)	-0,297	0,110	-0,232	0,236

<sup>a</sup>Selênio urinário: obesas (n=30) e controle (n=28). \*Correlação Linear de *Pearson* (p<0,05). GPX= Glutaciona peroxidase.

A tabela 6 apresenta os resultados da análise de correlação entre os biomarcadores do estado nutricional relativo ao selênio com as TBARS, sendo que para correlacionar o selênio dietético com esse marcador foram retirados os outliers, verificados nos maiores percentis. Não foi encontrada correlação significativa entre os parâmetros observados.

**Tabela 6** - Análise de correlação linear simples entre os biomarcadores do estado nutricional relativo ao selênio e o marcador da peroxidação lipídica nas mulheres obesas e grupo controle. Teresina-PI, Brasil, 2016.

Parâmetros	TBARS (nmol/ml)			
	Obesas		Controle	
	r	p	r	p
Se dietético (µg/dia) <sup>a</sup>	0,026	0,877	-0,063	0,705
Se plasmático (µg/L)	0,017	0,912	-0,016	0,915
Se eritrocitário (µg/gHb)	-0,128	0,408	0,197	0,194
Se urinário <sup>b</sup> (µgSe/g creatinina)	0,145	0,445	-0,161	0,413

<sup>a</sup>Selênio dietético: obesas (n=37) e controle (n=39). <sup>b</sup>Selênio urinário: obesas (n=30) e controle (n=28). Correlação Linear de *Pearson* (p<0,05). TBARS= substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

## 6 DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliado o estado nutricional relativo ao selênio, a atividade da enzima glutathiona peroxidase e as concentrações plasmáticas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em mulheres obesas e eutróficas, bem como foi investigada a existência de correlação entre essas variáveis nos grupos estudados. Sobre os resultados encontrados, a ingestão de selênio, macronutrientes e energia não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos, sendo que 80% das mulheres obesas e 79,1% das mulheres com peso adequado consumiam quantidades do mineral acima do recomendado (INSTITUTE OF MEDICINE, 2000).

Nesse sentido, os dados do inquérito alimentar realizado nesse estudo mostraram que as quantidades de selênio observadas nas dietas consumidas pelas mulheres obesas e eutróficas pode ser atribuída à ingestão de alimentos fontes desse nutriente, como carnes, peixes e frango (FERREIRA et al., 2002; NAVARRO-ALARCON; CABRERA-VIQUE, 2008). Além disso, é importante destacar que a maioria dos valores de selênio encontrados em tabelas de composição de alimentos é proveniente de estudos realizados em outros países, o que pode superestimar a ingestão do mineral, devido a variabilidade nas concentrações de selênio no solo, principal determinante da sua quantidade nos alimentos (COMBS, 2015).

Com relação aos resultados da análise de selênio no plasma, as mulheres obesas apresentaram concentrações reduzidas do mineral, com diferença estatística significativa entre os grupos, segundo o valor de referência adotado por Thomson (2004). Sobre esse dado, ressalta-se que a quantidade de selênio encontrada nas dietas consumidas por essas mulheres parece não ter influenciado os valores deste nutriente verificados no plasma. No entanto, outros fatores podem justificar esse resultado, a exemplo do estresse oxidativo presente nas mulheres obesas avaliadas, que aumenta a necessidade de nutrientes e de enzimas antioxidantes para a defesa contra o excesso de espécies reativas de oxigênio, o que de fato pode ter contribuído para a redução de selênio no plasma.

Associado a isso, a inflamação crônica de baixo grau, característica da obesidade, também pode ter influenciado as concentrações plasmáticas de selênio, pois esse distúrbio metabólico reduz a síntese da SeIP nos hepatócitos, selenoproteína responsável pelo transporte de até 70% do selênio no plasma (MARTITZ et al., 2015). Nesse contexto, a supressão da síntese da SeIP no fígado,

umas das principais vias de liberação de selênio nesse órgão, torna-o mais disponível para síntese de seu metabólito urinário e, conseqüentemente, aumenta o *clearance* desse mineral, conforme foi verificado nas mulheres obesas avaliadas nesse estudo. Assim, torna-se evidente a contribuição de fatores relevantes associados à obesidade na redução das concentrações de selênio no plasma (BURK et al., 2006).

Quanto à análise de selênio nos eritrócitos, as mulheres obesas apresentaram concentrações reduzidas em relação ao grupo controle com diferença estatística significativa. Nesse sentido, o estresse oxidativo presente nas mulheres obesas avaliadas neste estudo aumentou a demanda do uso de selênio para a síntese da enzima glutathiona peroxidase e de outras selenoproteínas com ação antioxidante em tecidos específicos, o que pode ter ocasionado a redução da concentração do mineral nos eritrócitos.

Nessa discussão, ainda em relação às concentrações de selênio nos eritrócitos, ressalta-se que ambos os grupos apresentaram valores adequados desse parâmetro, segundo o valor de referência adotado por Vitoux; Arnaud e Chappuis, (1999). Tal resultado pode ser atribuído à meia-vida longa dessas células (120 dias), o que provavelmente contribuiu para uma resposta mais lenta às alterações no estado nutricional relativo ao selênio. Outro aspecto importante, trata-se da quantidade de selênio nas dietas avaliadas, fato que também pode ter favorecido a manutenção das concentrações adequadas desse mineral nos eritrócitos. Além disso, a inflamação crônica característica da obesidade, parece exercer menor influência sobre as concentrações eritrocitárias de selênio, contribuindo para manter as concentrações adequadas do mineral nesse componente sanguíneo (STEFANOWICZ et al., 2013).

Ressalta-se que existem limitações na definição dos valores de referência para identificar a situação nutricional relativa ao selênio em indivíduos, o que impossibilita avaliar de forma precisa o seu estado nutricional. Sobre esse aspecto, a literatura mostra valores diversos de normalidade para identificar as concentrações desse mineral no plasma e eritrócitos e ainda a sua quantidade na dieta.

No que diz respeito à análise das concentrações plasmáticas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, esse marcador estava elevado nas mulheres obesas, com diferença estatística significativa entre os grupos. Um ponto relevante que pode fundamentar tal resultado é o fato de que em pacientes obesos a disfunção do tecido adiposo induz aumento da produção de adipocinas pró-inflamatórias, as quais ativam a NADPH-oxidase, enzima importante na produção de compostos que desencadeiam

a peroxidação lipídica (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011; LAY et al., 2014; NIKKI, 2009). Esse resultado é semelhante ao encontrado nos estudos de Chielle et al. (2016) e Morais et al. (2016) que também evidenciaram concentrações elevadas de TBARS em pacientes obesos.

Em relação à atividade da enzima glutathiona peroxidase nos eritrócitos, pôde-se observar que as mulheres obesas apresentaram valores superiores àqueles do grupo controle, com diferença estatística significativa. Dados semelhantes foram encontrados no estudo de Codoñer-Franch et al. (2010) que também verificaram valores elevados da atividade da enzima nos eritrócitos em crianças obesas quando comparado ao grupo controle. Uma provável justificativa para tal resultado, é a existência de um mecanismo homeostático compensatório que pode ter priorizado a síntese dessa enzima em resposta ao aumento do estresse oxidativo presente nas mulheres obesas avaliadas (LUBOS; LOSCALZO; HANDY, 2011).

Associado a isso, o aumento da atividade da glutathiona peroxidase pode ter sido favorecido pelas concentrações adequadas de selênio nos eritrócitos, considerando que esses parâmetros apresentaram correlação positiva. Resultado semelhante foi observado no estudo realizado por Cominetti et al. (2012), que também verificaram correlação positiva entre o selênio eritrocitário e a atividade da glutathiona peroxidase eritrocitária.

Na perspectiva de obter melhor entendimento acerca da participação do selênio no controle do estresse oxidativo nas mulheres obesas, foi realizada uma análise de correlação entre os marcadores do estado nutricional relativo ao mineral e as concentrações plasmáticas de TBARS, na qual não foi verificado resultado significativo no grupo estudado. Entretanto, vale ressaltar o papel importante do selênio nas etapas de iniciação e propagação da peroxidação lipídica, por meio da inibição da formação de radicais hidroxila e na redução dos hidroperóxidos lipídicos, impedindo assim, a formação de produtos de maior reatividade e toxicidade (NIKI et al., 2005; SPICKETT et al., 2010).

Nessa discussão, alguns fatores podem ter contribuído para a ausência de correlação entre o selênio e TBARS, a exemplo da inespecificidade do marcador avaliado neste estudo e a provável participação de outros nutrientes antioxidantes com ação importante no controle da peroxidação lipídica, como  $\alpha$ -tocoferol, vitamina C, coenzima Q10 e  $\beta$ -caroteno (NIKI et al., 2005; NIKKI, 2009; NIKKI, 2014; SPICKETT et al., 2010).

Portanto, a partir dos resultados deste estudo, verifica-se concentrações reduzidas de selênio no plasma e maior *clearance* do mineral, demonstrando alteração do estado nutricional relativo ao selênio nas mulheres obesas. Entretanto, ressalta-se que as concentrações desse mineral mantidas adequadas nos eritrócitos pode justificar a atividade elevada da glutathione peroxidase, enzima importante para o controle do estresse oxidativo presente nas mulheres obesas avaliadas, o que mostra a importância do selênio como nutriente antioxidante.

Vale ressaltar que esse estudo possui algumas limitações que merecem ser elencadas. Assim, destaca-se que a determinação das concentrações plasmáticas das TBARS e da glutathione peroxidase como únicos marcadores do estresse oxidativo, que não permite uma discussão mais aprofundada. Outra limitação é a falta de biomarcadores mais específicos para avaliar o selênio, a exemplo da selenoproteína P e glutathione peroxidase 3.

Nessa perspectiva, diante da complexidade dos mecanismos envolvidos na participação do selênio no estresse oxidativo em pacientes obesos, torna-se evidente a necessidade da determinação de outros marcadores do estresse oxidativo e do estado nutricional relativo ao mineral, o que contribuirá para um melhor entendimento acerca do comportamento metabólico desse nutriente na patogênese da obesidade, bem como para propor intervenções que possam controlar distúrbios metabólicos, a exemplo do estresse oxidativo presente em indivíduos obesos.

## 7 CONCLUSÃO

- As mulheres obesas avaliadas nesse estudo possuem concentrações de selênio adequadas nos eritrócitos e reduzidas no plasma. Associado a isso, o estudo revela valores elevados do *clearance* desse mineral.
- As participantes do estudo ingerem quantidade de selênio acima do recomendado.
- A atividade da enzima glutathione peroxidase eritrocitária e as concentrações das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico estão elevadas nas mulheres obesas.
- O estudo evidencia a importância do papel do selênio como nutriente antioxidante por influenciar a atividade da enzima glutathione peroxidase nos eritrócitos em mulheres obesas.

## REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 19. ed., Washington DC, 2012, 1141p.

ALASFAR, F.; BEN-NAKHI, M.; KHOURSHEED, M.; KEHINDE, E.O.; ALSALEH, M. Selenium Is Significantly Depleted Among Morbidly Obese Female Patients Seeking Bariatric Surgery. **Obes Surg**, v.21, n. 11, p.1710–1713, 2011.

ALBUALI, W. H. Evaluation of oxidant-antioxidant status in overweight and morbidly obese Saudi children. **World J Clin Pediatr.**, v.3, n.1, p.6-13, 2014.

ALMONDES, K. G. S.; LEAL, G. V. S.; COZZOLINO, S. M. F.; PHILIPPI, S. T.; RONDÓ, P. H. C. O papel das selenoproteínas no câncer. **Rev Assoc Med Bras.**, v.56, n.4, p.484-8, 2010.

ANÇÃO, M. S. et al. **Programa de apoio à nutrição Nutwin**: versão 1.5. São Paulo: Departamento de Informática em Saúde, SPDM, Unifesp/EPM, 2002. 1 CD-ROM.

AZAB, S. F. A.; SALEH, S. H.; ELSAEED, W. F.; ELSHAFIE, M.A.; LAILA M SHERIEF, L. M.; ESH, A. M. H. Serum trace elements in obese Egyptian children: a case-control study. **Ital J Pediatr.** v. 20, n.40, p. 20, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Pesquisa com Seres Humanos. Resolução nº466, de 12 de dezembro de 2012. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2012.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Orientações para a coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde**: Norma Técnica do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional – SISVAN. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BELLINGER, F. P.; RAMAN, A. V.; REEVES, M. A.; BERRY, M. J. Regulation and function of selenoproteins in human disease. **Biochem J.**, v.422, n.1, p.11-22, 2009.

BELTOWSKI, J.; WÓJCICKA, G.; JAMROZ, A. Leptin decreases plasma paraoxonase 1 (PON1) activity and induces oxidative stress: the possible novel mechanism for proatherogenic effect of chronic hyperleptinemia. **Atherosclerosis.**, v.170, n.1, p.21-9, 2003.

BŁAŻEWICZ, A.; KLATKA, M.; ASTEL, A.; KORONA-GLOWNIAK, I.; DOLLIVER, W.; SZWERC, W.; KOCJAN, R. Serum and urinary selenium levels in obese children: a cross-sectional study. **J Trace Elem Med Biol.** v. 29, p. 116-22, 2015.

BŁAŻEWICZ, A.; KLATKA, M.; ASTEL, A.; PARTYKA, M.; KOCJAN, R. Differences in trace metal concentrations (Co, Cu, Fe, Mn, Zn, Cd, And Ni) in whole blood, plasma, and urine of obese and nonobese children. **Biol Trace Elem Res.** v. 155, n. 2, p. 190-200, 2013.



- BRANDES, R. P.; KREUZER, J. Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. **Cardiovasc Res.**, v.65, n.1, p.16-27, 2005.
- BRENNEISEN, P.; STEINBRENNER, H.; SIES, H. Selenium, oxidative stress, and health aspects. **Mol Aspects Med** v. 26, n. 4-5, p. 256-67, 2005.
- BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; MAIORINO, M. Glutathione peroxidases. **Biochim Biophys Acta.** v.1830, n.5, p.3289-303, 2013.
- BULTEAU, A. L.; CHAVATTE, L. Update on selenoprotein biosynthesis. **Antioxid Redox Signal.**, v.23, n.10, p.775-94, 2015.
- BURK, R. F.; HILL, K. E.; MOTLEY, A. K.; AUSTIN, L. M.; NORSWORTHY, B. K. Deletion of Selenoprotein P Upregulates Urinary Selenium Excretion and Depresses Whole-body Selenium Content. **Biochim Biophys Acta.**, v.1760, n.12, p.1789–1793, 2006.
- CHIELLE, E. O.; SOUZA, W. M.; SILVA, T. P.; MORESCO, R. N.; MORETTO, M. B. Adipocytokines, inflammatory and oxidative stress markers of clinical relevance altered in young overweight/obese subjects. **Clin Biochem.**, v.49, n.7-8, p.548-53, 2016.
- CLARKE, J. T. Colorimetric determination and distribution of urinary creatinine and creatine. **Clin Chem.**,v. 07, p. 271-83, 1961.
- CODOÑER-FRANCH, P.; VALLS-BELLÉS, V.; ARILLA-CODOÑER, A.; ALONSO-IGLESIAS, E. Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. **Transl Res.** v. 158, n. 6, p. 369-84, 2011.
- COMBS JR., G. F. Biomarkers of Selenium Status. **Nutrients**, v.7, n.4, p.2209-36, 2015.
- COMINETTI, C.; BORTOLI, M. C.; GARRIDO, A.B. J.; COZZOLINO, S. M. Brazilian nut consumption improves selenium status and glutathione peroxidase activity and reduces atherogenic risk in obese women. **Nutr Res.** v. 32, n. 6, p.403-7, 2012.
- COMINETTI, C.; BORTOLI, M. C.; PURGATTO, E.; ONG, T. P.; MORENO, F. S.; GARRIDO, A. B.; COZZOLINO, S. M. Associations between glutathione peroxidase-1 Pro198Leu polymorphism, selenium status, and DNA damage levels in obese women after consumption of Brazil nuts. **Nutrition** v. 27, n. 9, p. 891-6, 2011.
- COMINETTI, C.; BORTOLI, M. C.; ABDALLA, D. S. P.; COZZOLINO, S. M. F. Considerações sobre estresse oxidativo, selênio e nutrigenética. **Nutrire: Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.** v. 36, n. 3, p. 131-153, 2011.
- DAMMS-MACHADO, A.; WESER, G.; BISCHOFF, S. C. Micronutrient deficiency in obese subjects undergoing low calorie diet. **Nutr J.** v.1, n. 11, p. 34, 2012.
- DRISCOLL, D. M.; COPELAND, P. R. Mechanism and regulation of selenoprotein synthesis. **Annu Rev Nutr** v. 23, p. 17-40, 2003.

DUNTAS, L. H.; BENVENGA, S. Selenium: an element for life. **Endocrine.**, v.48, n.3,p.756-75, 2015.

EVENSON, J. K.; WHEELER, A. D.; BLAKE, S. M.; SUNDE, R. A. Selenoprotein mRNA is expressed in blood at levels comparable to major tissues in rats. **J Nutr.** v. 134, n. 10, p. 2640-5, 2004.

FAIRWEATHER-TAIT, S. J.; BAO, Y.; BROADLEY, M. R.; COLLINGS, R.; FORD, D.; HESKETH, J. E.; HURST, R. Selenium in human health and disease. **Antioxid Redox Signal.**, v. 14, n. 7, p. 1337-1383, 2011.

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, A.; MADRIGAL-SANTILLÁN, E.; BAUTISTA, M.; ESQUIVEL-SOTO, J.; MORALES-GONZÁLEZ, Á.; ESQUIVEL-CHIRINO, C.; DURANTE-MONTIEL, I.; SÁNCHEZ-RIVERA, G.; VALADEZ-VEGA, C.; MORALES-GONZÁLEZ, J. A. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. **Int. J. Mol. Sci.**, v.12, p.3117-32, 2011.

FERREIRA, K. S.; GOMES, J. C.; BELLATO, C. R.; JORDÃO, C. R. Concentrações de selênio em alimentos consumidos no Brasil. **Rev Panam Salud Publica**, v. 11, n. 3, p. 172-177, 2002.

FISBERG, R. M. et al. **Inquéritos alimentares: métodos e bases científicas.** São Paulo: Manole, 2005.

FORTUÑO, A.; BIDEGAIN, J.; BALTANÁS, A.; MORENO, M. U.; MONTERO, L.; LANDECHO, M. F.; BELOQUI, O.; DÍEZ, J.; ZALBA, G. Is leptin involved in phagocytic NADPH oxidase overactivity in obesity? Potential clinical implications. **J Hypertens.**, v.28, v.9, p.1944-50, 2010.

GALAN-CHILET, I.; TELLEZ-PLAZA, M.; GUALLAR, E.; MARCO, G.; LOPEZ-IZQUIERDO, R.; GONZALEZ-MANZANO, I.; CARMEN-TORMOS, M.; MARTIN-NUÑEZ, G. M.; ROJO-MARTINEZ, G.; SAEZ, G. T.; MARTÍN-ESCUADERO, J. C.; REDON, J.; JAVIER - CHAVES F. Plasma selenium levels and oxidative stress biomarkers: a gene-environment interaction population-based study. **Free Radic Biol Med.** v.74, p. 229-36, 2014.

GARCÍA, O. P.; LONG, K. Z.; ROSADO, J.L. Impact of micronutrient deficiencies on obesity. **Nutr Rev.** v. 67, n.10, p. 559-72, 2009.

GRIENDLING, K. K.; MINIERI, C. A.; OLLERENSHAW, J. D.; ALEXANDER, R. W. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. **Circ Res.**, v.74, n.6, p.1141-8, 1994.

HARRINGTON, J. M. et al. Analysis of human serum and whole blood for mineral content by ICP-MS and ICP-OES: development of a mineralomics method. **Biol Trace Elem Res.**, v. 160, n. 01, p. 132-42, 2014.

HELMERSSON, J.; ARNLÖV, J.; VESSBY, B.; LARSSON, A.; ALFTHAN, G.; BASU, S. Serum selenium predicts levels of F2-isoprostanes and prostaglandin F2alpha in a 27 year follow-up study of Swedish men. **Free Radic Res.** v. 39, n. 7, p. 763-70, 2005.

HESKETH, J. Nutrigenomics and selenium: gene expression patterns, physiological targets, and genetics. **Annu Rev Nutr.** v. 28, p. 157-77, 2008.

HURST, R.; COLLINGS, R.; HARVEY, L. J.; KING, M.; HOOPER, L.; BOUWMAN, J.; GURINOVIC, M.; FAIRWEATHER-TAIT, S. J. EURRECA-Estimating selenium requirements for deriving dietary reference values. **Crit Rev Food Sci Nutr.**, v.53, n.10, p.1077-96, 2013.

INOBUCHI, T.; LI, P.; UMEDA, F.; YU, H. Y.; KAKIMOTO, M.; IMAMURA, M.; AOKI, T.; ETOH, T.; HASHIMOTO, T.; NARUSE, M.; SANO, H.; UTSUMI, H.; NAWATA, H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. **Diabetes.**, v.49, n.11, p.1939-45, 2000.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009**: tabelas de composição nutricional dos alimentos consumidos no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2011a.

\_\_\_\_\_. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009**: tabela de medidas referidas para os alimentos consumidos no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2011b.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids.** Washington (DC): National Academy Press, 2000.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids.** Washington (DC): National Academy Press, 2005.

JAIME, P. C. et al. Comparative study among two methods for energy adjustment for nutrient intake. **Nutrire**, v. 26, p. 11-8, 2003.

KAIDAR-PERSON, O.; PERSON, B.; SZOMSTEIN, S.; ROSENTHAL, R. J. Nutritional deficiencies in morbidly obese patients: a new form of malnutrition? Part B: minerals. **Obes Surg.**, v. 18, n.8, p.1028-34, 2008.

KIM C. Y.; KIM, G. N.; WIACEK, J. L.; CHEN, C. Y.; KIM, K. H. Selenate inhibits adipogenesis through induction of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) signaling. **Biochem Biophys Res Commun** v. 26, n. 4, p. 551-7, 2012.

KIM, J. E.; CHOI, S. I.; LEE, H. R.; HWANG, I. S.; LEE, Y. J.; AN, B. S.; LEE, S. H.; KIM, H. J.; KANG, B. C.; HWANG, D. Y. Selenium significantly inhibits adipocyte

hypertrophy and abdominal fat accumulation in OLETF rats via induction of fatty acid  $\beta$ -oxidation. **Biol Trace Elem Res.** v.150, n.1-3, p. 360-370, 2012.

KIMMONS, J. E.; BLANCK, H. M.; TOHILL, B. C.; ZHANG, J.; KHAN, L. K. Associations between body mass index and the prevalence of low micronutrient levels among US adults. **Med Gen Med.** v. 8, n. 4, p. 59, 2006.

KRZYSZEK-KORPACKA, M.; PATRYN, E.; HOTOWY, K.; CZAPIŃSKA, E.; MAJDA, J.; KUSTRZEBA-WÓJCICKA, I.; NOCZYŃSKA, A.; GAMIAN, A. Paraoxonase (PON)-1 activity in overweight and obese children and adolescents: association with obesity-related inflammation and oxidative stress. **Adv Clin Exp Med.** v.22, n.2, p.229-36, 2013.

KURATA, A.; NISHIZAWA, H.; KIHARA, S.; MAEDA, N.; SONODA, M.; OKADA, T.; OHASHI, K.; HIBUSE, T.; FUJITA, K.; YASUI, A.; HIUGE, A.; KUMADA, M.; KURIYAMA, H.; SHIMOMURA, I.; FUNAHASHI, T. Blockade of Angiotensin II type-1 receptor reduces oxidative stress in adipose tissue and ameliorates adipocytokine dysregulation. **Kidney Int.**, v.70, n.10, p.1717-24, 2006.

KUROKAWA, S.; BERRY, M. J. Selenium. Role of the essential metalloid in health. **Met Ions Life Sci.**, v.13, p.499-534, 2013.

LABUNSKYY, V. M.; HATFIELD, D. L.; GLADYSHEV, V. N. Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. **Physiol Rev.**, v. 94, 2014.

LAY, S. L.; SIMARD, G.; MARTINEZ, M. C.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Oxidative stress and metabolic pathologies: from an adipocentric point of view. **Oxid Med Cell Longev.**, v.2014, p.1-18, 2014.

LEI, X. G.; EVENSON, J. K.; THOMPSON, K. M.; SUNDE, R. A. Glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase are differentially regulated in rats by dietary selenium. **J Nutr.** v. 125, n. 6, p. 1438-46, 1995.

LUBOS, E.; LOSCALZO, J.; HANDY, D. Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. **Antioxid Redox Signal.** v.15, n. 7, p.1957-1997, 2011.

MADAN, A. K.; ORTH, W. S.; TICHANSKY, D. S.; TERNOVITS, C. A. Vitamin and trace mineral levels after laparoscopic gastric bypass. **Obes Surg.** v. 16, n. 5, p. 603-6, 2006.

MANNA, P.; JAIN, S. K. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. **Metab Syndr Relat Disord.**, v.13, n.10, p.423-44, 2015.

MARANHÃO, P. A., KRAEMER-AGUIAR, L.G.; OLIVEIRA, C. L.; KUSCHNIR, M. C.; VIEIRA, Y. R.; SOUZA, M. G.; KOURY, J. C.; BOUSKELA, E. Brazil nuts intake improves lipid profile, oxidative stress and microvascular function in obese adolescents: a randomized controlled trial. **Nutr Metab**, v.8, n.1, p.32, 2011.

MARTITZ, J.; BECKER, N. P.; RENKO, K.; STOEDTER, M.; HYBSIER, S.; SCHOMBURG, L. Gene-specific regulation of hepatic selenoprotein expression by interleukin-6. **Metallomics**. v. 7, n. 11, p. 1515-21, 2015.

MEHDI, Y.; HORNICK, J. L.; ISTASSE, L.; DUFRASNE, I. Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. **Molecules**, v.18, n.3, p.3292-311, 2013.

MICKIEWICZ, B.; VILLEMAIRE, M. L.; SANDERCOCK, L. E.; JIRIK, F. R.; VOGEL, H. J. Metabolic changes associated with selenium deficiency in mice. **Biometals**. v. 6, p. 1137-47, 2014.

MOLLNAU, H.; WENDT, M.; SZÖCS, K.; LASSÈGUE, B.; SCHULZ, E.; OELZE, M.; LI, H.; BODENSCHATZ, M.; AUGUST, M.; KLESCHYOV, A.L.; TSILIMINGAS, N.; WALTER, U.; FÖRSTERMANN, U.; MEINERTZ, T.; GRIENDLING, K.; MÜNDEL, T. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. **Circ Res.**, v.90, n.4, p. E58-65, 2002.

MONTEIRO, R.; AZEVEDO, I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. **Mediators Inflamm.**, v. 2010, p.289645, 2010.

MORAIS, J. B. S.; SEVERO, J. S.; OLIVEIRA, A. R. S.; CRUZ, K. J. C.; DIAS, T. M. S.; ASSIS, R. C.; COLLI, C.; MARREIRO, D. N. Magnesium Status and Its Association with Oxidative Stress in Obese Women. **Biol Trace Elem Res**. p. 1-6, 2016.

MURER, S.B.; AEBERLI, I.; BRAEGGER, C. P.; GITTERMANN, M.; HERSBERGER, M.; LEONARD, S. W.; TAYLOR, A. W.; TRABER, M. G.; ZIMMERMANN, M. B. Antioxidant supplements reduced oxidative stress and stabilized liver function tests but did not reduce inflammation in a randomized controlled trial in obese children and adolescents. **J Nutr**. v. 144, n. 2, p. 193-201, 2013.

NAVARRO-ALARCON, M.; CABRERA-VIQUE, C. Selenium in food and the human body: a review. **Sci Total Environ.**, v.400, n.1-3, p.115-41, 2008.

NIEDZIELSKI, P.; SIEPAK, M. Analytical methods for determining arsenic, antimony and selenium in environmental samples. **Pol J Environ Stud.**, v. 12, n. 06, p. 653-67, 2003.

NIKI, E. Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. **Biochim Biophys Acta**. v.1840, n. 2, p. 809-17, 2014.

NIKI, E.; YOSHIDA, Y.; SAITO, Y.; NOGUCHI, N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochem Biophys Res Commun**. v.338, p. 668-676, 2005.

NIKI, E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. **Free Radic. Biol. Med**. v.47, p.469-484, 2009.

NORRIS, A. L.; STEINBERGER, J.; STEFFEN, L. M.; METZIG, A. M.; SCHWARZENBERG, S. J.; KELLY, A. S. Circulating oxidized LDL and inflammation in extreme pediatric obesity. **Obesity**, v.19, n. 7, p.1415-9, 2011.

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

OLUSI, S. O. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. **Int J Obes Relat Metab Disord.**, v.26, n.9, p.1159-64, 2002.

OTTAVIANO, F. G.; HANDY, D. E.; LOSCALZO, J. Redox regulation in the extracellular environment. **Circ J.** v.72, n. 1, p. :1-16, 2008.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **J Lab & Clin Med**, v. 70, n.1, p. 159-69, 1967.

PANDEY, G.; SHIHABUDEEN, M. S.; DAVID, H. P.; THIRUMURUGAN, E.; THIRUMURUGAN, K. Association between hyperleptinemia and oxidative stress in obese diabetic subjects. **J Diabetes Metab Disord.**, v.14, n.24, 2015.

PAPAMARGARITIS, D.; AASHEIM, E. T.; SAMPSON, B.; ROUX, C. W. Copper, selenium and zinc levels after bariatric surgery in patients recommended to take multivitamin-mineral supplementation. **J Trace Elem Med Biol** v. 31, p. 167-72, 2015.

PAPP, L. V.; LU, J.; HOLMGREN, A.; KHANNA, K. K. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. **Antioxid Redox Signal.** v. 9, n. 7, p. 775-806, 2007.

PINHEIRO, A. B. V. et al. **Tabela para Avaliação de Consumo Alimentar em Medidas Caseiras**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2009.

RAYMAN, M. P.; INFANTE, H. G.; SARGENT, M. Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. **Br J Nutr.**, v. 100, p. 238–253, 2008.

RAYMAN, M. P. Selenium and human health. **Lancet.**, v.379, n.9822, p.1256-68, 2012.

REITMAN, A.; FRIEDRICH, I.; BEN-AMOTZ, A.; LEVY, Y. Low plasma antioxidants and normal plasma B vitamins and homocysteine in patients with severe obesity. **Isr Med Assoc J.**, v.4, n.8, p.590-3, 2002.

RESZKA, E.; JABLONSKA, E.; GROMADZINSKA, J.; WASOWICZ, W. Relevance of selenoprotein transcripts for selenium status in humans. **Genes Nutr.**, v.7, n.2, p.127-37, 2012.

ROBINSON, J. R. et al. Long-term supplementation with selenate and selenomethionine: urinary excretion by New Zealand women. **Br J Nutr.**, v. 77, n. 04, p. 551-63, 1997.

ROBINSON, J. R. et al. Urinary excretion of selenium by New Zealand and North American human subjects on differing intakes. **Am J Clin Nutr.**, v. 41, n. 05, p. 1023-31, 1985.

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

SAVINI, I.; CATANI, M. V.; EVANGELISTA, D.; GASPERI, V.; AVIGLIANO, L. Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state. **Int J Mol Sci.** v.14, n. 5, p. 10497-538, 2013.

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

SCHWEIZER, U.; DEHINA, N.; SCHOMBURG, L. Disorders of selenium metabolism and selenoprotein function. **Curr Opin Pediatr.** v. 23, n. 4, p. 429-35, 2011.

SLATER, B.; MARCHIONI, D. L.; FISBERG, R. M. Estimando a prevalência da ingestão inadequada de nutrientes. **Rev Saúde Pública,** v. 38, n. 04, p. 599-605, 2004.

SPICKETT, C. M.; WISWEDEL, I.; SIEMS, W., ZARKOVIC, K.; ZARKOVIC, N. Advances in methods for the determination of biologically relevant lipid peroxidation products. **Free Radical Res.** v.44, n.10, p.1172–1202, 2010.

STEFANOWICZ, F. A.; TALWAR, D.; O'REILLY, D. S.; DICKINSON, N.; ATKINSON, J.; HURSTHOUSE, A. S.; RANKIN, J.; DUNCAN, A. Erythrocyte selenium concentration as a marker of selenium status. **Clin Nutr.**, v.32, n.5, p.837-42, 2013.

STEINBRENNER, H.; SPECKMANN, B.; KLOTZ, L. O. Selenoproteins: Antioxidant selenoenzymes and beyond. **Arch Biochem Biophys.** v. 595, p. 113-9, 2016.

TACO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos.** 4. ed. Campinas, SP: NEPA-UNICAMP, 2011.

TASCILAR, M. E.; OZGEN, I. T.; ABACI, A.; SERDAR, M.; AYKUT, O. Trace elements in obese Turkish children. **Biol Trace Elem Res.** v. 143, n. 1, p. 188-95, 2011.

THIRY, C.; SCHNEIDER, Y. J.; PUSSEMIER, L.; DE TEMMERMAN, L.; RUTTENS, A. Selenium bioaccessibility and bioavailability in Se-enriched food supplements. **Biol Trace Elem Res.**, v.152, n.1, p.152-60, 2013.

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

TOUAT- HAMICI, Z.; LEGRAIN, Y.; BULTEAU, A. L.; CHAVATTE, L. Selective up-regulation of human selenoproteins in response to oxidative stress. **J Biol Chem** v. 289, n. 21, p. 14750-6, 2014.

USDA (Department of Agriculture). **National Nutrient Database for Standard Reference**: selenium (release 28). 2015.

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

VASCONCELOS, S. M. L. GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; BENFATO, V. M. M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007

VINCENT, H. K.; TAYLOR, A. G. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. **Int J Obes.**, v.30, n.3, p.400-18, 2006.

VITOUX, D.; ARNAUD, J.; CHAPPUIS, P. Are copper, zinc and selenium in erythrocytes valuable biological indexes of nutrition and pathology? **J Trace Elem Med Biol.**, v.13, n.3, p.113-28, 1999.

WANG, Y.; GAO, X.; PEDRAM, P.; SHAHIDI, M.; DU, J.; YI, Y.; GULLIVER, W. ZHANG, H.; SUN, G. Significant Beneficial Association of High Dietary Selenium Intake with Reduced Body Fat in the CODING Study. **Nutrients** v. 8, n. 1, pii: E24, 2016.

WAROLIN, J.; COENEN, K. R.; KANTOR, J. L.; WHITAKER, L. E.; WANG, L.; ACRA, S. A.; ROBERTS, L.; BUCHOWSKI, M. S. The relationship of oxidative stress, adiposity and metabolic risk factors in healthy Black and White American youth. **Pediatr Obes.** v. 9, n. 1, p. 43-52, 2014.

WEEKS, B. S.; HANNA, M. S.; COOPERSTEIN, D. Dietary selenium and selenoprotein function. **Med Sci Monit.** v. 18, n. 8, p. 127-132, 2012.

WHITEHOUSE, R. C. et al. Zinc in plasma, neutrophils, lymphocytes, and erythrocytes as determined by flameless atomic absorption spectrophotometry. **Clin Chem.**, v. 28, n. 03, p. 475-80, 1982.

WHO (World Health Organization). **Obesity**: preventing and managing the global epidemic – report of a WHO consultation. Geneva: World Health Organization, 2000.

WILLETT, W. C.; HOWE, G. R.; KUSHI, L. H. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. **Am J Clin Nutr.**, v. 65, suppl. 4, p.1220-8, 1997.



WILLETT, W.; STAMPFER, M. J. Total energy intake: implications for epidemiologic analyses. **Am J Epidemiol.**, v. 124, n. 01, p. 17-27, 1986.

ZAKI, M. E.; EL-BASSYOUNI, H.; KAMAL, S.; EL-GAMMAL, M.; YOUNESS, E. Association of serum paraoxonase enzyme activity and oxidative stress markers with dyslipidemia in obese adolescents. **Indian J Endocrinol Metab.**, v.18, n.3, p.340-4, 2014.

ZHANG, Q.; CHEN, L.; GUO, K.; ZHENG, L.; LIU, B.; YU, W.; GUO, C.; LIU, Z.; CHEN, Y.; TANG Z. Effects of different selenium levels on gene expression of a subset of selenoproteins and antioxidative capacity in mice. **Biol Trace Elem Res.** v.154, n. 2, p. 255-61, 2013.

ZHANG, H.; PARK, Y.; WU, J.; CHEN, X. P.; LEE, S.; YANG, J.; DELLSPERGER, K. C.; ZHANG, C. Role of TNF-alpha in vascular dysfunction. **Clin Sci.**, v.116, n.3, p.219-30, 2009.

ZHU, Y. G.; ZHANG, S. M.; WANG, J. Y.; XIAO, W. Q.; WANG, X. Y.; ZHOU, J. F. Overweight and obesity-induced oxidative stress in children. **Biomed Environ Sci.**, v.19, n.5, p.353-9, 2006.

**APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Campus Universitário Ministro Petrônio Portella - Bairro Ininga – Teresina/PI  
CEP: 64049-550 - Fone (86) 3237-2062

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Título do projeto:** Influência dos minerais na disfunção dos hormônios da tireoide e sua relação com marcadores de inflamação e do estresse oxidativo em mulheres obesas.

**Pesquisador responsável:** Dra. Dilina do Nascimento Marreiro

**Instituição/Departamento:** UFPI/Departamento de Nutrição

**Pesquisadores participantes:** Dra. Dilina do Nascimento Marreiro, Mayara Monte Feitosa, Larissa Cristina Fontenelle.

**Telefone para contato (inclusive a cobrar):** (086) 9806-0385/ (86) 8853-6054

Você está sendo convidada para participar, como voluntária, em uma pesquisa. Você precisa decidir se quer participar ou não. Por favor, não se apresse em tomar a decisão. Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pelo estudo sobre qualquer dúvida que tiver. Este estudo será conduzido pelas Mestrandas Mayara Monte Feitosa e Larissa Cristina Fontenelle, sob orientação da Profa. Dra. Dilina do Nascimento Marreiro. Após ser esclarecida sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine este documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, você não será penalizada. Em caso de dúvida, você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí pelo telefone (086) 3215 5437.

## DESCRIÇÃO DA PESQUISA

Esta pesquisa tem por objetivo avaliar a “Influência dos minerais na disfunção dos hormônios da tireoide e sua relação com marcadores de inflamação e do estresse oxidativo em mulheres obesas”. Para tanto, a voluntária será submetida à coleta de sangue venoso para análise do selênio, determinação de citocinas inflamatórias, marcador do estresse oxidativo, enzimas antioxidantes e concentrações dos hormônios da tireoide, à coleta de urina para determinação de zinco e selênio urinário e, além disso, será determinado o consumo alimentar por meio de registros alimentares. Não será realizada entrevista gravada ou filmada.

Ao participar da pesquisa, a voluntária não sofrerá nenhum prejuízo; no entanto, poderá sentir leve desconforto em vista da coleta do material biológico, requerido para realização desta pesquisa. As participantes do estudo terão como benefícios os resultados dos exames bioquímicos das amostras de sangue e de urina, que serão fornecidos após a realização dos mesmos, e orientação nutricional.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Piauí (Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; telefone: (86) 3215-5734; fax (86) 3215-5560).

Se você concordar em participar do estudo, seu nome e identidade serão mantidos em sigilo. A menos que requerido por lei ou por sua solicitação, somente o pesquisador, a equipe do estudo, Comitê de Ética independente e inspetores de agências regulamentadoras do governo (quando necessário) terão acesso a suas informações para verificar as informações do estudo. O projeto terá duração de dois anos, com término previsto para o segundo semestre de 2015.

Nomes e assinaturas dos pesquisadores

Mayara Monte Feitosa / Larissa Cristina Fontenelle

Profa. Dra. Dilina do Nascimento Marreiro

## CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar do estudo “Influência dos minerais na disfunção dos hormônios da tireoide e sua relação com marcadores de inflamação e do estresse oxidativo em mulheres obesas”, como sujeito. Tive pleno conhecimento das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo. Discuti com as mestrandas Mayara Monte Feitosa e/ ou Larissa Cristina Fontenelle sobre a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais serão os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo, voluntariamente, em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo. A retirada do consentimento ao estudo não acarretará penalidades ou prejuízos.

Teresina  
\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

**Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.**

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Observações complementares** \_\_\_\_\_

**APÊNDICE B - FICHA DE CADASTRO DAS PARTICIPANTES DA PESQUISA**

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA  
 UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
 PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
 Campus Universitário Ministro Petrônio Portella - Bairro Ininga – Teresina/PI  
 CEP: 64049-550 - Fone (86) 3237-2062

**1. IDENTIFICAÇÃO**

Nº Formulário: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

DN: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_ anos

Endereço: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_ Celular 1: \_\_\_\_\_ Celular 2: \_\_\_\_\_

Escolaridade: \_\_\_\_\_ Ocupação: \_\_\_\_\_

Renda familiar: \_\_\_\_\_

Número de pessoas em casa: \_\_\_\_\_

**2. HISTÓRIA CLÍNICA**

a) Fumantes: Sim ( ) Não ( ) b) Uso de medicamentos: Sim ( ) Não ( ) Quais?

b) Consumo de Bebidas alcoólicas: Sim ( ) Não ( ) Frequência?

c) Uso de Suplementos: Sim ( ) Não ( ) Quais?

d) Presença de doenças: Sim ( ) Não ( ) Qual ?

Insuficiência Renal Crônica ( ) Diabetes ( ) Doença Hepática ( )

Outras: \_\_\_\_\_

e) Faz tratamento para perder peso: Sim ( ) Não ( )

### 3. PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS

Peso (kg)	Estatura (cm)	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Circunferência da Cintura (cm)	Estado Nutricional

### 4. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Selênio Plasmático (mmol/L)		Glutathione Peroxidase (U/gHb)	
Selênio Eritrocitário (μgSe/gHb)		Volume Urinário (mL)	
Selênio Urinário (μgSe/g creatinina)		Creatinina urinária (mg/24h)	
TBARS (nmol/mL)			

## APÊNDICE C- REGISTRO ALIMENTAR

### Registro diário de sua alimentação



Nº Formulário: \_\_\_\_\_

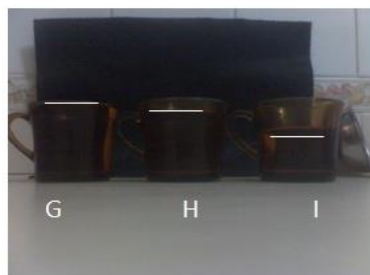
- ❖ Nós vamos avaliar sua alimentação. Pedimos que anote neste registro alimentar tudo que você comer e beber durante todo o dia e à noite. Você deverá anotar todos os alimentos consumidos, sendo 2 dias durante a semana e um dia no final de semana, totalizando 3 dias.
- ❖ Durante o preenchimento deste registro alimentar, alguns aspectos são importantes:
  1. Preencher logo após o consumo do alimento;
  2. Especificar as marcas dos alimentos industrializados;
  3. Procurar identificar o tamanho das frutas, vegetais, pedaços de carne, ou a quantidade que cada alimento é consumido, bem como o tipo de preparação (frito, cozido, assado) e caso haja molho, que tipo foi utilizado.
  4. Diferenciar qual o utensílio é usado, por exemplo:
    1. Colher – de chá, de sobremesa, de sopa, de servir ou concha
    2. Xícara – de chá ou de café
    3. Copo – grande ou de requeijão (americano)
    4. Prato de sobremesa
  5. Consumo mensal de óleo e sal da família: \_\_\_\_\_



**A:** Colher de servir; **B:** Colher de sopa; **C:** Colher de sobremesa; **D:** Colher de chá; **E:** Concha de servir **F:** Prato de sobremesa



Copo americano



**G:** Xícara cheia; **H:** Xícara nivelada; **I:** Xícara média





## **APÊNDICE D – INSTRUÇÕES ÀS PARTICIPANTES QUANTO À OBTENÇÃO DE URINA DE 24 HORAS**

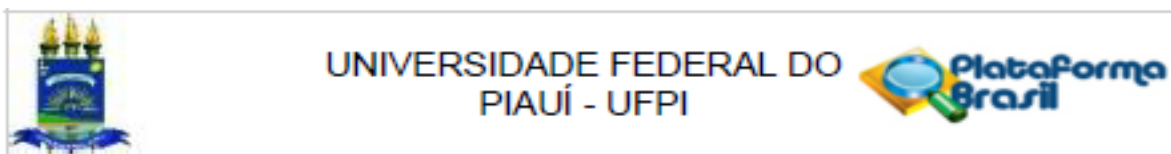
A obtenção da urina será realizada em frasco plástico de 02 litros, previamente desmineralizado, sem conservante e deve ser mantida REFRIGERADA até o horário da entrega.

A urina deverá ser obtida da seguinte forma: pela manhã, ao acordar o paciente irá desprezar a primeira urina, ou seja, não deverá guardá-la no frasco; a partir da segunda urina todas deverão ser guardadas no frasco até a primeira urina do dia seguinte, mantendo o frasco contendo a urina sempre refrigerado.

**ATENÇÃO:** Não é necessário lavar o frasco. Colete a urina diretamente no frasco. Não utilize outros recipientes para a coleta da urina, pois isso irá interferir nos resultados.

**ATENÇÃO: Todo o material será fornecido pelo pesquisador.**

## ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA/UFPI



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Influência de minerais na disfunção dos hormônios da tireoide e sua relação com marcadores de inflamação e do estresse oxidativo em mulheres obesas

**Pesquisador:** Dilina do Nascimento Marreiro

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 31879614.5.0000.5214

**Instituição Proponente:** Universidade Federal do Piauí - UFPI

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 894.181

**Data da Relatoria:** 21/12/2014

#### Apresentação do Projeto:

Estudo caso-controle a ser desenvolvido com 80 mulheres obesas, na faixa etária entre 18 e 50 anos de idade, atendidas em um centro de saúde da rede estadual, Teresina/PI. Simultaneamente, serão coletados dados de mulheres eutróficas, sem diagnóstico de obesidade, com características semelhantes ao grupo caso em relação à idade, gênero e situação socioeconômica, as quais constituirão o grupo controle.

#### Objetivo da Pesquisa:

##### Objetivo Primário:

Avaliar a influência de minerais na disfunção dos hormônios da tireoide e sua relação com marcadores de inflamação e do estresse oxidativo em mulheres obesas.

##### Objetivo Secundário:

Determinar as concentrações de zinco e selênio plasmático, eritrocitário e urinário nas participantes do estudo e comparar com o grupo controle; Analisar o consumo alimentar e adequação da dieta em relação à macronutrientes, zinco e selênio;

Determinar as concentrações dos hormônios da tireoide nas participantes do estudo; Determinar as concentrações séricas das citocinas IL-1, IL-6, IL-10, TNF- do hormônio leptina; Determinar as

**Endereço:** Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa  
**Bairro:** Ininga **CEP:** 64.049-550  
**UF:** PI **Município:** TERESINA  
**Telefone:** (86)3237-2332 **Fax:** (86)3237-2332 **E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PIAUÍ - UFPI



Continuação do Parecer: 894.181

concentrações plasmáticas do malondialdeído, marcador do estresse oxidativo e a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e glutatona peroxidase; Investigar a existência de correlação entre os parâmetros bioquímicos do zinco e selênio, as concentrações dos hormônios da tireoide, as concentrações séricas de citocinas e leptina e as concentrações plasmáticas de malondialdeído em mulheres obesas.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

"Ao participar da pesquisa, a voluntária não sofrerá nenhum prejuízo; no entanto, poderá sentir leve desconforto em vista da coleta do material biológico, requerido para realização desta pesquisa. Espera-se, por meio desta pesquisa, conhecer o estado nutricional relativo ao zinco e selênio em mulheres obesas e identificar a possível influência destes minerais nos distúrbios dos hormônios da tireoide, e sua relação com marcadores de inflamação e do estresse oxidativo em mulheres obesas. Associado a isso, pretende-se, ainda, a partir dos dados obtidos, propor intervenções que possam auxiliar na melhora da qualidade de vida da população obesa, além de divulgar os resultados desta pesquisa em revistas indexadas e em eventos científicos."

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Considerando a disfunção dos hormônios da tireoide envolvida na fisiopatologia da obesidade, contribuindo para o estresse oxidativo e a inflamação crônica de baixo grau, bem como a importância da deficiência de zinco e selênio nesses distúrbios, torna-se evidente a necessidade da realização de pesquisas para melhor esclarecer o papel desses minerais na manifestação da disfunção dos hormônios da tireoide, presentes em pacientes obesos, o que certamente contribuirá para definir estratégias de intervenção terapêutica no controle metabólico desse distúrbio nessa doença.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos foram apresentados corretamente.

**Recomendações:**

Sem recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto se encontra apto para aprovação.

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa  
 Bairro: Ininga CEP: 64.049-550  
 UF: PI Município: TERESINA  
 Telefone: (86)3237-2332 Fax: (86)3237-2332 E-mail: cep.ufpi@ufpi.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PIAÚÍ - UFPI



Continuação do Parecer: 804.181

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Sr.(a) Pesquisador(a),

em cumprimento ao previsto na Resolução 466/12, o CEP-UFPI aguarda o envio dos relatórios parciais e final da pesquisa, elaborados pelo pesquisador, bem como informações sobre sua eventual interrupção e sobre ocorrência de eventos adversos.

Ainda, para assegurar o direito do participante e preservar o pesquisador, revela-se importante alertar que o TCLE e o Termo de Assentimento deverão ser rubricados em todas as suas folhas, tanto pelo participante quanto pelo(s) pesquisador(es), devendo ser assinados na última folha.

## ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA / HOSPITAL GETÚLIO VARGAS

HOSPITAL GETÚLIO VARGAS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Influência de minerais na disfunção dos hormônios da tireoide e sua relação com marcadores de inflamação e do estresse oxidativo em mulheres obesas

**Pesquisador:** Dilina do Nascimento Marreiro

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 31879614.5.3001.5613

**Instituição Proponente:** Universidade Federal do Piauí - UFPI

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 933.363

**Data da Relatoria:** 10/12/2014

#### Apresentação do Projeto:

A pesquisa será desenvolvida em estudo caso-controle a ser desenvolvido com 85 mulheres obesas pré-menopausadas, na faixa etária entre 18 e 50 anos de idade, atendidas em um centro de saúde da rede estadual, Teresina/PI. Simultaneamente, serão coletados dados de mulheres eutróficas, sem diagnóstico de obesidade, com características semelhantes ao grupo caso em relação à idade, gênero e situação socioeconômica, as quais constituirão o grupo controle. As voluntárias serão recrutadas da demanda espontânea de um centro de saúde estadual. O tamanho da amostra poderá ser modificado após realização do cálculo amostral pelo setor de estatística da Universidade Federal do Piauí.

As obesas participantes do estudo serão selecionadas por meio de entrevista.

A coleta será realizada de janeiro a julho de 2015.

Ao participar da pesquisa, a voluntária não sofrerá nenhum prejuízo; no entanto, poderá sentir leve desconforto em vista da coleta do material biológico, requerido para realização desta pesquisa. Alguns procedimentos deverão realizar-se junto à Universidade Federal do Piauí, cabendo à voluntária e/ou responsável comparecer à mesma quando for solicitada, em dia e hora a serem estabelecidos de acordo com a disponibilidade de ambas as partes (pesquisador e voluntária).

**Endereço:** FREI SERAFIM, 2352

**Bairro:** CENTRO

**CEP:** 64.001-020

**UF:** PI

**Município:** TERESINA

**Telefone:** (86)3221-5704

**E-mail:** c.arquimedes@uol.com.br

HOSPITAL GETÚLIO VARGAS



Continuação do Parecer: 933.363

As participantes do estudo terão como benefícios os resultados dos exames bioquímicos das amostras de sangue e de urina, que serão fornecidos após a realização dos mesmos, e orientação nutricional.

Em qualquer etapa do estudo, as voluntárias terão acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

**Objetivo da Pesquisa:**

Esta pesquisa tem por objetivo avaliar a "Influência dos minerais na disfunção dos hormônios da tireoide e sua relação com marcadores de inflamação e do estresse oxidativo em mulheres obesas".

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

A possível dificuldade para a execução desta pesquisa envolve a baixa adesão das mulheres obesas a participar do estudo. Entretanto, considerando a experiência dos pesquisadores envolvidos no projeto, tal dificuldade não tornará inviável a execução do mesmo dentro do cronograma estabelecido. Associado a isso, a pesquisa não traz nenhum risco aos participantes.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Por meio desta pesquisa, será possível conhecer o estado nutricional relativo ao zinco e selênio em mulheres obesas e identificar a possível influência destes minerais nos distúrbios dos hormônios da tireoide, e sua relação com marcadores de inflamação e do estresse oxidativo em mulheres obesas. Também pretende-se, ainda, a partir dos dados obtidos, propor intervenções que possam auxiliar na melhora da qualidade de vida da população obesa, além de divulgar os resultados desta pesquisa em revistas indexadas e em eventos científicos.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O projeto apresenta todos os documentos conforme a resolução 466/2012 do CNS.

**Recomendações:**

Sem recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto encontra-se aprovado por atender todas as recomendações da resolução 466/2012 do CNS.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Endereço: FREI SERAFIM, 2352

Bairro: CENTRO

CEP: 64.001-020

UF: PI Município: TERESINA

Telefone: (86)3221-5704

E-mail: c.arquimedes@uoi.com.br



HOSPITAL GETÚLIO VARGAS



Continuação do Parecer: 033.363

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

parecer aprovado de acordo com a resolução 466/2012.