

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

Karen Lilian Schott

**DESBALANÇO SUPERÓXIDO-PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO *VERSUS*
SELENO-L-METIONINA E CASTANHA-DO-BRASIL: REGULAÇÃO
DIFERENCIAL *IN VITRO* DE (SELENO)ENZIMAS**

**Santa Maria, RS
2017**

Karen Lilian Schott

**DESBALANÇO SUPERÓXIDO-PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO *VERSUS*
SELENO-L-METIONINA E CASTANHA-DO-BRASIL: REGULAÇÃO DIFERENCIAL
IN VITRO DE (SELENO)ENZIMAS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica (PPGBTOX), Área de Ciências Naturais e Exatas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM/RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**.

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Santa Maria, RS
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Schott, Karen Lilian
DESBALANÇO SUPERÓXIDO-PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO VERSUS
SELENO-L-METIONINA E CASTANHA-DO-BRASIL: REGULAÇÃO
DIFERENCIAL IN VITRO DE (SELENO)ENZIMAS / Karen Lilian
Schott.- 2017.

111 f.; 30 cm

Orientadora: Ivana Beatrice Mânica da Cruz
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, RS, 2017

1. Polimorfismo Vall6Ala-MnSOD 2. Selênio 3. GPx-1 4.
TrxR 5. Nutrigenômica. Nutrigenética I. Cruz, Ivana
Beatrice Mânica da II. Título.

© 2017

Todos os direitos autorais reservados a Karen Lilian Schott. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: kschott9.ks@gmail.com

Karen Lilian Schott

**DESBALANÇO SUPERÓXIDO-PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO VERSUS SELENO-
L-METIONINA E CASTANHA-DO-BRASIL:
REGULAÇÃO DIFERENCIAL *IN VITRO* DE (SELENO) ENZIMAS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica (PPGBTOX), Área de Ciências Naturais e Exatas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM/RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**.

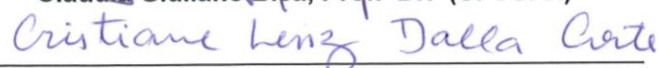
Aprovado em 01 de agosto de 2017:



Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Prof.^a Dr.^a (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Claudia Giuliano Bica, Prof.^a Dr.^a (UFCSPA)



Cristiane Lenz Dalla Corte, Prof.^a Dr.^a (UNIPAMPA)



Maria Rosa Chitolina Schetinger, Prof.^a Dr.^a (UFSM)



Michele Rorato Sagrillo, Prof.^a Dr.^a (UNIFRA)

Santa Maria, RS
2017

DEDICATÓRIA

Para o Kael

Que com sua alegria de viver sempre me incentivou...

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho ocorreu, principalmente, pelo auxílio, compreensão e dedicação de várias pessoas. Agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para a conclusão deste estudo e, de uma maneira especial agradeço:

- à Deus;
 - à minha orientadora Ivana Beatrice Mânica da Cruz que me apoiou em momentos difíceis durante o percurso e me ensinou mais do que a Ciência alcança;
 - ao meu filho Kael Schott Rigon, por significar amor e luz na minha vida;
 - ao meu pai Roberto Schott (*in memoriam*) e à minha mãe Leone Zenir Antonini Schott que me ensinaram a ter coragem para os enfrentamentos da vida com dedicação e desvelo. Aos meus irmãos Roberto Marion Schott e Josias Michel Schott, pelo exemplo de força e motivação. À tia Sali Wanir Antonini que em todos os momentos esteve presente para o apoio e fortalecimento. À Gabriela Bisognin, por sua amizade sincera;
 - aos colegas Alencar Kolinski Machado, Beatriz da Silva Bonadiman, Cibele Ferreira Teixeira, Fernanda Barbisan, Francine Cadoná, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte e Verônica Farina Azzolin que foram fundamentais para a realização deste trabalho;
 - ao Charles Elias Assmann, por ter me acompanhado até este momento com comprometimento, dedicação e amizade;
 - aos colegas Audrei de Oliveira Alves, Clarice Pinheiro Mostardeiro (*in memoriam*), Eduardo Bortoluzzi Dornelles, Grazielle Castagna Cezimbra Weiss, Michele Lamberti Jobim e Thaís Doeler Algarve, pelo companheirismo e amizade;
 - ao Dr. Euler Ribeiro e à sua equipe da Universidade Aberta da Terceira Idade da Universidade do Estado do Amazonas, pelo apoio recebido;
- Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, pela formação e ensino;
- à Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), por ser uma referência de qualidade e excelência em formação;
 - à CAPES, pela bolsa concedida;
- Enfim, a todos àqueles que fizeram parte da minha história de vida e que me auxiliaram a chegar até aqui.

RESUMO

DESBALANÇO SUPERÓXIDO-PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO *VERSUS* SELENO-L-METIONINA E CASTANHA-DO-BRASIL: REGULAÇÃO DIFERENCIAL *IN VITRO* DE (SELENO)ENZIMAS

AUTORA: Karen Lilian Schott
ORIENTADORA: Ivana Beatrice Mânica da Cruz

As reações enzimáticas acopladas entre as enzimas superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD/SOD2) e a selenoenzima glutationa peroxidase-1 (GPx-1) são essenciais para o equilíbrio redox mitocondrial em células aeróbias. A SOD2 dismuta o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), oriundo da respiração celular, à peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que é reduzido à água e oxigênio molecular pela GPx-1. $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 são espécies reativas de oxigênio (EROs), em baixas concentrações, são sinalizadores endógenos essenciais para a manutenção da homeostasia do organismo. No entanto, no polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) do gene codificador da SOD2 (Val16Ala-SOD2), a enzima SOD2 é 30-40% mais eficiente no genótipo AA em relação ao VV selvagem, o que resulta em desbalanço superóxido (S)-peróxido de hidrogênio (PH) associado ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis. O genótipo o VV tem sido associado às doenças cardiometabólicas e ao câncer de mama metastático e o genótipo AA tem sido relacionado ao aumento do risco de câncer de mama, próstata e colorretal, sugerindo que o excesso de H_2O_2 produzido suplanta a capacidade antioxidante da GPx-1. Adicionalmente, estudo prévio mostrou que o risco de câncer de mama diminuiu expressivamente em mulheres portadoras do genótipo AA que relataram dieta rica em frutas e vegetais. Contudo, o potencial efeito benéfico da castanha-do-brasil, rica em SeMet e fitoquímicos antioxidantes, na regulação do metabolismo oxidativo ainda não havia sido investigado. Para testar esta hipótese, objetivamos realizar um trabalho de revisão na literatura sobre a castanha-do-brasil e, em paralelo, avaliar a influência do desbalanço S-PH, genético e induzido quimicamente, no efeito *in vitro* da SeMet, purificada e a contida no extrato aquoso da castanha-do-brasil (EACB), via análise da modulação das enzimas antioxidantes. Métodos: Protocolo 1, células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram genotipadas para o polimorfismo Val16Ala-SOD2 e tratadas com SeMet purificada por 24 h em meio de cultura RPMI. No segundo protocolo, fibroblastos HFF-1 foram quimicamente S-PH desbalanceados com a porfirina MnTBAP (AA-SOD2-like) ou Paraquat (VV-SOD2-like) e tratados com EACB por 24 h em meio DMEM 15%. Foram avaliados crescimento celular e produção de EROs usando curvas de concentração-efeito em CMSP (SeMet (0; 1; 3; 10; 30; 100; 300 e 1000 nM)) e em fibroblastos HFF-1 (MnTBAP e Paraquat (0, 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 0,9 μ M), e Se no EACB (0; 1,25; 2,5; 25; 50; 75; 100; 125 ng Se/ mL)). A concentração efetiva foi utilizada para avaliar os parâmetros do metabolismo oxidativo e a expressão gênica das enzimas antioxidantes CuZnSOD (SOD1), SOD2, GPx-1, tioredoxina redutase (TrxR-1) e catalase (CAT). A avaliação da atividade das enzimas antioxidantes, 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG) e apoptose foi realizada somente no Protocolo 1. As concentrações efetivas de SeMet, MnTBAP e/ou Paraquat e Se no EACB foram 1 nM; 0,9 μ M e 75 ng Se/ mL, respectivamente. A regulação da expressão gênica foi diferencial entre os protocolos 1 e 2, mas o estresse oxidativo diminuiu em ambos. No Protocolo 1, relativo ao controle negativo, apoptose, 8-OHdG e a expressão da CAT diminuíram em todos os genótipos, mas a atividade CAT diminuiu somente no AA. Nas AA-CMSP, expressão e atividade SOD aumentaram; a expressão da GPx-1 não alterou e da TrxR-1 baixou expressivamente, mas a atividade de ambas foi modulada positivamente. Nas VV-CMSP, a expressão de todas as enzimas diminuiu, exceto TrxR-1, com modulação positiva da atividade da GPx-1, TrxR-1 e CAT, mas negativa para SOD. No Protocolo 2, nos fibroblastos AA e VV-SOD2-like tratados com EACB, a expressão gênica da CAT seguiu o padrão SOD2 em AA e VV-SOD2-like. Porém, a expressão da SOD1 e GPx-1 diminuíram enquanto que TrxR-1 e CAT aumentaram em AA-SOD2-like. Em VV-SOD2-like, a expressão da SOD1, GPx-1 e CAT aumentaram e TrxR-1 não alterou. A relação GPx-1 e TrxR-1 ocorreu de maneira compensatória com efeito nutrigenético nas CMSP tratadas com SeMet purificada, mas de maneira sinérgica com um maior efeito nutrigenômico nos fibroblastos S-PH desbalanceados tratados com SeMet associada à matriz química do EACB.

Palavras-chave: Polimorfismo Val16Ala-MnSOD. Selênio. GPx-1. TrxR. Nutrigenômica. Nutrigenética.

ABSTRACT

SUPEROXIDE-HYDROGEN PEROXIDE IMBALANCE: *IN VITRO* MODULATION ON SELENO-L-METHIONINE AND BRAZIL NUT EFFECT

AUTHOR: KAREN LILIAN SCHOTT
ADVISOR: IVANA BEATRICE MÂNICA DA CRUZ

Introduction: The coupled enzymatic reactions between the manganese-dependent superoxide dismutase (MnSOD/SOD2) and selenoenzyme glutathione peroxidase-1 (GPx-1) selenoenzyme are essential for mitochondrial redox balance in aerobic cells. SOD2 dismutates the superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) to hydrogen peroxide (H_2O_2) which is reduced to water by GPx-1. At low concentrations, reactive oxygen species (EROs) $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 are essential for the maintenance of the body's homeostasis. However, in the single nucleotide polymorphism (SNP) in the gene that codes for SOD2 (Val16Ala-SOD2) the AA genotype is 30-40% more efficient than the wild VV causing a superoxide (S)-hydrogen peroxide (HP) imbalance, associated to development of chronic noncommunicable diseases. The VV genotype was associated with cardiometabolic diseases and metastatic breast cancer. Whereas, AA genotype have been related to an increased risk of breast, prostate and colorectal cancer, suggesting that the excess of H_2O_2 generated could be higher than the antioxidant capacity of GPx-1. In addition, a previous study showed that the risk of breast cancer decreased in an expressive manner in women carriers of AA genotype who reported a diet rich in fruits and vegetables. However, the potential benefic effect of Brazil nut, rich in seleno-L-methionine (SeMet) and antioxidant phytochemicals, on the regulation of cellular oxidative metabolism had not yet been investigated. To test this hypothesis, we aimed to perform a literature review work about brazil nuts and, in parallel, to evaluate the influence of the genetic and chemically induced S-HP imbalance on the *in vitro* effect of the purified SeMet and that contained in the Brazil nut aqueous extract (BNAE), through the analysis of antioxidant enzymes modulation and other variables. **Methods:** In the Protocol 1, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were genotyped for the Val16Ala-SOD2 polymorphism and treated with purified SeMet for 24 h in RPMI cell culture medium. In the Protocol 2, HFF-1 fibroblasts were S-HP chemically imbalanced with MnTBAP (AA-SOD2-like) and Paraquat (VV-SOD2-like) and after treated with Brazil nut aqueous extract (BNAE) for 24 h in DMEM 15% medium. In the both protocols, cellular growth and ROS production were evaluated using concentration-effect curves in PBMC (SeMet (0; 1; 3; 10; 30; 100; 300 e 1000 nM)) and in HFF-1 fibroblasts (MnTBAP and Paraquat (0, 0.01; 0.03; 0.1; 0.3; 0.9 μ M), and Se in the BNAE (0; 1.25; 2.5; 25; 50; 75; 100; 125 ng Se/ mL BNAE)). The effective concentration was used to evaluate gene expression of antioxidant enzymes CuZnSOD (SOD1), SOD2, GPx-1, thioredoxin reductase (TrxR) and catalase (CAT), and oxidative metabolism parameters in both. Evaluation of the activity of antioxidant enzymes, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and apoptosis was performed only in Protocol 1. **Results:** Effective concentrations of SeMet, MnTBAP and / or Paraquat and Se in the BNAE were 1 nM; 0.9 μ M and 75 ng Se / mL, respectively. The regulation of gene expression was differential between protocols 1 and 2, whereas general oxidative parameters decreased in both protocols. In the Protocol 1, relative to negative control, CMSP treated with 1 nM purified SeMet decreased apoptosis, 8-OHdG and CAT expression in all genotypes, but CAT activity decreased only in AA genotype. In the AA-PBMC, SOD expression and activity increased. Gene expression of GPx-1 unchanged and TrxR-1 decreased expressively while GPx-1 and TrxR-1 activities were modulated positively. In the VV-PBMC, the expression of all enzymes decreased, except for TrxR-1. Positive activity modulation was observed for GPx-1, TrxR-1 and CAT but negative for SOD. In the Protocol 2, BNAE- treated fibroblasts AA and VV-SOD2-like increased CAT gene expression following SOD2 standard. SOD1 and GPx-1 decreased while TrxR-1 and CAT increased in AA-SOD2-like. Positive modulation of activity was observed for GPx-1, TrxR-1 and CAT but negative for SOD. In the Protocol 2, AA and VV-SOD2-like fibroblasts treated with BNAE increased CAT gene expression following SOD2 standard. SOD1 and GPx-1 decreased while TrxR-1 and CAT increased in AA-SOD2-like. Diversely, in BNAE- treated VV-SOD2-like, expression of SOD1, GPx, and CAT increased, whereas TrxR-1 unchanged. In general, results showed a compensatory and nutrigenetic effects in the PBMC treated with purified SeMet, while imbalanced S-HP fibroblasts treated with SeMet associated to the chemical matrix of BNAE showed synergistic and nutrigenomic effects.

Keywords: Val16Ala-SOD2 polymorphism. Selenim. GPx-1. TrxR. Nutrigenomics. Nutrigenetics.

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	9
1.1	REFERENCIAL TEÓRICO	9
1.2	PROPOSIÇÃO.....	20
1.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
2	ARTIGO 1 – CASTANHA-DO-BRASIL: ASPECTOS SOCIOECONÔMICOS E IMPORTÂNCIA NA PREVENÇÃO DE DOENÇAS NÃO TRANSMISSÍVEIS	22
3	ARTIGO 2 – SUPEROXIDE-HYDROGEN PEROXIDE GENETIC IMBALANCE MODULATES DIFFERENTIALLY THE OXIDATIVE METABOLISMO ON HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS EXPOSED TO SELENO-L-METHIONINE	46
4	ARTIGO 3 – THE INTERACTION BETWEEN A CHEMICAL SUPEROXIDE-HYDROGEN PEROXIDE IMBALANCE AND BRAZIL NUT AQUEOUS EXTRACT REGULATES THE OXIDATIVE METABOLISM OF HFF-1 FIBROBLASTS IN A NUTRIGENOMIC MANNER	56
5	DISCUSSÃO	95
6	CONCLUSÃO	105
	REFERÊNCIAS	106

1 APRESENTAÇÃO

O presente trabalho aborda a importância do polimorfismo genético da enzima humana mitocondrial superóxido dismutase dependente de manganês (Val16Ala-SOD2 SNP) que gera um desbalanço oxidativo crônico em portadores dos genótipos homozigotos AA e VV-SOD2. Este desbalanço tem sido associado ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT).

As DCNT incidem de forma crescente ao nível mundial e esta situação requer a intervenção no estilo de vida da população, incluindo a adequação da prática alimentar. Neste sentido, instrumentos da Nutrigenômica, tais como a investigação de polimorfismos genéticos, são essenciais para unir a clínica e estado nutricional dos indivíduos com o intuito da personalização dietética.

Neste contexto, o estudo das interações entre o polimorfismo Val16Ala-SOD2 e alimentos pode auxiliar na melhor compreensão da importância dos alimentos na prevenção de DCNT via adequação da dieta em cada indivíduo, especialmente no câncer de mama, próstata e colorretal nos indivíduos portadores do genótipo AA-SOD2.

Em função disso, dois estudos *in vitro* foram realizados utilizando a Seleno-L-metionina (SeMet) na forma purificada e a SeMet contida na matriz química da castanha-do-brasil avaliando as interações com o perfil de desbalanço oxidativo referentes a cada genótipo homozigoto da SOD2. Assim, a melhor compreensão dos efeitos do Selênio em diferentes apresentações foi alcançada por avaliações baseadas na expressão das (seleno)enzimas antioxidantes.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

A respiração celular aeróbica que ocorre na membrana interna da mitocôndria, gera ininterruptamente radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que é dismutado à peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima superóxido dismutase humana dependente de manganês (MnSOD/SOD2). Esta reação é acoplada à enzima glutathiona peroxidase-1 (GPx-1) que catalisa o H_2O_2 à água e oxigênio molecular. Importante ressaltar que a tioredoxina redutase 2 (TrxR-2) também participa da redução do H_2O_2 na mitocôndria (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

A SOD2 é sintetizada a partir de um gene nuclear e esta enzima precisa ser direcionada para o interior da mitocôndria para exercer a sua atividade antioxidante. O transporte da SOD2 para o interior mitocondrial acontece pela ação de uma região peptídica contida na proteína SOD2 que orienta esta molécula para dentro da mitocôndria (*Mitochondrial Target Sequence*, MTS). No gene da SOD2 dos seres humanos existe uma variação genética, no códon 16 localizado no exon 2 do cromossomo humano 6q25, que leva à substituição de um aminoácido valina (Val – códon GTT) por uma alanina (Ala – códon GCT) na proteína da SOD2 formada (polimorfismo Val16Ala-SOD2, rs4880). Este polimorfismo resulta em três diferentes genótipos; AA, AV e VV (SHIMODA-MATSUBAYASHI et al., 1996; SUTTON et al., 2003).

Esta troca de aminoácido interfere na estrutura da proteína SOD2. No caso, o alelo A produz uma proteína alfa-hélice que permite a livre transposição da SOD2 na mitocôndria, enquanto que o alelo V produz uma proteína beta-lâmina que fica parcialmente presa na membrana mitocondrial. Esta condição faz com que o alelo A produza uma SOD2 30-40% mais eficiente ao contrário do que ocorre no alelo V, resultando em um desbalanço Superóxido (S) - peróxido de hidrogênio (PH) (SUTTON, 2003).

Desta forma, os genótipos homocigotos (AA e VV) têm sido associados às doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como as metabólicas, cardiovasculares e o câncer. Trabalhos prévios entendem que o genótipo VV tem níveis mais elevados de $O_2^{\cdot-}$ por não converter de modo eficiente esta molécula em H_2O_2 enquanto que o genótipo AA produz uma maior concentração de H_2O_2 , o que não significa que decorra maior produção compensatória de GPx-1 (BRESCIANI et al., 2013).

O excesso de H_2O_2 pode reagir com metais de transição (Zn, Fe, Mn e Cu) resultando em formação do radical hidroxila ($\cdot OH$). Consequentemente, o $\cdot OH$ cronicamente produzido pode levar à lipoperoxidação e, especialmente, ao dano do DNA aumentando o risco de desenvolvimento de câncer (BRESCIANI et al., 2013).

Por outro lado, $O_2^{\cdot-}$ em excesso reage espontaneamente com o $\cdot NO$ gerando o peroxinitrito ($ONOO^-$) que transpõe livremente as membranas mitocondriais e celulares. Então, o $ONOO^-$ é a forma que o $O_2^{\cdot-}$ sai da mitocôndria e alcança o citosol e os espaços extracelulares e outras células, levando à lipoperoxidação e,

principalmente, à carbonilação de proteínas (SUZUKI; CARINI; BUTTERFIELD, 2010).

No citosol, a CAT protege as células contra o excesso de H_2O_2 ou $ONOO^-$, uma vez que é capaz de decompor H_2O_2 e $ONOO^-$ à água através da oxidação dos íons ferro no grupo prostético heme da enzima. O processo de catálise ocorre em duas reações, primeiramente, a CAT nativa (CAT FeIII) reage com a primeira molécula de H_2O_2 ou $ONOO^-$ resultando na formação de água e composto CAT Fe IV = O^+ que na segunda reação com H_2O_2 ou $ONOO^-$ gera água e oxigênio molecular, sendo assim reconvertida a CAT Fe III ativa (BAUER, 2012).

O excesso de espécies reativas ou a deficiência de enzimas antioxidantes e proteínas de remoção e reparo do DNA condiciona ao desenvolvimento de DCNT. Como o próprio nome diz, estas doenças não são transmitidas de pessoa para pessoa, são de longa duração e progressão geralmente lenta. Os quatro principais tipos de doenças não transmissíveis são doenças cardiovasculares (como ataques cardíacos e acidentes vasculares cerebrais), neoplasias malignas, doenças respiratórias crônicas (como doença pulmonar obstrutiva crônica e asma), diabetes. Planos de enfrentamento das DCNT têm sido definidos pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2013).

No mundo, o número total de óbitos em decorrência de DCNT foi de 40 milhões de um total de mortes de 56% milhões em 2015. Destes 40 milhões de óbitos, 48% ocorreram em países com baixa e média renda. Os fatores de risco para doenças cardíacas, acidente vascular cerebral e diabetes tipo 2 podem ser prevenidas em 80% (WHO, 2013).

Dentre os casos de neoplasias malignas, o câncer de mama é o segundo tipo mais comum entre as mulheres no mundo e no Brasil, respondendo por cerca de 28% de novos casos a cada ano. Acima da idade de 35 anos sua incidência cresce progressivamente, especialmente após os 50 anos. A estimativa de novos casos para 2016 foi de 57.960. Estatísticas indicam aumento da sua incidência tanto nos países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento (INCA, 2015).

O câncer de próstata é mais incidente em homens com idade acima de 65 anos em todo o mundo. A maioria dos tumores cresce de forma lenta e são facilmente monitorados. A estimativa foi de 61.200 novos casos em 2016.

O câncer colorretal abrange tumores que acometem um segmento do intestino grosso (o cólon) e o reto. A maioria dos tumores inicia a partir de pólipos

tratáveis e curáveis se detectados precocemente. A estimativa para 2016 foi de 34.280 novos casos (INCA, 2015).

A grande maioria dos casos de câncer gástrico ou de estômago ocorre em pacientes acima de 50 anos e tem pico de incidência em homens por volta dos 70 anos. A estimativa para 2016 foi de 20.520 novos casos (INCA, 2015).

Diante destes números que acompanham os encontrados em nível mundial, decorre a necessidade de abordar quatro DCNT principais no nível de atenção primária, no sentido de prevenir os principais fatores de risco para DCNT, tais como alimentação inadequada, tabagismo, uso nocivo de álcool e atividade física insuficiente (JEET et al., 2017).

Neste contexto, o movimento mundial para mudança de hábitos nocivos à saúde se torna premente. A alimentação adequada torna-se um dos pilares para diminuir estes números em função da ação de bioativos que podem levar ao restabelecimento do dano celular e prevenir estas doenças. A inclusão da castanha-do-brasil na dieta tem mostrado resultados positivos na prevenção e remissão das morbidades relacionadas às DCNT.

A castanha-do-brasil amplamente conhecida como castanha-do-pará é a semente do fruto da castanheira-do-brasil *Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae, naturalmente encontrada na Bacia do Rio Amazonas (MORI; PRANCE, 1990). A referida semente contém uma matriz nutricional completa, rica em proteínas, ácidos graxos insaturados, vitaminas, carboidratos e fitoquímicos antioxidantes, tais como polifenóis, ácidos fenólicos, e flavonoides (CARDARELLI; DE OLIVEIRA, 2000), além de ser um alimento acumulador do elemento essencial Se na forma de SeMet (JOHN; SHAHIDI, 2010).

Vários estudos e meta-análises mostraram o efeito na diminuição de riscos para doenças cardiovasculares (DCV) diminuindo a pressão arterial, a adiposidade e a inflamação e, aumentando os níveis de colesterol HDL (AUNE et al., 2016; GROSSO et al., 2015). Em relação ao câncer, os estudos têm mostrado efeito quimiopreventivo da semente, especialmente no câncer colorretal que tem como fator de risco o a deficiência da selenoproteína P (SePP1) devido ao polimorfismo do gene desta proteína (HU et al., 2016).

Alimentos como a castanha-do-brasil apresentam moléculas bioativas que atuam na bioquímica e fisiologia das células via regulação da expressão de genes e proteínas. A ação destas moléculas sobre os genes é conhecida como efeito

nutrigenômico. Entretanto, também pode ocorrer uma variabilidade na resposta ao efeito de determinados alimentos e suplementos alimentares na modulação da expressão de genes e de proteínas como consequência de polimorfismos genéticos que modificam a estrutura e função de muitas proteínas e enzimas corporais (FENECH, 2008).

Os polimorfismos genéticos são fatores chaves para explicar a resposta individual diante da intervenção dietética, sendo estudos na área do conhecimento conhecida como nutrigenética. Assim, a nutrigenética estuda os mecanismos associados com a variação dos efeitos benéficos ou mesmo toxicológicos de micronutrientes para a manutenção das funções biológicas (BRAICU et al., 2017).

Estudo prévio sugeriu que o risco de desenvolvimento de câncer associado ao genótipo AA-SOD2 do polimorfismo Val16Ala-SOD2 poderia ser minimizado através da dieta rica em frutas e vegetais (AMBROSONE et al., 1999). Outro estudo recente também mostrou que o efeito anti-inflamatório de moléculas como o resveratrol é diferencialmente modulado pelo polimorfismo Val16Ala-SOD2 (CAPELETO et al., 2015).

A castanha-do-brasil, rica em fitoquímicos antioxidantes, também apresenta uma concentração de Se na forma de SeMet que varia entre 8 e 83 µg/g (ROMAN; JITARU; BARBANTE, 2014) e está entre as mais altas encontradas em alimentos consumidos por seres humanos (NÉMETH et al., 2013).

Desta forma, a questão em aberto é se a castanha-do-brasil poderia ter efeito benéfico sobre o estresse oxidativo gerado pelo desbalanço S-PH via modulação diferencial de genes das (seleno)enzimas antioxidantes.

A ingestão adequada de Se na dieta é regulada por agências científicas baseado no *status* de Se sanguíneo de uma amostra da população. As funções biológicas do Se são mediadas por cerca de 25 proteínas, incluindo enzimas como as glutatona peroxidases, as tioredoxinas redutases, as deiodinases das iodotironinas e a SePP1 (BULTEAU; CHAVATTE, 2015). O Se apresenta um intervalo muito estreito entre deficiência, dose essencial e dose tóxica. Em geral a ingestão diária recomendada está entre 50 e 60 µg/dia para adultos de acordo com o Instituto de Medicina da Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos da América (OTTEN; HELLWIG; MEYERS, 2006).

No Brasil, a suplementação diária recomendada de 34 µg/dia para adultos é regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2005) que

segue as diretrizes da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura/Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO, 2001).

O nível tolerável superior de ingestão é de 400 µg/dia e os sintomas tóxicos agudos têm sido associados a uma ingestão de Se extremamente alta (3200- 6700 µg/dia). A absorção do Se obtidos da dieta varia de acordo com a sua forma química, 90% no caso da SeMet (ROMAN; JITARU; BARBANTE, 2014).

Nesse contexto, as selenoproteínas dependem da suplementação de Se para a sua síntese via incorporação do Se na forma de selenocisteína (Sec). Estas proteínas possuem diferentes distribuições teciduais e funções variadas incluindo a SePP1 e as enzimas antioxidantes GPxs (FLOHÉ, 2009) e TrxRs (LU; HOLMGREN, 2014).

A família da GPx é representada por importantes isoenzimas, tais como GPX-1, GPx-2, GPx-3 e GPx-4 e GPx-6 que podem ser classificadas hierarquicamente de acordo com a ordem de importância para a manutenção da vida, sendo a GPx-2 > GPx-4 >> GPx-3 = GPx-1 (ROMAN; JITARU; BARBANTE, 2014).

A localização no organismo e a compartimentalização celular determinam a função das selenoproteínas. A GPx-1 intracelular, localiza-se na mitocôndria e no citosol; a GPx-2 é sintetizada e restrita às células do epitélio gastrointestinal; a GPx-3 é a única extracelular, a GPx-4 é a única monomérica, presente na maioria das células ligada às membranas e lipoproteínas, reduz hidroperóxidos associados às membranas prevenindo a peroxidação lipídica e é essencial na espermatogênese e função do esperma e, por último, a GPx-6 está localizada no epitélio olfatório (ROMAN; JITARU; BARBANTE, 2014).

Adicionalmente, a família da TrxR é constituída por TrxR-1 citosólica, TrxR-2 mitocondrial e TrxR-3 extracelular. As selenoenzimas GPx-4, TrxR-1, TrxR-2 e TrxR-3 são constitutivas e essenciais para a manutenção da vida (WROBEL; POWER; TOBOREK, 2016). A SePP1 é secretada do fígado e distribuída em todos os tecidos através do plasma sanguíneo e, dentre outras funções, tem efeito na proteção do endotélio ao dano oxidativo e inibe a oxidação do LDL colesterol (PAPP et al., 2007).

A determinação dos níveis de SePP1 e da atividade da GPx-3 é utilizada para estimar a concentração do Se no plasma sanguíneo, em que os níveis da GPx-3 têm meia vida de 12 horas após a ingestão de Se enquanto que a SePP1 tem meia vida de 4 horas. No entanto, a expressão é limitada a ~100 ng Se/mL para a GPx-3 e 125

ng Se/ mL para a SePP1. Adicionalmente, a atividade da GPx-1 no eritrócito pode ser realizada para estimar a ingestão crônica de Se (ROMAN; JITARU; BARBANTE, 2014).

As selenoenzimas apresentam o Se no centro catalítico para desempenhar a função antioxidante. A atividade do sítio catalítico das selenoenzimas é dependente da manutenção do estado reduzido do grupamento selenol (Enzima-SeH) no resíduo da Sec constituinte do centro ativo. Na presença de H_2O_2 ocorre a oxidação do selenol para produzir o correspondente ácido selenínico (Enzima-SeOH) e água, evitando assim a formação do $\bullet OH$ e os danos oxidativos no DNA e proteínas (LU; HOLMGREN 2014).

A GPx-1 é uma enzima de ação mitocondrial e citosólica cujo sítio catalítico é composto pela tríade catalítica que contém o resíduo Sec, e os aminoácidos triptofano (Trp) e glutamina (Gln). O resíduo Sec da GPx-1 catalisa a redução do H_2O_2 . A manutenção do sítio catalítico ativo depende de manter no estado reduzido o resíduo Sec que é possível via GSH ou através dos resíduos de Gln e Trp da tríade catalítica. Quando os níveis de H_2O_2 superam a capacidade do aporte de GSH, a tríade catalítica mantém o ciclo da GPx com eficiência reduzida. No processo clássico envolvendo a GSH como agente redutor, 2 equivalentes de GSH são oxidados ao correspondente dissulfeto de glutationa (GSSG), enquanto o H_2O_2 é reduzido à água (FLOHÉ et al., 2011).

A TrxR participa diretamente do metabolismo do Se ao nível de ligações dissulfetos e disseleneto, liberando moléculas ou proteínas para cumprir suas funções biológicas (NASCIMENTO et al., 2014). Assim, desempenha um importante papel na distribuição do elemento Se e controle da síntese de selenoproteínas (BULTEAU; CHAVATTE, 2015). Além disso, a TrxR pode diretamente reduzir lipoperóxidos, além de H_2O_2 (BJÖRNSTEDT et al., 1995). Esta selenoenzima também está envolvida nos processos de síntese de DNA, regulação de fatores de transcrição e apoptose mediada por EROs (CEBULA; SCHMIDT; ARNÉR, 2015; ZENG, 2009).

As selenoproteínas juntamente com a CAT protegem as células de danos oxidativos provocados por excesso de espécies reativas. $O_2^{\bullet -}$, H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos/ lipoperóxidos (RHOO) são denominados espécies reativas de oxigênio (EROs), enquanto que o $\bullet NO$ e $ONOO^-$ são chamadas de espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Baixos níveis destas espécies reativas agem como moléculas

sinalizadoras endógenas essenciais para a regulação da expressão de genes e proteínas com funções específicas. Deste modo, EROs e ERNs medeiam importantes vias de sinalização celular necessárias para a manutenção da homeostasia do organismo via ativação ou inativação de proteínas (BINDOLI; RIGOBELLO, 2013).

Algumas funções específicas das proteínas essenciais à vida referem-se à sua capacidade antioxidante, promoção da síntese e regeneração da GSH, participação da desintoxicação por fármacos e outros xenobióticos, assim como ao reconhecimento, reparo e remoção de proteínas e DNA danificados (*heat shock proteins*) e regulação da resposta imune e apoptose (BRIGELIUS-FLOHÉ et al., 2012).

As espécies reativas agem diretamente no DNA como é o caso do $O_2^{\cdot-}$ ou através de fatores de transcrição como o Nrf2 (Fator nuclear eritróide 2-relativo ao fator 2) (Figura 1). Na presença de Se, o Nrf2 regula a expressão de genes das proteínas que favorecem de forma coletiva a manutenção da homeostasia celular. Este é o caso das selenoproteínas GPx-1 e TrxR-1, bem como as proteínas que melhoram a síntese e a regeneração da GSH (CEBULA; SCHMIDT; ARNÉR, 2015).

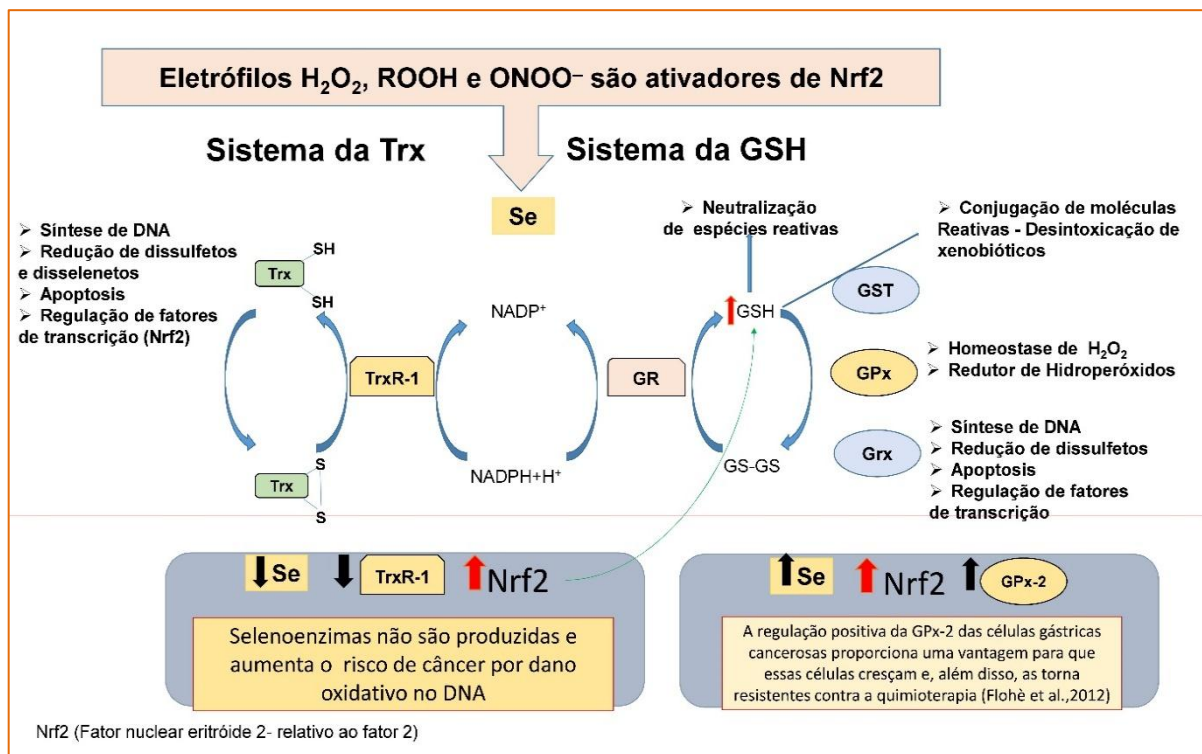
No sistema Trx, a TrxR-1 mantém as funções de proteínas essenciais por meio do seu substrato natural tioredoxina (Trx-1) de maneira sinérgica com o sistema GSH. A Trx-1 no estado oxidado ($TrxS_2$) é ciclicamente reduzida por TrxR-1 a $Trx-(SH)_2$ que cumpre diretamente a sua função na ativação/inativação de proteínas por sua propriedade antioxidante e também como fator de transcrição para a síntese de proteínas essenciais. De maneira sinérgica, no sistema GSH, a glutathiona redutase (GR) mantém a atividade da GPx por conversão cíclica da GSSG a GSH. Ambos os sistemas, Trx e GSH (via Grx) exercem funções similares e dependem da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) como provedor de equivalentes redutores nas reações (FLOEN et al., 2014).

A TrxR-1 via $Trx-(SH)_2$, regula negativamente o Nrf2 enquanto que a regulação positiva ocorre em condições de estresse oxidativo quando o seu centro catalítico no estado oxidado e inativo perde a capacidade de reverter $TrxS_2$ que ativa o Nrf2 (CEBULA; SCHMIDT; ARNÉR, 2015). Adicionalmente, na deficiência do Se, a incorporação da selenocisteína (Sec) no RNAm não ocorre e as selenoproteínas não são traduzidas. No entanto, o Nrf2 continua sendo ativado pelas espécies reativas que não estão sendo suficientemente neutralizadas. Neste

contexto, ocorre a superexpressão dos componentes do sistema GSH, tais como a glutatona redutase (GR) e a glutatona S transferase (GST) (CEBULA; SCHMIDT; ARNÉR, 2015).

No sistema da GSH, a glutaredoxina (Grx) é mantida pelos equivalentes redutores da GSH em reação intermediada pela glutaredoxina redutase (GrxR) que desempenha funções semelhantes ao sistema da Trx-1. (LILLIG; BERNDT; HOLMGREN, 2008). Na ausência de Se, o sistema GSH e da Grx mediada pela GR é tornam-se os únicos sistemas responsável por manter os mecanismos de regulação de sobrevivência ou apoptose celular (FLOEN et al., 2014).

Figura 1 – TrxR-1 na forma inativa regula positivamente o Nrf2



Fonte: Elaborado pela Autora.

O estresse oxidativo excessivo (hiperoxia) pode interromper a sinalização celular através de oxidação de tióis de elementos chaves para a manutenção do equilíbrio oxidativo sensíveis as reações de oxi-redução, como por exemplo a proteína tioredoxina (Trx) substrato natural da TrxR e o tripeptídeo GSH, doador de elétrons à GPx (BRIGELIUS-FLOHÉ; FLOHÉ, 2011).

Diante do exposto, embora os sistemas da Trx-1 e GSH funcionem independentemente, eles fornecem funções similares. No entanto, a deficiência de um destes sistemas e a continuidade do estresse oxidativo com excesso de leva ao aumento dos níveis do radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), na presença de metais de transição (Fe^{2+} , Cu^{1-} e Mn^{2+}) via reação de Fenton, resultando em dano oxidativo ao DNA e culminando em mutações genéticas e câncer (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

Neste contexto, no caso do câncer gástrico, as células cancerígenas foram beneficiadas com suplementação supranutricional de SeMet (200 $\mu\text{g}/\text{dia}$), aumentando a expressão da GPx-2 e a TrxR-1, via Nrf2. A evidência para apoiar esta ideia é resumida em vista da regulação mútua de Se / selenoproteínas e Nrf2 (BRIGELIUS-FLOHÉ et al., 2012).

A TrxR-1/Trx-1 no citosol e a TrxR-2/Trx-2 na mitocôndria estão envolvidas na regulação no processo de morte celular programada denominada apoptose ocorrem tanto na fase de iniciação quanto execução.

A apoptose é um processo essencial para a formação e função de tecidos e órgãos. Além disso, é fundamental para o bom funcionamento das células imunes (XU; SHI, 2007). Na via intrínseca, a fase de iniciação decorre de vários fatores oriundos à célula, inclusive ao estresse oxidativo nocivo às proteínas essenciais e ao DNA. A execução da apoptose é caracterizada por inversão da membrana citoplasmática com consequente exposição de fosfatidilserina, *blebbing* (zeiose), fragmentação do núcleo, condensação da cromatina e degradação do DNA. Na fase de término, os corpos apoptóticos são envolvidos por fagócitos (XU; SHI, 2007).

O mecanismo de regulação coordenado por Trx-1 na forma reduzida promove a degradação da proteína kinase-1 reguladora do sinal de apoptose (ASK-1). No estresse oxidativo, a oxidação de Trx-1 por ROS determina sua dissociação com posterior ativação de ASK1 que resulta em apoptose induzida por ativação da cascata das caspases (ZHANG et al., 2017).

Ao mesmo tempo, na mitocôndria, a TrxR-2 mantém a Trx-2 na forma reduzida que se acopla à ASK1 e ASK2. O dismantelamento do complexo mitocondrial ASK1 / ASK2 / Trx-2 por ROS promove a liberação da ASK1 e ASK2 e, consequentemente, a liberação do citocromo c. Uma vez liberado, o citocromo c e a pró-caspase 9 constituem uma plataforma de sinalização, o apoptosoma, que ativa o iniciador caspase-9. (CIRCU; YEE AW, 2008).

Adicionalmente, a via intrínseca também é regulada pelas proteínas da família Bcl2 composta por duas subfamílias: as proapoptóticas e as antiapoptóticas. A primeira subfamília é responsável por estimular o processo apoptótico permitindo a saída mais fácil do citocromo c para o citoplasma. Já a segunda subfamília tem ação contrária, impedindo que as proteínas intermembranares sejam expulsas para o citosol (RIEDL; SALVESEN, 2007).

Por outro lado, a ativação da via extrínseca da apoptose depende de sinal apoptótico extrínseco que é mediado pela ligação de um ligando extracelular a um receptor transmembranar, levando à formação do complexo de sinalização indutor da morte (DISC), o qual é capaz de ativar o iniciador da cascata caspase-8.

Caspase-9 (via intrínseca) ou a caspase-8 (via extrínseca) ativadas clivam o executor caspase-3 e caspase-7, que representam o nível de execução da apoptose na célula condenada (RIEDL; SALVESEN, 2007).

Os reguladores negativos da cascata das caspases podem ser encontrados nas fases de iniciação e execução. Enquanto as proteínas inibitórias celular FLICE (*FADD-like IL-1 β -converting enzyme*)-inhibitory protein (c-FLIP) bloqueiam a ativação do iniciador caspase-8 no DISC (R SAFA, 2013), o inibidor de ligação X da proteína de apoptose (XIAP) pode bloquear a fase de iniciação, inibindo a caspase-9 e a fase de execução, bloqueando a caspase-3 e a caspase-7, da cascata (RIEDL; SALVESEN, 2007).

Na fase de execução da apoptose, a Trx demonstrou inibir diretamente a apoptose catalisando a S-nitrosilação da pró-caspase 3 e a caspase 3, pois as caspases pertencem à família de proteases de cisteína cuja atividade depende fundamentalmente da presença de um tiolato que é reduzido pela Trx (ZHANG et al., 2017).

As células que morrem por meio da apoptose diferem das que sofrem necrose. A morte celular necrótica é induzida por fatores externos como toxinas, câncer, infecções e traumatismos e é morfológicamente caracterizada por inchaço celular, ruptura da membrana plasmática e perda de conteúdo citoplasmático (PROSKURYAKOV; KONOPLYANNIKOV; GABAI, 2003). As células necróticas geralmente são reconhecidas pelo sistema imunológico como um sinal de perigo e, assim, resultando em inflamação (INOUE; TANI, 2014).

1.2 PROPOSIÇÃO

Investigar se o Se na forma de SeMet, encontrada em vegetais, frutos e sementes como a castanha-do-brasil; poderia ter efeito benéfico contra o estresse oxidativo gerado nos homozigotos AA e VV do polimorfismo genético Val16Ala-SOD2. O genótipo AA-SOD2, associados ao maior risco de desenvolvimento de câncer é o objeto principal do estudo pela inferência de que o excesso de H₂O₂ gerado suplantaria a capacidade catalítica da GPx-1. A proposição também está alinhada ao estudo de AMBROSONE et al. (1999), em que mulheres AA-SOD2 que relataram dieta rica em frutas e vegetais diminuíram expressivamente o risco de câncer de mama. Para testar esta hipótese propomos o delineamento a seguir:

Realizar um trabalho de revisão na literatura sobre aspectos relacionados à inclusão da castanha-do-brasil na dieta em nível mundial e o potencial benefício na prevenção de DCNT, incluindo o câncer. Em paralelo, realizar dois protocolos *in vitro* (Protocolo 1 e 2) para avaliar a possível influência do desbalanço S-PH, genético (Val16Ala-SOD2) e induzido quimicamente por porfirina (MnTBAP) e Paraquat no efeito *in vitro* da SeMet em duas diferentes apresentações, purificada e a contida na matriz química do EACB, através da análise da modulação das enzimas antioxidantes, incluindo as selenoenzimas GPx-1 e TrxR-1.

– No Protocolo 1. Avaliar o efeito *in vitro* da SeMet purificada em cultura de CMSP portadoras de diferentes genótipos do polimorfismo Val16Ala-SOD2, determinando sua ação:

- na viabilidade celular;
- na atividade das proteínas da apoptose;
- nos níveis de indicadores oxidativos e dano no DNA;
- nos níveis da atividade das enzimas antioxidantes;
- na modulação da expressão dos genes das enzimas antioxidantes.

– Protocolo 2. Avaliar o efeito *in vitro* da SeMet contida no EACB em fibroblastos HFF-1 em cultura S-PH desbalanceados quimicamente por MnTBAP e Paraquat, determinando sua ação:

- na viabilidade e crescimento celular;
- nos níveis de indicadores oxidativos;
- na modulação da expressão dos genes das enzimas antioxidantes.

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos referentes a esta Tese estão apresentados sob forma de três artigos a seguir. O primeiro artigo é referente à versão aceita na Revista Amazonense de Geriatria e Gerontologia intitulado “*Castanha-do-brasil: Aspectos socioeconômicos e importância na prevenção de doenças não transmissíveis*”. O segundo artigo está apresentado na versão publicada na revista *Chemico-Biological Interactions*, com o título “*Superoxide-hydrogen peroxide genetic imbalance modulates differentially the oxidative metabolism on human peripheral blood mononuclear cells exposed to seleno-L-methionine*”. Finalmente, a apresentação do terceiro artigo está baseada na versão submetida à revista *Redox Biology*, com o título “*The Interaction Between a Chemical Superoxide-Hydrogen Peroxide Imbalance and Brazil Nut Aqueous Extract Regulates the Oxidative Metabolism of HFF-1 Fibroblasts in a Nutrigenomic Manner*”.

2 ARTIGO 1 – CASTANHA-DO-BRASIL: ASPECTOS SOCIOECONÔMICOS E IMPORTÂNCIA NA PREVENÇÃO DE DOENÇAS NÃO TRANSMISSÍVEIS

24/07/2017

Gmail - Aceite



Karen Schott <kschott9.ks@gmail.com>

Aceite

2 mensagens

RAGG <unatiragg@gmail.com>

24 de julho de 2017 17:06

Para: Karen Schott <kschott9.ks@gmail.com>

Prezada Karen

Seu manuscrito intitulado Castanha-do-brasil: Aspectos socioeconômicos e importância na prevenção de doenças crônicas não-transmissíveis foi revisado por nossos revisores voluntários, sendo aceito para publicação na edição 1 de 2017 da RAGG, com previsão de publicação online e impressa para o dia 15 de agosto.

Gostaríamos de deixar claro, que todos os artigos enviados a RAGG, passam por revisores com conhecimento adequado na respectiva área. Ainda, que os artigos são revisados de maneira duplamente cega, ou seja revisores não recebem informações dos autores, e autores não recebem informações de revisores.

Reiteramos nosso compromisso, ética e dedicação com a ciência e nossa busca constante pelo aprimoramento da Revista Amazonense de Geriatria e Gerontologia.

Qualquer dúvida, estamos à disposição

Editoras Executivas da Revista Amazonense de Geriatria e Gerontologia

Livre de vírus. www.avast.com.

Karen Schott <kschott9.ks@gmail.com>

24 de julho de 2017 17:32

Para: graffic_capas@hotmail.com

----- Mensagem encaminhada -----

De: RAGG <unatiragg@gmail.com>

Data: 24 de julho de 2017 17:06

Assunto: Aceite

Para: Karen Schott <kschott9.ks@gmail.com>

[Texto das mensagens anteriores oculto]

Castanha-do-brasil: Aspectos socioeconômicos e importância na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis

SCHOTT, K.L.^{1,2}; ASSMANN, C.E.^{1,2}

¹ Departamento de Morfologia, Laboratório de Biogenômica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil;

² Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

* **Autor correspondente:** Karen Lilian Schott. Endereço: Universidade Federal de Santa Maria, Laboratório de Biogenômica, Avenida Roraima 1000, Prédio 19, Sala 3101, Santa Maria-RS, Brasil. CEP: 97105-900. Telefone: 55-55-32208163, Fax: 55-55-32208239. E-mail: kschott9.ks@gmail.com

Resumo

A castanha-do-brasil é uma amêndoa amplamente consumida no Brasil e no mundo. Estas amêndoas são as sementes que provêm de uma árvore grande e frondosa conhecida como castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. Lecythidaceae), nativa da Bacia Amazônica e explorada por meio do extrativismo florestal por pequenas famílias do Norte do Brasil. A conservação da castanheira-do-brasil depende da preservação da floresta, dos organismos polinizadores e dispersores das sementes duras e lenhosas da árvore. A castanha-do-brasil possui em sua composição nutricional uma grande quantidade de constituintes bioativos, tais como proteínas, aminoácidos, ácidos graxos insaturados, fibras, compostos fenólicos e oligoelementos, com destaque para o Se. Diversas propriedades benéficas ao organismo já foram associadas ao consumo da castanha-do-brasil como atividades antioxidante, anti-inflamatória e anticarcinogênica, que podem ser atribuídas ao Se presente nas sementes. Estudos epidemiológicos e clínicos demonstraram que a taxa de prevalência de câncer, doenças inflamatórias, degenerativas e crônico não transmissíveis foi menor em grupos populacionais que consomem a castanha-do-brasil regularmente. A incorporação da castanha-do-brasil na alimentação, além de melhorar vários índices relacionados à manutenção da saúde, contribui para a preservação dos castanhais e permite a geração de emprego e renda para as famílias que dependem desta semente para a sua sobrevivência.

Palavras-chave: Bioma Amazônico, Selênio, Seleno-L-metionina, Câncer, Doenças Cardiovasculares.

Abstract

Brazil nut is an almond widely consumed in Brazil and in the world. These almonds are seeds that come from a large, magnificent tree known as Brazil nut tree (*Bertholletia excels* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae), native to the Amazon Basin and exploited by small-scale forest extractives by small families in Northern Brazil. Conservation of Brazil nut tree depends on the preservation of the forests, pollinator organisms and dispersers of the hard and woody seeds of the tree. Brazil nut has a large amount of bioactive constituents, such as proteins, amino acids, unsaturated fatty acids, fibers, phenolic compounds and trace elements, with special emphasis on selenium (Se). Several beneficial properties to the organism have been already associated with Brazil nut consumption such as antioxidant, anti-inflammatory and anticarcinogenic activities, which can be attributed to Se present in the seeds. Epidemiological and clinical studies have shown that the prevalence rate of cancer, inflammatory, degenerative and chronic noncommunicable diseases is lower in population groups that consume Brazil nut regularly. The incorporation of Brazil nut in foods, besides improving several indexes related to health maintenance, contributes to the preservation of the “castanhais” and allows the generation of employment and income for the families that depend on this seed for their survival.

Keywords: Amazonian Biome, Selenium, Seleno-L-Methionine, Cancer, Cardiovascular Diseases

Introdução

A castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae), conhecida também como castanheira-do-pará, castanheira-do-acre ou noz amazônica, é uma árvore nativa da Floresta Amazônica pertencente à família Lecythidaceae e considerada de grande porte, podendo alcançar até cerca de 50 metros de altura (Figura 1). O nome do gênero da castanheira-do-brasil, *Bertholletia*, foi dado em 1807 em homenagem ao famoso químico Claude Louis Berthollet (1748-1822), contemporâneo de Alexander von Humboldt e Aimé de Bonpland, que descreveram a espécie. Já o epíteto, *excelsa*, deve-se ao elevado porte das espécies do gênero (MORI, PRANCE, 1990).



Figura 1. Árvore de castanheira-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) com destaque para as sementes. Fonte: adaptado de <https://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Castanheira_1.jpg> e <<https://pixabay.com/pt/castanha-do-par%C3%A1-castanha-do-acre-638972/>>. Acesso em: 20 de Abril de 2017.

Nos últimos anos o consumo de sementes, como as nozes, castanhas, avelãs e amêndoas, tem aumentado no Brasil e em vários outros países, devido a esses alimentos apresentarem uma relação com um menor risco de doenças

cardiovasculares, diabetes do tipo 2 e alguns tipos de câncer (CHEN; LAPSLEY; BLUMBERG, 2006; NISHI et al., 2014).

A castanha-do-brasil destaca-se entre essas sementes pela grande quantidade de nutrientes bioativos presentes em sua composição, incluindo especialmente o Se, tocoferóis, ácidos graxos insaturados, proteínas, aminoácidos, fibras e compostos fenólicos (YANG, 2009). Um detalhamento dos componentes da castanha revela que ela apresenta de 60-70% de lipídios, entre eles podemos destacar o ácido oleico (45,2%), ácido linoleico (31,4%), ácido palmítico (13,8%) e ácido esteárico (8,7%), além de quantidades menores de ácido palmitoleico e ácido mirístico. Ainda, quantidades consideráveis de proteínas podem ser encontradas na castanha (15-20%), vitaminas lipossolúveis (A, E) e diversos minerais (Ca, Fe, Zn, Na e K) com destaque para o selênio (Se) (CARDARELLI; OLIVEIRA, 2000).

Além do aumento do uso da castanha inteira, um dos usos da castanha que tem aumentado consideravelmente é a extração do óleo de castanha através de métodos de prensagem ou de extração a frio. O óleo é largamente utilizado como aditivo alimentar em diversos produtos de confeitaria, barras de cereais, sorvetes, biscoitos e barras de chocolates (SANTOS et al., 2013).

Diversos compostos fenólicos e flavonoides podem ser encontrados nas castanhas e em menor quantidade no óleo de castanha, já que o processo de obtenção do óleo diminui a extração de compostos lipofílicos. A ingestão desses compostos também está relacionada com diversos benefícios para a saúde, como capacidades anti-inflamatórias, antimutagênicas e anticarcinogênicas que eles apresentam (COLPO et al., 2014; WIJERATNE; AMAROWICZ; SHAHIDI, 2006). Alguns dos compostos fenólicos e flavonoides que puderam ser identificados no óleo de castanha foram o ácido gálico, ácido *p*-cumárico, ácido sinápico e catequinas (GOMES; TORRES, 2015).

Um dos componentes mais importantes presentes nas sementes de castanha-do-brasil é o Se. Este é extremamente importante para diversas funções celulares em organismos mamíferos. A sua incorporação na estrutura final de proteínas e enzimas é realizada através dos aminoácidos selenometionina e selenocisteína e, dessa forma, contribui na regulação de diversas vias metabólicas, incluindo o metabolismo de hormônios tireoidianos, funções na resposta imune, defesa antioxidante e redução do risco de desenvolvimento de cânceres (ROMAN, JITARU, and BARBANTE 2014).

O Se é um elemento essencial para o organismo de mamíferos pode ser obtido através da ingestão de castanha-do-brasil. A determinação da ingestão diária recomendada (IDR) é determinada por agências reguladoras de cada país. Segundo o Instituto de Medicina da Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos da América (OTTEN; HELLWIG; MEYERS, 2006), a IDR para adultos (55 µg de Se) é alcançada com a ingestão de uma única castanha (BOYD, 2011).

Entretanto, segundo estudos realizados ainda na década de 1990, as concentrações de Se na semente podem variar enormemente entre as diferentes regiões produtoras, o que está relacionado com as diferenças existentes no solo da região. Além disso, a ingestão diária de castanhas ou de outros alimentos que contenham Se deve ser limitada com o intuito de evitar toxicidade, não apenas devido ao Se, mas também pelo bário presente em grandes quantidades no solo da Bacia Amazônica e incorporado nas sementes da castanheira-do-brasil (CHANG et al., 1995).

Os objetivos deste trabalho compreendem enfatizar a importância da castanha-do-brasil em relação ao desenvolvimento humano, em termos socioeconômicos e de saúde pública, em razão da sua essencialidade na nutrição, bem como evidenciar os vastos estudos *in vitro*, clínicos e as extensas abordagens epidemiológicas relativos à efetividade desta semente na prevenção ou tratamento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), tais como o câncer, as doenças metabólicas e cardiovasculares, considerando o envelhecimento e a influência genética dos indivíduos.

Como método de pesquisa para realizar esta revisão, utilizamos a busca em bibliotecas digitais internacionais tais como Pubmed, *Science Direct*, bem como o Portal dos Periódicos da CAPES. Os descritores da busca foram: “*Brazil nut*”, “*Brazil nut and diseases*”, “*Brazil nut and cancer*”, “*Brazil nut and cardiovascular disease*” e “*Val16Ala-MnSOD gene polymorphism*”.

Aspectos botânicos e ecológicos da castanha-do-brasil

As sementes de *Bertholletia excelsa* ficaram conhecidas como castanhas-do-brasil, muito embora botanicamente a palavra castanha designe um fruto e, dessa maneira, a denominação correta para as castanhas seria a de sementes-do-brasil. As sementes são produzidas dentro de um fruto capsular que, quando maduro, cai

da árvore com as sementes em seu interior (MORI; PRANCE, 1990) O desenvolvimento do fruto, desde a polinização da flor, pode levar cerca de 15 meses, mais do que para outras espécies da família Lecythidaceae (MORITZ, 1984). Ainda, os frutos geralmente caem durante a época de chuvas, geralmente em janeiro e fevereiro (PRANCE, 1976).

O fruto da castanheira-do-brasil apresenta cerca de 10 a 21 sementes (MORI; PRANCE, 1990). Há uma grande variação no tamanho das sementes, sendo que as sementes maiores são preferencialmente comercializadas enquanto que sementes menores, mais facilmente removidas do fruto, são utilizadas para a extração do óleo de castanha e para a preparação de farinhas (ALMEIDA, 1963). Além do tamanho, o número de sementes por fruto pode variar consideravelmente dentro de uma mesma população e entre diferentes populações. Contudo, o número e tamanho de sementes e o número de frutos para árvores individuais é relativamente constante de ano a ano (NELSON et al, 1985).

A dispersão das sementes da castanheira-do-brasil é realizada por pequenos roedores encontrados em florestas neotropicais, como as cutias (*Dasyprocta spp.*), devido à capacidade que esses animais possuem de abrir os frutos duros e lenhosos que caem das árvores (HUBER, 1910). A dispersão de sementes e crescimento de novas árvores ocorre devido a esses animais enterrarem e esquecerem parte das sementes no solo, no qual elas eventualmente irão germinar (SMYTHE, 1978). O estudo de PERES; BAIDER (1997) demonstrou que apenas um quarto das sementes são consumidas imediatamente pelos animais, enquanto que aproximadamente 65% das sementes são espalhadas por um raio de cerca de cinco metros do seu ponto de origem, mas esta distância pode variar de 0,5 a 28,4 metros.

As flores de *Bertholletia excelsa* são visitadas e polinizadas principalmente por abelhas, geralmente de grande porte, robustas e de língua comprida da família Apidae, para que a perpetuação da castanheira-do-brasil seja preservada (SANTOS, ABSY, 2010). Espécies dos gêneros *Bombus*, *Centris*, *Epicharis*, *Eulaema* e *Xylocopa* têm a força necessária para abrir as flores e obter o néctar do qual se alimentam e, ao se alimentarem, levam o pólen de uma planta para a outra (MORITZ, 1984; MÜLLER et al., 1981; NELSON et al., 1985).

Biogeografia e importância socioeconômica

A castanheira-do-brasil é encontrada principalmente em solos não-inundados, conhecidos como terra firme, das Guianas, Colômbia, Venezuela, Peru, Bolívia e Brasil (MORI; PRANCE, 1990). Estudos climatológicos demonstraram que as árvores crescem preferencialmente em áreas com temperatura média anual entre 24,3 e 27,2° C, precipitação de 1400 a 2800 mm e umidade relativa entre 79 e 86% (ALMEIDA, 1963; DINIZ, BASTOS, 1974). Além disso, períodos com chuvas reduzidas, de cerca de dois a cinco meses, são importantes para o crescimento e frutificação da castanheira-do-brasil (MÜLLER, 1981).

O padrão de distribuição das castanheiras-do-brasil (Figura 2) geralmente ocorre na forma de agregados e, muitas vezes, algumas áreas concentram grande quantidade de árvores, chamadas de “castanhais”, que são intercaladas com vastas áreas de floresta com poucas árvores (MORI, PRANCE, 1990; PERES, BAIDER, 1997; SCOLES, GRIBEL, 2011).

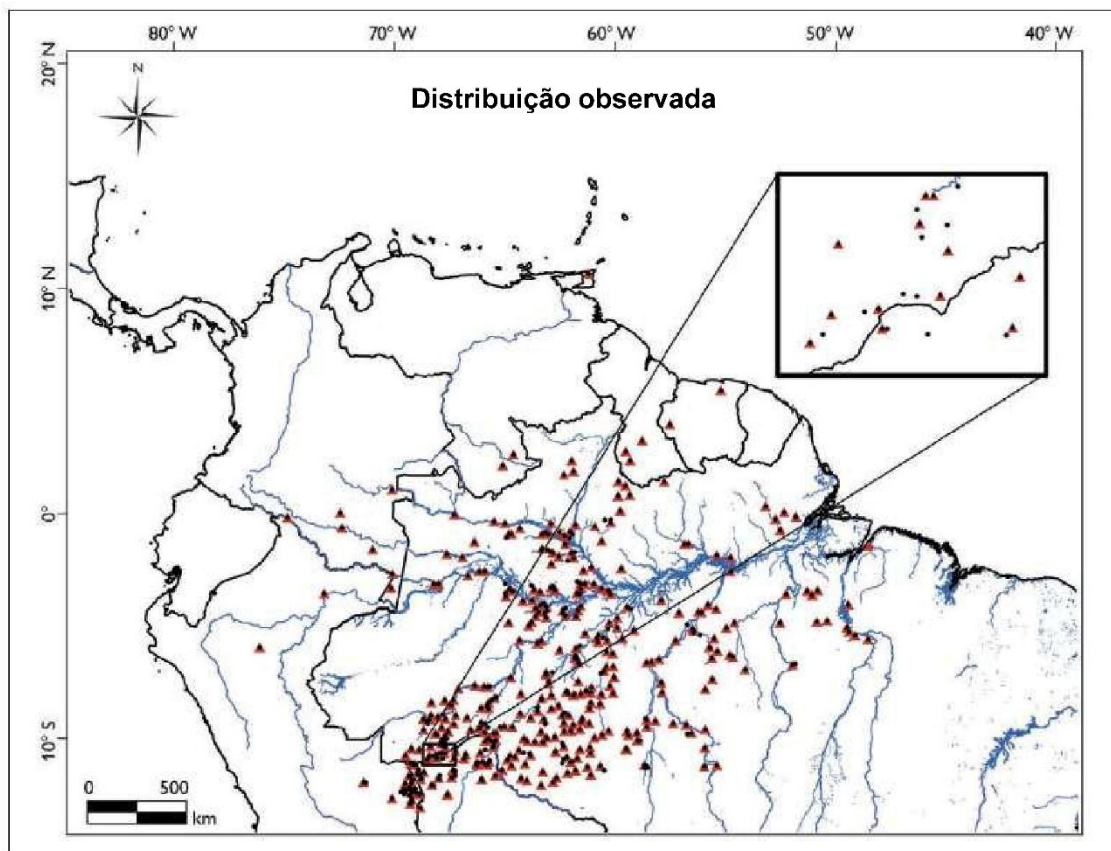


Figura 2. Distribuição observada de *Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae. A área destacada corresponde a região conhecida como “MAP”, que corresponde as localidades Madre de Dios (Peru), Acre (Brasil) e Pando (Bolívia), que concentra grande quantidade de castanhais. Fonte: adaptado de THOMAS et al., 2014.

A exploração dos frutos das castanheiras-do-brasil iniciou-se com os povos Ameríndios, que comiam as sementes e extraíam um “suco” para a utilização posterior como aromatizante de mingau de mandioca. As sementes foram chamadas de nhá, niá, invia, tacari e tucari por diferentes povos indígenas (ALMEIDA, 1963; SOUZA, 1963).

A comercialização das sementes iniciou-se apenas no final do século 18 e início do século 19, quando holandeses que vieram ao Brasil em busca de riquezas começaram a enviar as sementes para a Europa. Contudo, somente a partir do ano de 1866, quando os portos brasileiros foram abertos para o livre comércio, que o mercado de compra e venda de castanhas-do-brasil começou a prosperar (ALMEIDA, 1963; SOUZA, 1963).

A castanheira-do-brasil é uma das plantas economicamente mais importantes dentre as nativas da flora Amazônica, tanto globalmente, aumentando o valor das exportações para o Brasil, quanto localmente, gerando riquezas para as populações locais e preservando as florestas. Além disso, outras plantas como a seringueira (*Hevea brasiliensis*) utilizada para a obtenção da borracha, o cacaueteiro (*Theobroma cacao*) usado para a obtenção do chocolate e o guaraná (*Paullinia cupana*), empregado na fabricação de refrigerantes e energéticos têm grande importância econômica a nível mundial e cultivadas em regiões historicamente dependentes da exploração destes produtos (BALICK, 1985).

A legislação para o uso e exploração o de florestas tropicais mostrou ser determinante para promover e integrar o desenvolvimento sustentável e a conservação pelo fato da derrubada de árvores ser ilegal, o que impactou diretamente na economia da região no caso da exploração das castanhas nas regiões produtoras do Norte do Brasil (COSSÍO-SOLANO et al., 2011; CRONKLETON et al., 2012; WADT et al., 2005).

Com isso, a castanha-do-brasil apresenta a distinção de ser uma das únicas sementes comercializadas globalmente através da colheita baseada no extrativismo florestal (CLAY, 1997). A região conhecida como “MAP”, que integra pequenas famílias de coletores das localidades de Madre de Dios (Peru), Acre (Brasil) e Pando (Bolívia), são dependentes historicamente da colheita de frutos e sementes como a castanha-do-brasil e a da coleta de borracha das seringueiras para garantir o sustento de suas famílias (CANO et al., 2014; DUCHELLE et al., 2012; DUCHELLE et al., 2014; ZENTENO et al., 2013; ZENTENO et al., 2014)

Dados mostram que a castanha-do-brasil é um dos principais produtos de exportação da Floresta Amazônica, especialmente para o mercado internacional, com uma produção estimada ao ano de aproximadamente 40 mil toneladas. Entretanto, os dados de produção de castanha mostram que nos anos de 1970 a produção anual já chegou a cerca de 100 mil toneladas, decaindo a partir dos anos de 1980 e mantendo-se até hoje em cerca de 40 mil toneladas, especialmente devido ao desmatamento da Floresta Amazônica (WADT et al., 2008).

Segundo a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), a castanha-do-brasil aparece na lista de espécies vulneráveis e segundo o Ministério do Meio Ambiente a espécie é considerada ameaçada. Os castanhais são derrubados para a criação de gado e construção de estradas e barragens. A conservação da castanha-do-brasil é crucial para que a produção não seja afetada e as populações locais possam continuar a explorar de forma sustentável as sementes dessa grandiosa árvore (WWF, 2017).

Importância da incorporação na dieta

A castanha-do-brasil é um dos alimentos mais ricos em Se e a segunda semente que mais acumula o Se na forma de seleno-L-metionina (SeMet) (NÉMETH et al., 2013). A absorção intestinal das referidas substâncias varia de acordo com a sua forma química e é muito eficiente para a SeMet, proveniente de vegetais, frutas e sementes (DUMONT, VANHAECKE, CORNELIS 2006).

A função antioxidante do Se é alcançada via selenocisteína (Sec) que é metabolicamente derivada dos compostos de Se. A Sec é incorporada no RNAm de uma correspondente selenoproteína, via tRNA^{Ser[Sec]} (JAMESON; DIAMOND 2004). As selenoproteínas (SeP) compõem mais de 25 tipos de proteínas contendo Sec e possuem diferente distribuição tecidual e funções variadas. A selenoproteína P (SePP1) e a enzima glutathiona peroxidase-3 (GPx-3) são as principais responsáveis pelo transporte e distribuição sistêmica do Se absorvido no intestino delgado (STEINBRENNER; SPECKMANN; KLOTZ, 2016).

As selenoenzimas glutathiona peroxidase e a tioredoxina redutase (TrxR) apresentam o Se no centro catalítico para desempenhar as atividades antioxidantes. A atividade do sítio catalítico das selenoenzimas é dependente da manutenção do estado reduzido do grupamento selenol (Enzima-SeH) no resíduo da Sec

constituente do centro ativo. Na presença de H_2O_2 ocorre a oxidação do selenol para produzir o correspondente ácido selenínico (Enzima-SeOH) e água, evitando assim a formação do radical hidroxila e os danos oxidativos no DNA e proteínas (LU; HOLMGREN, 2014).

Tanto a GPx-1 quanto a TrxR removem o excesso de peróxido de hidrogênio produzidos durante o metabolismo oxidativo mitocondrial basal e em situações de desequilíbrio nas reações de óxido-redução celulares. As reações mediadas por GPx-1 e TrxR significam que estas enzimas estão envolvidas em processos celulares modulados por peróxido de hidrogênio, incluindo sinalização por citocinas, proliferação celular e apoptose (CEBULA et al. 2015).

A TrxR tem atividade antioxidante direta contra hidro e lipoperóxidos, é essencial para a síntese e reparo do DNA, desempenha um importante papel no controle da síntese de selenoproteínas (ARNÉR, 2009) através da participação do redistribuição do Se através da disponibilização do grupamento tiol (SH) ou selenol (SeH), antioxidantes, via catálise de interações S-Se ou Se-Se (NASCIMENTO et al. 2014).

O nível de Se sanguíneo considerado fisiológico é classicamente quantificado a partir da atividade da GPx-3 plasmática comparadas com sua atividade máxima que ocorre a ~ 100 ngSe/mL equivalente a ingestão de $70 \mu\text{g Se /dia}$. A expressão máxima da SePP1 ocorre em níveis levemente mais altos ~ 124 ng/mL que correspondem a ingestão de $105 \mu\text{g Se /dia}$ (HURST et al. 2010). O Se apresenta intervalos de concentrações plasmáticas estreitos entre deficiência (<89 ng/mL), essencial (~ 100 ng/mL) e tóxicas - quando são observados sintomas que caracterizam a selenose (ROMAN, JITARU, BARBANTE 2014).

No Brasil, a ingestão diária recomendada do Se é baseada em dietas mistas contendo o elemento e é regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2005) que segue as diretrizes da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura/Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO). A ANVISA recomenda $34 \mu\text{g Se /dia}$ para adultos de ambos os sexos com pequena variação para gestantes e lactantes; para infantes, 6 (0-6 meses), 10 (7-11 meses), 17 (1-3 anos) e 21 (4-10 anos) $\mu\text{g Se /dia}$.

Em situações de deficiência de Se patologicamente ou clinicamente identificada, a suplementação com maiores concentrações é necessária. Neste sentido, a recomendação canadense é de $55 \mu\text{g Se /dia}$ para adultos é seguida por

diversos países com solos deficientes em Se como Europa, Canadá e vários estados americanos pelo Instituto de Medicina das Academias Nacionais e Saúde do Canadá e pelo Conselho Nacional de Pesquisa - Ingestão dietética de referência: o Guia Essencial para as Necessidades de Nutrientes (OTTEN; HELLWIG; MEYERS, 2006)

A variabilidade da resposta ao efeito de determinados alimentos e suplementos, tais como a SeMet, depende da variação da expressão de genes e produção de proteínas incluindo interações complexas de polimorfismos genéticos múltiplos, os quais são fatores chaves para explicar a resposta individual diante da intervenção dietética (FENECH 2008).

A necessidade de suplementação de Se depende do estado nutricional do indivíduo, sendo recomendada a avaliação da ingestão concomitante de outras fontes de alimentos que contenham Se como por exemplo, peixes, músculos, fígado, ovos, frutas e verduras (ROMAN, JITARU, and BARBANTE 2014). Tanto a deficiência quanto o excesso de Se podem causar aumento do risco de DCNT, tais como, cardiovasculares, câncer e degenerativas (FAIRWEATHER-TAIT et al. 20011). Níveis acima dos nutricionais podem conduzir a um quadro chamado selenose caracterizada por queda de cabelo, desestruturação das unhas até efeitos tóxicos gastrointestinais e neurológicos (MACFARQUHAR et al. 2010) Contudo, estudos epidemiológicos têm revelado que indivíduos que vivem em áreas com alto nível de Se na cadeia alimentar, tais como crianças da região Norte do Brasil não apresentaram sintomas de selenose sugerindo uma resposta adaptativa ao meio (MARTENS et al. 2015; VEGA et al. 2011). Esta hipótese foi testada por estudo realizado por HAWKES et al. (2003) o qual mostrou que homens adultos norte-americanos não apresentaram sintomas de selenose mesmo em após a ingestão de 300 µg diários de Se.

Por outro lado, a deficiência de Se no solo e mananciais é questão de saúde pública em vários países e continentes, uma vez que a homeostase do organismo de animais e humanos é severamente comprometida. A taxa de prevalência de DCNT é maior nas regiões com solo pobre em Se, grande parte localizadas na China, Índia, Europa, América do Norte e Nova Zelândia (ROMAN, JITARU, and BARBANTE 2014).

Exemplo clássico de extrema deficiência de Se na dieta, < 20 µg Se /dia, é a doença de Keshan que é endêmica em áreas do nordeste e sudoeste da China e

caracterizada por cardiomiopatia e atrofia muscular graves (DUMONT, VANHAECKE, and CORNELIS 2006). A associação da doença de Keshan com a deficiência do Se foi descoberta somente na década de 1970 (CHEN 2012).

Estudo randomizado controlado realizado em neozelandeses mostrou que a ingestão duas castanhas-do-brasil ao dia foi suficiente para aumentar a atividade da GPx e esta resposta foi equivalente a 100 µg de SeMet purificada (THOMSON et al. 2008).

Entre os anos de 1999 e 2014 foi realizada a Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição nos Estados Unidos (NHANES) com 13292 adultos, idades entre 19 e 50 anos (62,3%) e a partir de 51 anos (37,5%) com diferentes etnias, nível de escolaridade e proporção similar entre os gêneros feminino e masculino. Os resultados mostraram que a ingestão de amêndoas e castanha-do-brasil diariamente foi suficiente para sanar a deficiência de nutrientes essenciais e fibras nesta população (O'NEIL et al. 2010).

Castanha-do-brasil na prevenção do câncer

Estudos sobre a prevenção do câncer utilizando castanha-do-brasil são realizados há longa data. Em uma época em que o Se puro já mostrava resultado anticarcinogênico promissor em ratos, (IP and LISK 1994) realizaram um estudo com castanha-do-brasil onde foi utilizado o modelo de indução de câncer mamário com 7,12, dimetilbenz [a] antraceno (DMBA) em ratos com deficiência de Se. A suplementação dietética com castanha-do-brasil e com o selenito de sódio, realizada em paralelo, iniciou duas semanas antes da aplicação do DMBA. A resposta inibitória do crescimento das células mamárias em ratos foi dose-dependente (1-3 µg Se /g de alimento) e similar entre ambos os grupos tratados, indicando que o efeito de anticarcinogênico da SeMet foi independente dos fitoquímicos existentes na castanha-do-brasil. Além disso, a reativação das selenoenzimas e o estoque de Se em músculos, fígado, rins e glândula mamária mostraram o potencial efeito antioxidante quimiopreventivo.

Nas últimas décadas vários estudos foram realizados para avaliar o efeito quimiopreventivo da SeMet utilizando concentração supranutricional (200 µg SeMet /dia) de SeMet em vários tipos de câncer. Apesar dos resultados promissores nos estudos pré-clínicos (CLARK et a., 1996), os ensaios clínicos não alcançaram o êxito

esperado, uma vez que a SeMet não causou diminuição do risco de câncer de próstata no grupo suplementado em relação ao grupo não suplementado (LIPPMAN et al., 2009). Além disso, no mesmo estudo a incidência de diabetes tipo 2 foi maior no grupo tratado em comparação ao placebo (ROCOURT ,CHENG 2013, AKBARALY et al. 2010, STRANGES et al. 2010).

Atualmente, devido ao resultado negativo do uso da SeMet como anticarcinogênica nestes amplos estudos, as investigações científicas têm buscado o melhor entendimento da interação do Se com o perfil nutricional de cada indivíduo e outros fatores, tais como idade, o tipo de câncer, a localização do tumor e as investigações genéticas, como por exemplo os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) de selenoproteínas (COMBS et al. 2012; MÉPLAN et al. 2010) ou interações epigenéticas (HU et al., 2016).

No campo das interações epigenéticas, a suplementação diária com castanha-do-brasil contendo 48 µg de Se; em adultos de ambos os sexos com idade entre 52 a 76 anos, por seis semanas consecutivas; foi suficiente para modificar positivamente o padrão dos indicadores moleculares de risco como a expressão da SePP1, que aumentou em 89% e a expressão da β-catenina, biomarcador de inflamação, que diminuiu significativamente em testes moleculares das biópsias retais (HU et al., 2016). Além disso, no mesmo trabalho foi demonstrado que a concentração de Se (SeMet) ingerida não modificou os níveis sanguíneos dos hormônios tireoidianos ou glicose, indicando que, na concentração e período de tempo referidos, o efeito da hiperglicemia foi afastado.

Vários estudos evidenciam, por exemplo, a interação entre o polimorfismo do gene humano da enzima superóxido dismutase, Val16Ala-MnSOD, e vários tipos de câncer, uma vez que este polimorfismo conduz ao desbalanço entre o ânion radical superóxido (S) e o peróxido de hidrogênio (PH) no interior da mitocôndria. O desbalanço S-PH com excesso de H₂O₂, que ocorre no homozigoto AlaAla-MnSOD, tem sido fortemente associado ao risco de desenvolvimento de câncer de mama (AMBROSONE et al. 1999); interfere na proliferação de células de câncer de próstata (BERTO et al., 2015) e em células de câncer colorretal (AZZOLIN et al., 2016). Na mesma linha, a interação entre o polimorfismo genético Val16Ala-MnSOD e a Seleno-L-metionina (SeMet) purificada resultou em um efeito nutrigenético em relação à expressão dos genes das (seleno)enzimas antioxidantes, que são essenciais para garantir a imunocompetência das células imunes (SCHOTT et al., 2017).

Castanha-do-brasil e diminuição do risco de doenças cardiovasculares

Doenças cardiovasculares (DCV) podem ser associadas à determinação genética bem como ao estilo de vida não saudável. Adultos com idade acima de 50 anos têm sido objeto de estudo para avaliar se a suplementação com a castanha-do-brasil tem efeito positivo minimizando os riscos de desenvolver DCV ou diminuir os sintomas clínicos da doença já instalada.

Estudo prévio (STRUNZ et al. 2008) mostrou um aumento nos indicadores de risco de DCV com o uso de castanha-do-brasil. No entanto, vários estudos posteriores apontam ao contrário. COLPO et al. (2013) mostraram que uma única ingestão de 20 g de castanha-do-brasil correspondente a 625 µg de Se ou 4 unidades de castanha foram suficientes para elevar o nível de colesterol HDL em indivíduos saudáveis e com idade entre 23 a 34 anos. Interessantemente, os parâmetros foram mantidos após 30 dias. Além do efeito antioxidante via selenoproteínas, os autores sugeriram o possível efeito benéfico dos ácidos graxos insaturados oleico e linoleico sobre o metabolismo dos lipídios.

Recentemente, outro estudo foi conduzido por HUGUENIN et al. (2015) em 125 pacientes acometidos por DCV; de ambos os sexos na faixa de idade entre 52 e 71 anos, em tratamento medicamentoso para DCV; os quais receberam diariamente através da dieta, por um período de três meses, 13 g castanha-do-brasil granulada e parcialmente desengordurada equivalente a 225.5 µg de Se e a correspondente quantidade de fitoquímicos antioxidantes e anti-inflamatórios existentes no granulado. Os resultados foram benéficos diminuindo os FRDCV com aumento dos níveis do HDL colesterol e diminuição da pressão arterial. Além disso, a atividade da GPx-3 plasmática aumentou evidenciando a melhora da capacidade antioxidante nos pacientes.

Os resultados divergentes obtidos em estudos importantes sobre do impacto do consumo de castanhas e nozes na prevenção de FRDCV foram analisados por várias meta-análises que avaliaram as diferenças entre estudos epidemiológicos e ensaios clínicos que utilizaram a castanha-do-brasil sozinha (GROSSO et al. 2015) ou associada a outras nozes na dieta (O'NEIL et al. 2015; DEL GOBBO et al. 2015); as referidas pesquisas concluíram que a ingestão da castanha-do-brasil sozinha ou combinada teve efeito positivo na adiposidade, diminuiu os níveis de triglicérides,

colesterol LDL e Apo A e elevaram os níveis de colesterol HDL na população testada.

Outra recente meta-análise mostrou que inclusão de amêndoas e sementes na dieta, incluindo a castanha-do-brasil, está relacionada com a diminuição da inflamação, melhora do perfil lipídico e, com isto, a diminuição dos fatores de riscos de doenças cardiovasculares (FRDCV); interessante, o amendoim foi o único a prevenir o acidente vascular encefálico (AUNE et al. 2016).

Conclusão

A atual revisão evidencia que a essencialidade do Se na dieta eleva a castanha-do-brasil a um patamar de consumo mundial. A deficiência de Se leva ao comprometimento global e severo do desenvolvimento da criança e desequilíbrio do estado de saúde do organismo humano e aumento do risco de câncer. Apesar do efeito anticarcinogênico do câncer colorretal, os estudos sobre o uso da castanha-do-brasil com fins de quimioprevenção são escassos.

Por outro lado, em relação às doenças metabólicas e DCV, diversas investigações epidemiológicas e meta-análises corroboram o efeito benéfico com a diminuição dos FRDCV a partir da inclusão da castanha-do-brasil na dieta, especialmente, em indivíduos com idade acima de 50 anos, o que também expressa um movimento mundial para melhorar a qualidade nutricional e o estilo de vida desta população.

Diante dos dados descritos nesta revisão, os autores sugerem mais estudos, especialmente, sobre o potencial efeito anticarcinogênico da castanha-do-brasil, considerando o estado de saúde e os fatores genéticos dos indivíduos, tais como polimorfismos de enzimas antioxidantes e de selenoproteínas.

Conflito de interesse

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Prof^a Dr^a Ivana Beatrice Mânica da Cruz pelas valiosas contribuições a este trabalho.

Referências

- AKBARALY, T. N. et al. Plasma selenium and risk of dysglycemia in an elderly French population: results from the prospective Epidemiology of Vascular Ageing Study. **Nutrition and metabolism**, v. 7, p. 21, 2010.
- ALMEIDA, CP. **Castanha do Pará sua exportação e importância na economia amazônica**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura. Serviço de Informação Agrícola, 1963.
- AMBROSONE, C. B. et al. Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) Genetic Polymorphisms, Dietary Antioxidants, and Risk of Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 59, p. 602–606, 1999.
- ARNÉR, E. S. J. Focus on mammalian thioredoxin reductases - Important selenoproteins with versatile functions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, p. 495–526, 2009.
- AUNE, D. et al. Nut consumption and risk of cardiovascular disease, cancer, all-cause and cause-specific mortality: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. **British Medical Journal**, p. 1–14, 2016.
- AZZOLIN, V. F. et al. Superoxide-hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response. **Toxicology in Vitro**, v. 32, p. 8–15, 2016.
- BALICK, M. J. **Useful Plants of Amazonia: A Resource of Global Importance**. Pergamon Press, New York, 1985.
- BERTO, M. et al. The effect of superoxide anion and hydrogen peroxide imbalance on prostate cancer: an integrative in vivo and in vitro analysis. **Medical Oncology**, v. 32, n. 11, p. 251–61, 2015.
- BICA, C. G. et al. Association of manganese superoxide dismutase gene polymorphism (Ala-9Val) and breast cancer in males and females. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 3, p. 219–225, 2007.
- BOYD, R. Selenium stories. **Nature Chemistry**, v. 3, n. 7, p. 570–570, 2011.
- BRASIL. Resolução ANVISA/MS RDC nº 269, de 22 setembro de 2005. **Regulamento Técnico Sobre Ingestão Diária Recomendada (IDR) Para Proteína, Vitaminas e Minerais**. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 2005.

BUCKLEY, D. P. *et al.* Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae): 1. Genetic variation in natural populations. **Theoretical and Applied Genetics**; v. 76, p. 923-8, 1988.

CANO, W. C. *et al.* Diverse local regulatory responses to a new forestry regime in forest communities in the Bolivian Amazon. **Land Use Policy**; v. 39, p. 224-232, 2014.

CARDARELLI, H. R.; OLIVEIRA, A. J. Conservação do leite de castanha-do-pará. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 4, p. 617–622, 2000.

CHANG, J. C. *et al.* Selenium content of brazil nuts from two geographic locations in Brazil. **Chemosphere**, v. 30, n. 4, p. 801–802, 1995.

CHEN, C.-Y.; LAPSLEY, K.; BLUMBERG, J. A Nutrition and health perspective on almonds. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 2245–2250, 2006.

CHEN, J. An original discovery: Selenium deficiency and Keshan disease (an endemic heart disease). **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 21, n. 3, p. 320–326, 2012.

CLAY, J. W. Brazil nuts: **The use of a keystone species for conservation and development.** In: Freese CH, editor. **Harvesting Wild Species – Implications for Biodiversity and Conservation.** Baltimore: John Hopkins University Press, 1997.

CLARK, L. C. *et al.* Effects of Selenium Supplementation for Cancer Prevention in Patients With Carcinoma of the Skin. A Randomized Controlled Trial. **The Journal of the American Medical Association**, v. 276, n. 24, p. 1957-1063, 1996.

COLPO, E. *et al.* A single consumption of high amounts of the Brazil nuts improves lipid profile of healthy volunteers. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

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

COMBS, G. F. *et al.* Differential responses to selenomethionine supplementation by sex and genotype in healthy adults. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. 10, p. 1514–1525, 2012.

COSSÍO-SOLANO, R. E. *et al.* **El Aprovechamiento de Madera en las Concesiones Castañeras (*Bertholletia excelsa*) en Madre de Dios, Perú: Un Análisis de su Situación Normativa.** Documento de Trabajo 56. CIFOR, Bogor, Indonesia, 2011.

CRONKLETON, P.; GUARIGUATA, M. R.; ALBORNOZ, M. A. Multiple use forestry planning: Timber and Brazil nut management in the community forests of Northern Bolivia. **Forest Ecology and Management**; v. 268, p. 49-56, 2012.

DEL GOBBO, L. C. et al. Effects of tree nuts on blood lipids, lipoproteins, and blood pressure: Meta-analysis and dose-response of 61 trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 102, p. 1347–56, 2015.

DINIZ, T. D. dA. S.; BASTOS, T. X. **Contribuição ao conhecimento do clima típico da castanha-do-brasil**. Boletim Técnico. IPEAN; n. 64, p. 59-71, 1974.

DUARTE, M. M. M. F. et al. Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. **Clinical Biochemistry**, v. 43, n. 13–14, p. 1118–1123, 2010.

DUCHELLE, A. E. et al. Evaluating the opportunities and limitations of Brazil nuts and timber in Western Amazonia. **Forest Ecology and Management**; v. 268, p. 39-48, 2012.

DUCHELLE, A. E.; ZAMBRANO, A. M. A. Smallholder Specialization Strategies along the Forest Transition Curve in Southwestern Amazonia. **World Development**; v. 55, p. 53-67, 2014.

DUMONT, E.; VANHAECKE, F.; CORNELIS, R. Selenium speciation from food source to metabolites : a critical review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 385, p. 1304–1323, 2006.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. **Human Vitamin and Mineral Requirements**. In: Report 7th Joint FAO/WHO Expert Consultation. Bangkok, Thailand. 2001.

FAIRWEATHER-TAIT, S. J. et al. Selenium in human health and disease. **Antioxidant and Redox Signaling**, v. 14, n. 7, p. 1337–1383, 2011.

FENECH, M. Genome health nutrigenomics and nutrigenetics - diagnosis and nutritional treatment of genome damage on an individual basis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 4, p. 1365–1370, 2008.

GOMES, S.; TORRES, A. G. Optimized extraction of polyphenolic antioxidant compounds from Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) cake and evaluation of the polyphenol profile by HPLC. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, p. 2805-2814, 2016.

GROSSO, G. et al. Nut consumption on all-cause , cardiovascular , and cancer mortality risk : a systematic review and meta-analysis of epidemiologic studies 1 – 4. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 101, p. 783–793, 2015.

GUTIERREZ, E. M. et al. Oxidative stability of crude oil from Brazil nuts. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**; v. 17, p. 22-27, 1997.

HAWKES, W. C.; ALKAN, F. Z.; OEHLER, L. Absorption, distribution and excretion of selenium from beef and rice in healthy North American men. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. 11, p. 3434–3442, 2003.

HU, Y. et al. Supplementation with Brazil nuts and green tea extract regulates targeted biomarkers related to colorectal cancer risk in humans. **British Journal of Nutrition**, v. 116, n. 11, p. 1901–1911, 7 Dec. 2016.

HUBER, J. **Mattas e Madeiras amazonicas**. Pará: C. Weingandt, 1910.
 HUGUENIN, G. V. B. et al. Improvement of antioxidant status after Brazil nut intake in hypertensive and dyslipidemic subjects. **Nutrition journal**, v. 14, n. 1, p. 54, Jan. 2015.

HURST, R. et al. Establishing optimal selenium status: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 91, n. 4, p. 923–931, 2010.

IP, C.; LISK, D. J. Bioactivity of selenium from Brazil nut for cancer prevention and selenoenzyme maintenance. **Nutrition and cancer**, v. 21, n. 3, p. 203–212, 1994.

JAMESON, R. R.; DIAMOND, A. M. A regulatory role for Sec tRNA [Ser] Sec in selenoprotein synthesis. **RNA Journal**, v. 10, p. 1142–1152, 2004.

LIPPMAN, M. S. et al. Effect of Selenium and Vitamin E on Risk of Prostate Cancer and Other Cancers The Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). **The Journal of the American Medical Association**, v. 301, n. 1, p. 39–51, 2009.

LU, J.; HOLMGREN, A. The thioredoxin antioxidant system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 66, p. 75–87, 2014.

MACFARQUHAR, M. J. K. et al. Acute Selenium Toxicity Associated With a Dietary Supplement. **Archive of Internal Medicine**, v. 170, n. 3, p. 256–261, 2011.

MARTENS, I. B. G. et al. Selenium status in preschool children receiving a Brazil nut-enriched diet. **Nutrition**, v. 31, n. 11–12, p. 1339–43, Jan. 2015.

MÉPLAN, C. et al. Genetic variants in selenoprotein genes increase risk of colorectal cancer. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 6, p. 1074–1079, 2010.

MORI, S. A.; PRANCE, G. T. Taxonomy, Ecology, and Economic Botany of the Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). **Advances in Economic Botany**, v. 8, n. April, p. 130–150, 1990.

MORITZ, A. **Estudos biológicos da floracão e frutificacão da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K)**. EMBRAPA- Centro de Pesquisas Agropecuárias do Trópico Úmido. Documento 29. Belém, Pará, 1984.

MÜLLER, C. H. **Castanha-do-brasil: estudos agronômicos**. EMBRAPA - Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Úmido. Documentos 1: 1-25, 1981.

NASCIMENTO, V. et al. Synthesis and biological evaluation of new nitrogen-containing diselenides. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 87, p. 131–139, 2014.

NELSON, B. W. Observations on flower visitors to *Bertholletia excelsa* .**Acta Amazonica** H.B.K. and *Couralan tenuicarpa* A. C. Sm. (Lecythidaceae).; v. 15, 225-234, 1985.

NÉMETH, A. et al. The relationship of selenium tolerance and speciation in Lecythidaceae species. **Metallomics : integrated biometal science**, v. 5, n. 12, p. 1663–73, 2013.

NISHI, S. K. et al. Nut consumption, serum fatty acid profile and estimated coronary heart disease risk in type 2 diabetes. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases**, v. 24, n. 8, p. 845–52, 2014.

O'NEIL, C. E. et al. Tree nut consumption improves nutrient intake and diet quality in US adults: An analysis of national health and nutrition examination survey (NHANES) 1999-2004. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 19, n. 1, p. 142–150, 2010.

O'NEIL, C. E.; FULGONI, V. L.; NICKLAS, T. A. Tree Nut consumption is associated with better adiposity measures and cardiovascular and metabolic syndrome health risk factors in U.S. Adults: NHANES 2005-2010. **Nutrition journal**, v. 14, p. 64, 2015.

OTTEN, J. J.; HELLWIG, J. P.; MEYERS, L. D. IOM (INSTITUTE OF MEDICINE). **Dietary Reference Intakes: The essential guide to nutrient requirements**. Washington, DC: The National Academies Press, 2006. 1329 p.

PERES, C. A.; BAIDER, C. Seed dispersal, spatial distribution and population structure of Brazilnut trees (*Bertholletia excelsa*) in southeastern Amazonia. **Journal of Tropical Ecology**, v. 13, n. 4, p. 595–616, 1997.

PRANCE, G. T. The pollination and androphore structure of some Amazonian Lecythidaceae. **Biotropica**, v. 8, n. 4, p. 235–241, 1976.

ROCOURT, C. R. B.; CHENG, W. H. Selenium supranutrition: Are the potential benefits of chemoprevention outweighed by the promotion of diabetes and insulin resistance? **Nutrients**, v. 5, n. 4, p. 1349–1365, 2013.

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

SANTOS, C. F.; ABSY, M. L. Polinizadores de *Bertholletia excelsa* (Lecythidales: Lecythidaceae): Interações com Abelhas sem Ferrão (*Apidae: Meliponini*) e Nicho Trófico. **Neotropical Entomology**; v. 39, p. 854-861, 2010.

SANTOS, O. V. et al. Comparative parameters of the nutritional contribution and functional claims of Brazil nut kernels, oil and defatted cake. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 841–847, 2013.

SCHOTT, K. L. et al. Superoxide-hydrogen peroxide genetic imbalance modulates differentially the oxidative metabolism on human peripheral blood mononuclear cells exposed to seleno-L-methionine. **Chemico-Biological Interactions**, v. 273, p. 18–27, 2017.

SMYTHE, N. The natural history of the Central American agouti (*Dasyprocta punctata*). **Smithsonian Contributions to Zoology**; v. 257, p. 1-51, 1978.
SOUZA, A. H. **Castanha do Pará: Estudo botânico, químico e tecnológico**. Rio de Janeiro: SIA, 1963.

STEINBRENNER, H.; SPECKMANN, B.; KLOTZ, L. O. Selenoproteins: Antioxidant selenoenzymes and beyond. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 595, p. 113–119, 2016.

STRANGES, S. et al. Selenium status and cardiometabolic health: State of the evidence. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 20, n. 10, p. 754–760, 2010.

STRUNZ, C. C. et al. Brazil nut ingestion increased plasma selenium but had minimal effects on lipids, apolipoproteins, and high-density lipoprotein function in human subjects. **Nutrition Research**, v. 28, n. 3, p. 151–155, 2008.

THOMSON, C. D. et al. Brazil nuts : an effective way to improve selenium status 1 – 3. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, n. 87, p. 379–384, 2008.

VEGA, C. M. et al. Selenium Levels in the Whole Blood of Children and Teenagers from Two Riparian Communities at the Madeira River Basin in the Western Brazilian Amazon. **Biological Trace Element Research**, 2011.

WADT, L. H.O., *et al.* Sustainable forest use in Brazilian extractive reserves: Natural regeneration of Brazil nut in exploited populations. **Biological Conservation**; v. 141, p. 332-346, 2008.

WADT, L. H. O.; KAINER K. A.; GOMES-SILVA D. A. P. Population structure and nut yield of a *Bertholletia excelsa* stand in Southwestern Amazonia. **Forest Ecology and Management**; v. 22, p. 371-384, 2005.

WIJERATNE, S. S. K.; AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of almonds and their by-products in food model systems. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 83, n. 3, p. 223–230, 2006.

WWF-Brasil. **Castanheira-do-Brasil: grandiosa e ameaçada**. Disponível em:<http://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/especiais/biodiversidade/especie_do_mes/fevereiro_castanheira_do_brasil.cfm>. Acesso em: 20 de abril de 2017.

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

ZENTENO, M. *et al.* Learning from the past: Trends and dynamics in livelihoods of Bolivian forest communities. **Environmental Science and Policy**; v. 40, p. 36-48, 2014.

ZENTENO, M. *et al.* Livelihood strategies and forest dependence: New insights from Bolivian forest communities. **Forest Policy and Economics**; v. 26, p. 12-21, 2013.

3 ARTIGO 2 – SUPEROXIDE-HYDROGEN PEROXIDE GENETIC IMBALANCE MODULATES DIFFERENTIALLY THE OXIDATIVE METABOLISMO ON HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS EXPOSED TO SELENO-L-METHIONINE

Chemico-Biological Interactions 273 (2017) 18–27



Contents lists available at ScienceDirect

Chemico-Biological Interactions

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chembioint



Superoxide-hydrogen peroxide genetic imbalance modulates differentially the oxidative metabolism on human peripheral blood mononuclear cells exposed to seleno-L-methionine



Karen Lilian Schott ^{a,b}, Charles Elias Assmann ^{a,b}, Fernanda Barbisan ^{a,c},
Verônica Farina Azzolin ^{a,c}, Beatriz Bonadiman ^{a,c},
Marta Maria Medeiros Frescura Duarte ^d, Alencar Kolinski Machado ^{a,c},
Ivana Beatrice Mânica da Cruz ^{a,b,c,*}

^a Biogenomics Laboratory, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^b Graduate Program of Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^c Graduate Program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^d Lutheran University of Brazil, Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 March 2017

Received in revised form

20 April 2017

Accepted 7 May 2017

Available online 8 May 2017

Keywords:

Val16Ala-MnSOD gene polymorphism

Selenium

Selenoproteins

Thioredoxin reductase

Immune cell

ABSTRACT

Superoxide-hydrogen peroxide (S-HP) imbalance genetically caused by a gene polymorphism in the human manganese superoxide dismutase enzyme (Val16Ala-MnSOD) is associated with several diseases. Into mitochondria, MnSOD catalyses superoxide radical producing HP and oxygen. Ala-MnSOD genotype presents a high MnSOD efficiency and generates the highest HP concentrations that has been associated with the risk of several cancer types. Cellular selenoenzymes glutathione peroxidase and thioredoxin reductase (TrxR) and catalase (CAT) are essential to HP removal produced in excess in cells. Since, synthesis and activities of selenoenzymes are selenium dependent, we hypothesized that AA-MnSOD cells could have an improvement on antioxidant status undergoing Seleno-L-methionine (SeMet) treatment. This study performed an in vitro protocol to evaluate the response of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) carriers of different Val16Ala-MnSOD genotypes exposed to SeMet. SeMet effects on cell viability, apoptosis induction and modulation of oxidative variables were determined using spectrophotometric, flow cytometry, fluorimetric and immunoassays. Gene modulation of antioxidant enzymes was also performed by qRT-PCR. From an initial protocol using heterozygous (AV) cells was determined that 1nM SeMet presented a cytoprotective effect. However, whereas this concentration did not change AA viability, in VV cells it was cytotoxic by increasing necrosis events. SeMet induced higher selenoenzymes levels in AA and VV cells and decreased oxidative markers levels including DNA damage. The results suggest a pharmacogenetic positive response of SeMet effect on AA-cells. Future studies in vivo could be essential to evaluate the potential clinical impact of S-HP imbalance after use of foods or supplements containing SeMet.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: Ala, alanine; CAT, catalase E.C. 1.11.1.6; DTNB, 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid); Fe²⁺, ferrous iron; GPx, glutathione peroxidase EC 1.11.1.9; NO, nitric oxide; O₂⁻, superoxide radical; OH[•], hydroxyl radical; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PBS, phosphate-buffered saline; PI, propidium iodide; RSe⁻, selenide anion; Sec, selenocysteine amino acid; SeMet, seleno-L-methionine; SePnp, selenophosphate; S-HP, Superoxide-hydrogen peroxide; SOD, superoxide dismutase; SPS2, selenophosphate synthetase 2; T, thymine; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; tRNA, transfer ribonucleic acid; tRNA^{Sec}, selenocysteine designated tRNA; TrxR, thioredoxin reductase EC 1.8.1.9; Val, valine; Val16Ala-MnSOD, human manganese superoxide dismutase gene polymorphism.

* Corresponding author. 1000 Roraima Av., Building 19, Room 3101, Santa Maria, RS, 97105900, Brazil.

E-mail address: ivana.biogenomica@gmail.com (I.B.M. da Cruz).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2017.05.007>

0009-2797/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Aerobic cells continually produce different reactive oxygen species (ROS), such as superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$), as a secondary product of mitochondrial respiration. Some evidences described 11 different mitochondrial locations that produced $O_2^{\cdot-}$ [1]. $O_2^{\cdot-}$ has biological functions, as an important molecule acting through the immune system response against different antigenic agents. However, the excess of this molecule conduces to oxidative stress. In this sense, $O_2^{\cdot-}$ excess needs to be removed by enzymatic action, initially performed by superoxide dismutase enzymes (SOD). One of the most important antioxidant enzymes is the SOD manganese-dependent (MnSOD) which acts just into mitochondria. This enzyme catalyses [2] the dismutation of $O_2^{\cdot-}$ to hydrogen peroxide (H_2O_2), which is subsequently reduced to water, mainly by glutathione peroxidase (GPx) and also by thioredoxin reductase (TrxR) [3,4]. The excess of H_2O_2 that diffuses through mitochondria membranes to cytosol can be removed by catalase enzyme [5].

MnSOD is encoded by a nuclear gene (*MnSOD* gene). After cellular transcription, an inactive cytoplasmic MnSOD protein is produced, which has a signaling polypeptide sequence called mitochondrial target sequence (MTS) that triggers the MnSOD protein into the mitochondria where this molecule becomes an active antioxidant enzyme [6]. In humans, there is a *MnSOD* single nucleotide polymorphism (SNP) that results in a nucleotide substitution, from thymine to cytosine. This *MnSOD* SNP is located in exon 2 (rs4880) and changes a valine (V; GTT sequence) to alanine (A; GCT sequence), codon 16 in chromosome 6, region 6q25.3 (Val16Ala-MnSOD SNP). This genetic modification results in two MnSOD protein phenotypes: the V-allele produces a beta (β)-sheet protein and the A-allele produces an alpha (α)-helix protein. The protein conformation change has an important impact on MnSOD efficiency. It is because the majority of the VV-MnSOD protein is embedded within the mitochondrial inner membrane leading to low-efficiency in the $O_2^{\cdot-}$ to H_2O_2 conversion. On the other hand, AA-MnSOD protein easily crosses both mitochondrial membranes increasing MnSOD efficiency [7,8].

An epidemiological study observed an association between breast cancer risk and Ala-MnSOD genotype was realized by Ambrosone et al. [9]. Additionally, this study also demonstrated a relationship between breast cancer risk and the dietary pattern. Women with Ala-MnSOD genotype that have high vegetable and fruit consumption presented decreased breast cancer risk.

From these data, it was hypothesized that high breast cancer risk associated with Ala-MnSOD genotype could be related with absent positive feedback of enzymes that catalyzed H_2O_2 to water into the mitochondria. Consequently, mitochondrial H_2O_2 excess crossover to cytoplasm can react with transition metals, such as ferrous iron (Fe^{2+}), producing hydroxyl radical (OH^{\cdot}) [10]. The OH^{\cdot} has a high affinity for DNA, causing mutations and chromosomal instability that are directly related with carcinogenesis. Additionally, recent metabolic and pharmacological investigations with in vitro superoxide-hydrogen peroxide (S-HP) imbalance in colorectal and prostate cancer cells corroborate with these hypothesis [11,12].

Despite all recent investigations were about S-HP imbalance and cancer risk, there are no scientific evidences describing the interaction of the MnSOD polymorphism and the enzymatic regulation, including GPx and TrxR that catalyses H_2O_2 . To elucidate this question, the present study analyzed in vitro differential oxidative metabolism regulation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) carrier's different Val16Ala-MnSOD genotypes exposed to seleno-L methionine (SeMet), a molecule that is closely related with GPx and TrxR synthesis and activities and is found in the most vegetables and in high amount in the Brazil' nuts [13].

2. Materials and methods

2.1. General experimental design

Three in vitro protocols were performed with PBMC samples obtained from healthy volunteers previously genotyped for Val16Ala-MnSOD SNP (Supplementary Material – Fig. 1). The study here described is part of a research project previously approved by the Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria, Brazil (N° 23081.015838/201110).

The first in vitro experimental protocol was performed using only PBMC from volunteers carrying the AV-MnSOD genotype. It was used to determine the best SeMet concentration that did not conduct to cytotoxic effects. This determination was realized by concentration-response curve of mitochondrial metabolism and cellular viability biomarkers. In the second protocol, PBMC of different MnSOD genotypes underwent SeMet treatment, and the viability profile for each genotype was analyzed via flow cytometry and caspases activities. The third protocol was performed to determine the SeMet regulation on different antioxidant enzymes, including selenium dependent or not, and also to measure the effect of this molecule in oxidant variables and products of oxidation through several colorimetric, fluorimetric, and molecular assays.

2.2. Sample population and Val16Ala-MnSOD SNP genotyping

All procedures performed in this study involving human volunteers were in accordance with the ethical institutional standards and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration. Informed consent was obtained from each volunteer. One hundred and twenty subjects from the Federal University of Santa Maria (Santa Maria, RS, Brazil) community were invited to participate in this research. Most of the volunteers were undergraduate students with similar habitual activities. All subjects presented similar health, anthropometric and lifestyle conditions, including no previous history of any chronic degenerative disease or dysfunction that could influence the results. Exclusion criteria included smoking habits, obesity, and previous history of non-transmissible diseases, chronic use of medication or vitamin supplementation, and other dysfunctions. Blood samples were collected by venous puncture in EDTA anticoagulant tubes.

Val16Ala-MnSOD genotyping was conducted following the protocol described by Ruiz-Sanz et al. [14] with slight adaptations published by Barbisan et al. [15]. The isolation of the genomic DNA and amplification of the *MnSOD* gene segment was performed by amplification refractory mutation system polymerase chain reaction (ARMS-PCR) analysis using the following primers: F1 (forward): CACCAGCACTAGCAGCATGT; F2 (forward): GCAGGCA GCTGGCTACGGT; R1 (reverse): ACGCCTCTGGTACTTCTCC; R2 (reverse): CCTGGAGCCCAGATACCCTAAAG. Chi-squared calculations were performed to determine if samples were in Hardy-Weinberg equilibrium. From those 120 genotyped subjects, we selected AA, AV and Val-MnSOD genotype carriers to obtain blood samples to perform all the in vitro protocols. Each volunteer donated a minimum of three fasting blood samples for triplicate analysis. Volunteers were asked to avoid food consumption such as vegetables and fruits or take vitamin supplements 24 h before the blood collection, in order to minimize the effects on cellular oxidative metabolism.

2.3. PBMC cell culture and SeMet treatments

Initially, total blood samples were collected from three volunteers just of AV-MnSOD genotype to evaluate SeMet effect disregarding other genotypes. PBMC cells were isolated by

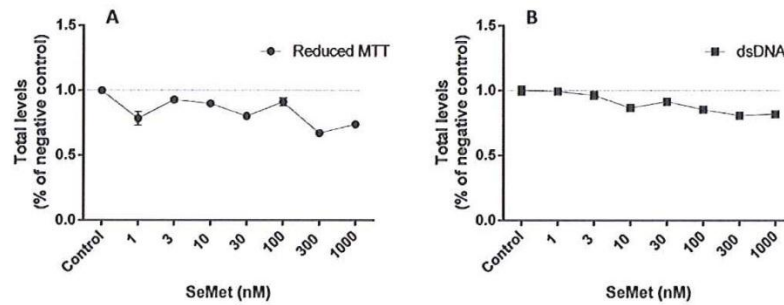


Fig. 1. Concentration-response SeMet curves of (A) mitochondrial metabolism and (B) cellular viability biomarkers. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Dunnett's test. A p value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

Histopaque[®] (Sigma-Aldrich – 10771; São Paulo, SP, Brazil) density gradient cell separation in the proportion Histopaque[®]/total blood (proportion 1/2) followed by centrifugation at 2,500 rpm for 10 min. The pellet was resuspended in phosphate-buffered saline (PBS 50 mM, pH 7.4) and centrifuged for three times at the same conditions. The viable cell concentration was quantified by trypan blue staining technic. Isolated 5×10^6 PBMC/mL were kept in cell culture ideal conditions in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Sigma-Aldrich – R8758; São Paulo, SP, Brazil), with 10% of fetal bovine serum (FBS) (Gibco[®] Thermo Fisher – 10437028), and supplemented with 1% of antibiotic (10,000 U/mL penicillin; 10 mg/mL streptomycin) (Gibco[®] Thermo Fisher – 15140122; São Paulo, SP, Brazil) in an incubator at 5% CO₂, 37 °C, and humid atmosphere during 24 h. Then, cells were treated with SeMet at 0, 1.0, 3.0, 10, 30, 100, 300 and 1000 nM during 24 h of incubation, in order to determine the most effective concentration of this molecule. In a second moment, total blood samples were collected from 9 different volunteers (3 of each MnSOD genotype) following the same cell culture procedures described above to perform all the another treatments and assays, using only the most effective concentration of SeMet.

2.4. Mitochondrial metabolism and cellular viability assays

Concentration-response curves were performed for the evaluation of the lowest concentration that causes disturbance on balanced AV-PBMC. The tested concentrations were 1, 3, 10, 30, 100, 300 and 1000 nM SeMet corresponding to 0.078, 0.2369, 0.78964, 2.3689, 7.8964, 23.689 and 78.964 ng Se/mL, respectively.

2.4.1. Mitochondrial metabolism evaluation

After AV-MnSOD PBMC treatments with SeMet, cells were submitted to MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich – M2128; St. Louis, MO, USA) assay following instructions previously published by Ref. [16] to determine the most effective concentration of SeMet on cell mitochondrial metabolism from the concentration-response curve. Absorbance was determined at 560 nm wavelength using a SpectraMax[®] i3 Multimode plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). MTT assay is an important tool to measure cell viability and proliferation; however, it can be used as a cellular metabolism parameter once the MTT reagent needs necessarily to be metabolized by mitochondrial enzymes [16].

2.4.2. Free double-strand DNA quantification

To confirm the viability results, double-strand (ds) DNA was measured in supernatant using Quant-IT[™] PicoGreen[®] dsDNA kit

(Thermo Fischer-P7589; São Paulo, SP, Brazil). Samples were kept during 5 min of incubation with the reagent. Fluorescence was determined at 480 nm of excitation and 520 nm of emission wavelength to determine cell mortality as described by Ref. [17], using a SpectraMax[®] i3 Multimode plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). The fluorescence emission of each sample is proportional to the amount of free-(ds) DNA and also to the levels cell mortality.

2.5. Apoptosis induction measurement

2.5.1. Flow cytometry analysis

Apoptosis induction was measured in PBMC from subjects with different genotypes of MnSOD enzyme using only the most effective concentration of SeMet previously determined through the concentration-response curve. Flow cytometry was performed using the FITC annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen[™]-556463; San Jose, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Cells were analyzed using a BD Accuri[™] C6 Plus (BD Pharmingen[™]; San Jose, CA, USA).

2.5.2. Caspases cascade activity

To complement the apoptosis cascade activation analysis, caspases 1, 3, and 8 activities were quantified in cell culture supernatant using the Quantikine Human Caspase Immunoassay[®] (R&D Systems - KM300; Minneapolis, MN, USA) following the manufacturer instructions. The enzyme-linked immunosorbance reaction was measured by Multiskan[®] EX plate reader (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA).

2.6. Evaluation of oxidative metabolism regulation

2.6.1. Analysis of oxidant molecules

The effect of SeMet in MnSOD PBMC on total levels of ROS was also evaluated by 2,7 dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich-D6883; St. Louis, MO, USA) assay following instructions described by Ref. [18] to measure total levels of ROS in each treated sample. Fluorescence emission was determined at 488 nm of excitation and 525 nm of emission wavelength.

Superoxide radical (O₂^{•-}) was also measured through a colorimetric protocol following instructions published by Ref. [19] to evaluate the generation of this molecule under different conditions of oxidative metabolism found in different MnSOD genotypes. Absorbance was determined at 540 nm wavelength.

As nitric oxide (NO) is an important signaling molecule at several reactions and under imbalanced conditions acts as an oxidant molecule, total cellular levels of NO were quantified

through a colorimetric assay by organic nitrate detection as previously described by Ref. [20]. Absorbance was measured at 540 nm wavelength.

All these three different assays to evaluate oxidant molecules were analyzed in a SpectraMax[®] i3 Multimode plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

2.6.2. Catalytic activity and gene expression of antioxidant enzymes

The influence of SeMet on enzymatic activity of different antioxidant enzymes was evaluated through spectrophotometric assays. Total SOD activity was measured as previously described by Spitz and Oberley [21]; CAT activity was determined following Aebi (1984) instructions [22]; GPx activity was assayed using an indirect classical method published by Paglia and Valentine [23] based on the oxidation of NADPH; TrxR enzyme activity was calculated following instructions previously published by Björnstedt et al. [24]. Also, to complement the enzymatic activity evaluations, gene expression of each antioxidant enzyme was determined by qRT-PCR. After all the treatments the RNA was extracted using Trizol[®] reagent (Thermo Fischer-15586026; São Paulo, SP, Brazil). RNA was quantified by NanoDrop[™] 1000 Spectrophotometer System[®] (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Then, RNA samples were converted to complementary DNA (cDNA) using a QuantiTect[®] Reverse Transcription Kit (Qiagen-205311; São Paulo, SP, Brazil). Real time PCR was performed as previously described by Machado et al. [25] using a QuantiFast SYBR[®] Green PCR Kit (Qiagen-204054; São Paulo, SP, Brazil) in a real time machine Rotor Gene[®] Q (Qiagen; São Paulo, SP, Brazil). The specific SOD1, SOD2, CAT, GPx, and TrxR primers are described below (Table 1). Beta-actin (β -actin) was used as housekeeping gene to normalize all gene expression of tested samples.

2.6.3. Analysis of products of oxidation

Lipid peroxidation was determined in SeMet treated PBMC from subjects of different Mn-SOD genotype through thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) spectrophotometric assay, following instructions described by Ref. [26]. The reaction between malondialdehyde (MDA) and thiobarbituric acid was measured at 535 nm.

The effect of SeMet treatment at intracellular proteins was analyzed by a spectrophotometric assay to investigate protein carbonylation, following instructions published by Ref. [27]. Differential colorimetric formation was measured at 370 nm.

Additionally, to explore possible DNA oxidation induced by the SeMet treatment, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) evaluation was performed by immunosorbent assay using Bioxytech[®] Kit following the manufacturer's instruction.

2.7. Statistical analysis

Allele frequencies were estimated using Chi square analysis to estimate the Hardy–Weinberg equilibrium. All experiments are realized in three independent times. Data were firstly analyzed with Microsoft Excel software to calculate media and standard deviation. All oxidative metabolism data were normalized by mg of

protein. The concentration-response SeMet curve was analyzed by one-way analysis of variance followed by the Dunnett's test. All others assays' results were analyzed using paired Student's *t*-test. A *p* value ≤ 0.05 was considered statistically significant. All variables were analyzed with Graph Pad Prism software version 6.01.

3. Results

3.1. Sample population and Val16Ala-MnSOD SNP genotyping

The MnSOD genotype frequencies were as follow: VV ($n = 33$, 27.5%), AA ($n = 32$, 26.7%) and AV ($n = 55$, 45.8%) (Supplementary material – Fig. 1). The frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium ($p = 0.361$). From these samples (Supplementary material – Table 1) were selected subjects with similar lifestyle pattern to perform in vitro protocols.

3.2. Mitochondrial metabolism and cellular viability

Mitochondrial metabolism and cellular viability assays were performed to select the most effective concentration of SeMet in PBMC. These initial assays were conducted only in cells from AV-MnSOD genotype subjects to evaluate the general effect of different concentrations of SeMet, disregarding other MnSOD genotypes. All SeMet concentrations were able to decrease PBMC mitochondrial metabolism compared to negative control at MTT assay (Fig. 1 A). However, from 10 to 1000 nM of SeMet a significant decrease of free dsDNA in supernatant was observed, being a biomarker of cellular viability (Fig. 1 B). On the other hand, in the same time that 1 nM of SeMet presented mitochondrial metabolism reduction the cell viability was kept similarly to negative control. In this sense, all other treatments and experiments of PBMC from subjects of different MnSOD genotypes were performed using only 1 nM of SeMet.

3.3. Apoptosis induction

Apoptosis induction measurements were performed in PBMC from donors of different MnSOD genotypes exposed to 1 nM of SeMet during 24 h. Flow cytometry analysis (Fig. 2 A) showed a SeMet non-cytotoxic effect in AA and AV MnSOD genotypes. However, in VV-MnSOD cells a significant increase of necrotic cell population and the reduction of live cells amount after SeMet exposition were observed compared to untreated cells. On the other hand, caspases 1, 3 and 8 activities (Fig. 2 B) were reduced after SeMet 24 h exposition compared to untreated cells for all MnSOD genotypes.

3.4. Oxidative metabolism

MnSOD genotypes cellular oxidative metabolism response after SeMet exposition was assessed through several experimental variables (Table 2). Different oxidant molecules were analyzed after PBMC treatments. The presence of 1 nM SeMet significantly

Table 1
Primer sequences used for Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR).

Genes	Primers	
	Forward Sequence	Reverse Sequence
β -actin	TGTGGATCAGCAAGCAGGACTA	TGCCAAGTAGGTTTGTCGA
MnSOD	GCACACTGGTGGTCCATGAA	ACACCACAAGCCAAAGCACTT
CuZnSOD	GCCTTGAACCTCACATCAA	GGTACTTCTCTCGGTGACGTT
GPx-1	GGTTTTATCTATGAGGGTGTTC	GCCTTGGTCTGGCAGAGACT
TrxR	GCCTTGAAGACTCTCGAAATTA	GCCATAAGCATTCTATAGACGA
CAT	GATAGCTTCGACCCAAGCA	ATGCGCGTGAGTTCAGGAT

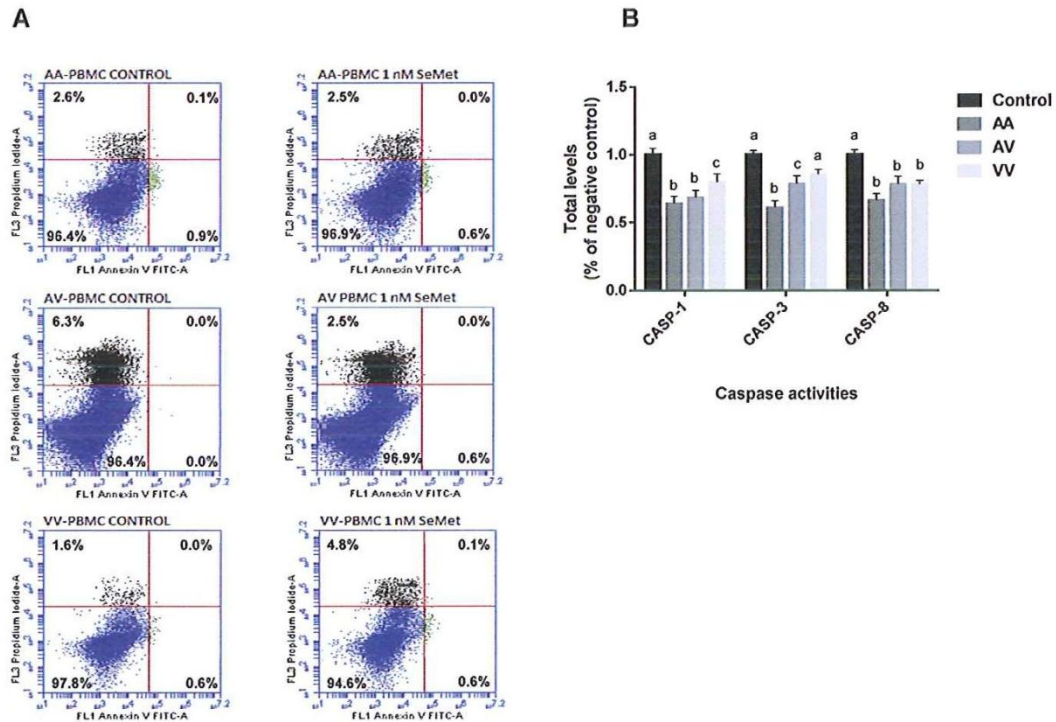


Fig. 2. (A) Representative cell viability evaluated by flow cytometry using propidium iodide (PI) and annexin V that detect apoptosis induction in PBMC carriers of different Val16Ala-MnSOD genotypes exposed to 1 nM SeMet. The method employed counts an absolute number of 10000 cells per sample. Populations were easily distinguished in live cells (PI⁻ Annexin V⁻, lower left), early apoptotic cells (PI⁻ Annexin V⁺, shown in lower right), late apoptotic/dead cells (PI⁺ Annexin V⁻, upper right) and necrotic cells (PI⁺ Annexin V⁺, upper left). Data was acquired on a BD Accuri C6 flow cytometer using BD Accuri C6 software. Treatment group was compared with the untreated control group within each genotype by Student's *t*-test. A *p* value ≤ 0.05 was considered statistically significant. (B) Caspase activities response. Interaction between Val16Ala-MnSOD gene polymorphism and 1 nM SeMet treatment on PBMC of different genotypes. Treatment group was compared with the untreated control group within each genotype by Student's *t*-test. A *p* value ≤ 0.05 was considered statistically significant. Different letters express significant difference between groups.

increased total levels of ROS in AA-MnSOD cells, and decreased in AV-MnSOD cells. Additionally, cellular levels of O₂^{•-} were reduced in AA and VV MnSOD genotypes, while this molecule was increased in AV subjects. Whereas, NO cellular production was also significantly decreased in AA-MnSOD cells and increased in VV-MnSOD cells following 1 nM SeMet exposition. Complementing the oxidative metabolism regulation analysis, antioxidant enzymes activities were measured. Treated AA-MnSOD cells presented significant increased levels of SOD, GPx, TrxR, but not CAT compared to untreated cells. AV-MnSOD cells exposed to SeMet showed decreased activity of all antioxidant enzymes (SOD, GPx, and TrxR) evaluated in this study, except for CAT, while VV-MnSOD PBMC indicated increased activity levels of GPx, CAT, and TrxR enzymes. However, for this genotype SOD activity was reduced after SeMet exposition. With the aim to explain the antioxidant enzymes regulation, gene expression analysis was also performed (Fig. 3). Compared to untreated cells, SeMet treated AA-MnSOD PBMC presented overexpression of SOD1 and SOD2. However, TrxR and CAT gene expression were decreased for this genotype while non-significant result was observed for GPx-1 enzyme gene expression. Additionally, AV-MnSOD genotype antioxidant enzymes gene expression was also modulated by 1 nM SeMet exposure, these cells showed downregulation of SOD1, SOD2, GPx, and mainly CAT, while TrxR gene expression was upregulated compared to AV-MnSOD

negative control. Moreover, in VV-MnSOD PBMC, SeMet negatively modulated all antioxidant enzymes gene expression, except TrxR that was significantly upregulated compared to VV-MnSOD PBMC negative control.

Finally, to complete all the cellular oxidative variables, different oxidation markers were assessed through colorimetric and enzymatic assays. The obtained results showed that AA-MnSOD PBMC treated with 1 nM SeMet presented reduction of all oxidation products biomarkers evaluated, significantly decreasing lipid peroxidation, protein carbonylation, and DNA damage, compared to AA-MnSOD PBMC negative control. A similar profile of response was observed in AV-MnSOD cells, when exposed to SeMet, protein carbonylation and DNA damage reduced drastically, however, there was no significant result observed for lipid peroxidation. On the other hand, VV-MnSOD PBMC had increased levels protein oxidation, while TBARS levels were similar in comparison with negative control and 8-OHdG was decreased.

4. Discussion

The present investigation was realized based on the hypothesis that SeMet could improve the functionality of selenoenzymes GPx-1 and TrxR, minimizing AA-MnSOD imbalance which seemed to produce high H₂O₂ levels due to major MnSOD enzymatic efficiency

Table 2

PBMC carriers of Val16Ala-MnSOD genotype exposed to 1 nM SeMet were compared with correspondent negative control. PBMC were maintained in RPMI culture medium for 48 h. Oxidative metabolism variables were analyzed. Statistical analysis data were plotted as mean \pm standard deviation and analyzed using Student's *t*-test. A *p* value \leq 0.05 was considered statistically significant. OD₅₄₀, optical density at 540 nm; OD₅₅₀, optical density at 550 nm; ptn, protein.

Val16Ala-genotypes	AA				AV				VV			
	Control	SeMet	Mean Diff. (%)	<i>p</i> value	Control	SeMet	Mean Diff. (%)	<i>p</i> value	Control	SeMet	Mean Diff. (%)	<i>p</i> value
Superoxide radical (OD ₅₅₀ \times 10 ⁻³ /mg ptn)	0.559 \pm 0.016	0.470 \pm 0.051	-16.000	\leq 0.001	0.418 \pm 0.024	0.474 \pm 0.012	+13.400	\leq 0.001	0.659 \pm 0.015	0.477 \pm 0.032	-27.600	\leq 0.0001
ROS (Fluorescence Intensity \times 10 ³ /mg ptn)	143.881 \pm 4.787	158.319 \pm 0.964	+10.000	\leq 0.01	169.659 \pm 6.303	154.258 \pm 3.687	-9.100	\leq 0.01	159.483 \pm 4.615	165.771 \pm 3.148	+3.900	NS
Nitric Oxide (OD ₅₄₀ \times 10 ⁻³ /mg ptn)	107.115 \pm 3.319	98.254 \pm 3.715	-9.908	\leq 0.01	114.035 \pm 2.469	110.264 \pm 4.559	-4.146	NS	107.240 \pm 1.373	118.537 \pm 1.627	+10.240	\leq 0.001
SOD (U SOD/mg ptn)	4.730 \pm 0.057	5.838 \pm 0.238	+23.400	\leq 0.0001	2.871 \pm 0.141	2.529 \pm 0.129	-11.900	\leq 0.005	2.625 \pm 0.163	1.510 \pm 0.134	-42.500	\leq 0.0001
GPx-1 (μ mol of oxidized NADPH /min/mg ptn)	1.346 \pm 0.06	1.733 \pm 0.030	+28.780	\leq 0.0001	2.002 \pm 0.054	0.274 \pm 0.026	-86.300	\leq 0.0001	2.042 \pm 0.036	5.781 \pm 0.026	+183.00	\leq 0.0001
TrxR (nmol of reduced DTNB/min/mg ptn)	49.084 \pm 0.427	62.925 \pm 0.596	+28.200	\leq 0.0001	29.118 \pm 0.380	28.989 \pm 0.593	-12.400	\leq 0.0001	15.868 \pm 0.356	21.628 \pm 0.932	+36.300	\leq 0.0001
CAT (nmol of reduced H ₂ O ₂ /min/mg ptn)	2.440 \pm 0.025	2.177 \pm 0.039	-10.800	\leq 0.0001	1.062 \pm 0.021	3.666 \pm 0.041	+245.100	\leq 0.0001	1.315 \pm 0.039	1.606 \pm 0.031	+22.110	\leq 0.0001
TBARS (μ mol MDA/mg ptn)	0.110 \pm 0.002	0.067 \pm 0.004	-38.900	\leq 0.0001	0.075 \pm 0.001	0.074 \pm 0.002	-2.300	NS	0.054 \pm 0.002	0.055 \pm 0.001	+2.400	NS
Protein carbonyl (nmol carbonylated protein/mg ptn)	2.711 \pm 0.062 ^a	2.357 \pm 0.051	-22.400	\leq 0.005	2.928 \pm 0.111	2.350 \pm 0.137	-19.700	\leq 0.0001	2.505 \pm 0.291	2.849 \pm 0.015	+13.700	\leq 0.01
8-OHdG (ng/mg ptn)	2.507 \pm 0.177	1.638 \pm 0.068	-34.700	\leq 0.0001	3.107 \pm 0.172	2.394 \pm 0.120	-23.000	\leq 0.0001	3.590 \pm 0.232	3.139 \pm 0.08	-12.600	\leq 0.05

compared to AV and Val-MnSOD genotypes [2]. In general, results corroborated this hypothesis tested from an experimental study with different MnSOD genotypes volunteers, using PBMC samples. As selenoproteins play an important role in controlling the concentration of oxidant molecules at immune cells [28,29], initially, a concentration-response SeMet curve was performed using just balanced AV-SOD cells. This analysis was used to select the most effective concentration of this molecule disregarding MnSOD genotypes differences. All SeMet concentrations tested in this study were able to reduce cellular mitochondrial metabolism compared to negative control. Additionally, 1 and 3 nM of SeMet presented a similar cellular viability profile when compared to untreated cells whereas 10–1000 nM decreased dsDNA released from cells to extracellular medium. The global evaluation of concentration-response curves evidenced a mitochondrial metabolic decline condition and not cell mortality. The selected concentration was based on the fact that AV MnSOD-PBMC were S-HP balanced cells.

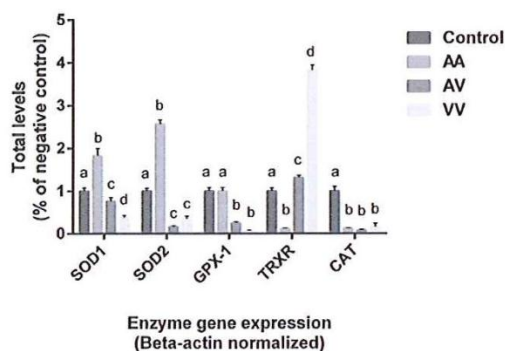


Fig. 3. Gene expression of enzymes. Treatment group was compared with the untreated control group by Student's *t*-test. A *p* value \leq 0.05 was considered statistically significant. Different letters express significant difference between groups.

Further, SeMet can cause lymphocyte toxicity through the generation of superoxide radical from reaction to produce selenide anion (RSe⁻) [30], also is known that Se-containing molecules as SeMet cause negative chemical modification on the proteins and on redox status of enzymes [31]. In this sense, a minimum concentration of 1 nM SeMet was chosen as the most effective concentration to develop all the additional treatments and experiments on all genotypes.

A particular pathway which can drastically influence immune cells homeostasis, viability, proliferation, and cell cycle conditions is the apoptosis [32]. Apoptosis activation of PBMC exposed to 1 nM of SeMet was measured through flow cytometry analysis and caspases cascade activity. Both of these assays showed non-cytotoxic effect of SeMet after 24 h of exposition for AA and AV-MnSOD genotypes, except for VV-MnSOD cells where necrotic cellular population increased after SeMet treatment analyzed via flow cytometry, and it seems to be a SeMet cell mortality induction influence specifically at this MnSOD genotype. On the other hand, all MnSOD genotypes presented reduced levels of initiators and effectors caspases (caspase 1, 3, and 8) activities after SeMet treatment. These obtained results suggest a non-influence MnSOD polymorphism effect to SeMet exposition for apoptotic activation, since all PBMC MnSOD genotypes presented similar cell status in the flow cytometry, between treated and untreated cells, and reduced caspase cascade activation after SeMet exposure.

We observed that PBMC from different MnSOD genotypes exposed to SeMet had individual response after 24 h of treatment (Fig. 4). SeMet seems to act directly in the cellular mitochondria modulating specially selenium dependent enzymes, including GPx and TrxR enzymes, compared to the basal levels. These modulations are suggestive to significantly change oxidative molecules production, products of oxidation, producing a positive or negative nuclear gene expression feedback.

All the oxidative metabolism variables were measured in untreated cells to evaluate the basal standards considering MnSOD genotypes differences. As previously hypothesized [6], SOD activity was increased in AA-MnSOD cells while it was decreased in VV-

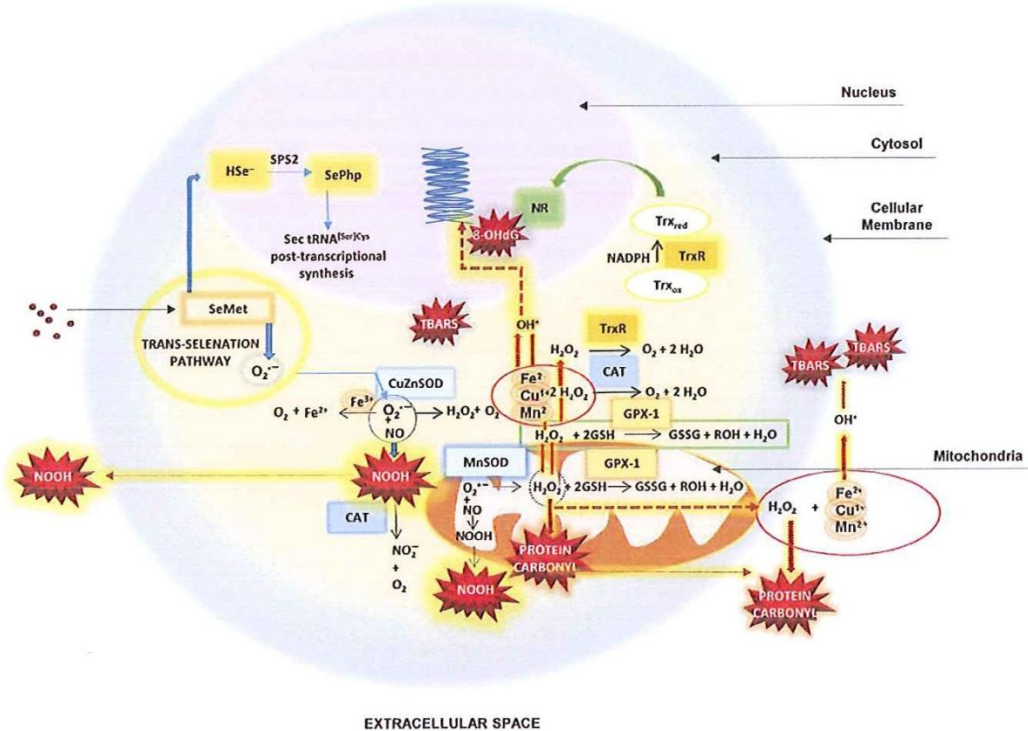


Fig. 4. Oxidative metabolism related to Val16Ala-MnSOD gene polymorphism and cellular SeMet utilization. The MnSOD genotypes determine the oxidative status in cells. The MnSOD catalyses the dismutation of superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$) to hydrogen peroxide (H_2O_2). Glutathione peroxidase (GPX-1) catalyses H_2O_2 to H_2O into mitochondria, the excess of H_2O_2 diffuses through mitochondria membranes to cytosol. In cytosol, other important antioxidant enzymes can remove H_2O_2 such as TrxR1 or catalase. The availability and efficiency of MnSOD into mitochondria in AA genotype is 30–40% upper than VV genotype, consequently the MnSOD in AA genotype has been associated with higher cancer risk because the excess of H_2O_2 can react with transition metals, such as ferrous iron (Fe^{2+}), producing hydroxyl radical (OH^{\cdot}). The OH^{\cdot} has a high affinity for DNA, causing mutations and chromosomal instability that are directly related with carcinogenesis. Whereas, the Trx system composed by NADPH, Trx protein and TrxR is a way to maintain ribonucleotide reductase (NR) functional active site. The functionality of NR is essential to prevent DNA-guanosine oxidation (8-OHdG). On the other hand, an excess of $O_2^{\cdot-}$ is associated with the VV genotype that causes an oxidative imbalance which appears to be involved in an increased risk of important cardiometabolic diseases, such as obesity and hypercholesterolemia. In this context, SeMet molecule can interact positively to modulate oxidative metabolism. The utilization of SeMet in cells is dependent of trans-selenation pathway to synthesis of selenide anion (HSe^-) that is catabolized by selenophosphate synthetase 2 (SPS2) to Se-donor selenophosphate (SePdp) into the nucleus. After this, selenocysteine (Sec) biosynthesis process is realized directly on its tRNA denominated tRNA^{Sec} through selenocysteine synthase and finally, UGA stop codon in mRNA sequence is translated to Sec resulting in a specific selenoprotein into cytosol.

MnSOD cells compared to AV-MnSOD PBMC. Additionally, TrxR activity followed MnSOD genotypes response. AA-MnSOD cells presented high levels of TrxR enzyme while VV-MnSOD cells had lower TrxR activity. TrxR activity modulation dependent of MnSOD genotype is suggestive to be an alternative pathway to preserve cellular oxidative balance. GPx has limited cellular synthesis and activity [33], in this sense, we observed that the cells increased or decreased TrxR activity to recover and maintain cellular homeostasis, as this enzyme acts synergistically and in a compensatory manner with GPx enzyme in response to high or low levels of H_2O_2 [34]. However, the interaction of this polymorphism with molecules that acted on H_2O_2 modulation, such as SeMet, had not been deeply investigated.

In this study, under SeMet exposition, all MnSOD genotypes presented similar modulated profiles of GPx and TrxR activities. These enzymes are selenium dependent proteins [35] and TrxR is able to control selenoprotein synthesis, for example GPx, once TrxR participates in selenium metabolism catalyzing selenium-selenium

interactions [36] as well as regulating selenium utilization [37], justifying our finds. Both AA and VV-MnSOD cells exposed to 1 nM of SeMet increased GPx and TrxR activities. On the other hand, AV-MnSOD PBMC presented reduced levels of these antioxidant enzymes, except CAT. It can be explained in the fact that CAT is a selenium non-dependent enzyme [38], in these terms, SeMet is not capable to modulate CAT positively, except under SeMet toxicity situations through the $O_2^{\cdot-}$ generation into cytosol provide of trans-selenation pathway [39]. The $O_2^{\cdot-}$ is the activator of complexes I and II of catalase as described by Shimizu et al. [40]. In addition, in same time that NO can interact with $O_2^{\cdot-}$ resulting in formation of peroxynitrite, and catalase is able to consume NO by oxidation and decompose hydrogen peroxide as well as peroxynitrite [5]. However, only VV-MnSOD cells followed GPx and TrxR standard of response for CAT enzyme, but not for SOD activity, in parallel, protein carbonylation was increased. Protein carbonylation is considered the major biomarker of oxidative stress because this modifications are in general irreversible [41]. All MnSOD genotypes

presented SOD 1 and SOD2 gene expression in a similar way found for total SOD activity, both enzymes gene expression was increased at AA-MnSOD cells and decreased at AV and VV-MnSOD PBMC. However, all the other antioxidant enzymes did not show similar gene expression response with enzymatic activities, suggesting a SeMet non-nuclear function. Moreover, in a review about selenoproteins effect in human health were described that Sec had a post transcriptional synthesis, influencing at translational step through Sec substitution in the ribosome, acting only in the tRNA, but not directly in the DNA, explaining the gene expression feedback observed for the mostly antioxidant enzymes evaluated in this study [42]. The utilization of SeMet is dependent of *trans*-selenation pathway to synthesis of selenide anion (HSe^-) that is catabolized by selenophosphate sintethase 2 (SPS2) to Se-donor selenophosphate (SePp). After this, selenocysteine (Sec) biosynthesis process is realized directly on its tRNA denominate tRNA^[Ser]^{Cys} through selenocysteine synthase and finally, UGA stop codon in mRNA sequence is translated to Sec resulting in a determined selenoproteins [13].

Seleno-dependent antioxidant enzymes, such as GPx and TrxR, are capable to modulate oxidative molecules production and consequently they can modify oxidation products on cells under a metabolic imbalance. The results here observed for GPx, and specially TrxR, modulation through SeMet pathway, seems to directly alter possible cellular damages as lipid peroxidation [24] and consequently DNA damage. All Mn-SOD genotypes presented decreased levels of 8-OHdG under SeMet exposure, while lipid peroxidation was reduced mainly in Ala-MnSOD genotype probably by H_2O_2 balancing. Additionally, protein carbonylation also followed the same profile of TBARS and 8-OHdG, being reduced after 1 nM SeMet treatment, except for Val-MnSOD genotype. Perhaps VV-MnSOD present increased levels of protein carbonylation under SeMet exposition by ROS and NO total levels. Also, oxidative stress caused by increased levels of ROS and NO can cleave lateral protein chains compromising its function. Thiol modification in proteins through selenylsulfide bonds may cause structural changes and functional inactivation. In mammals, essential regulatory proteins containing thiols, for example signal transduction kinases as c-Jun N-terminal kinase [43], protein kinase C [44] as well as transcription factor NF- κ B [45] are targets of oxidation by presence of selenium-containing molecules.

Another important fact is that superoxide radical is able to inactivate the active site of GPx by oxidation, maintaining this antioxidant enzyme in an intracellular stored status [46]. In this sense, decreased levels of superoxide radical can influence the GPx activity. AA and Val-MnSOD genotypes cells exposed to SeMet presented reduced levels of superoxide radical and an expected increased GPx activity. On the other hand, AV-MnSOD genotype responded to 1 nM SeMet with increased superoxide radical amount [29,47], also justifying GPx activity reduction and CAT increased activity, as CAT in this case can act as a secondary pathway to prevent peroxynitrite production and cellular damages [5].

In general, our results support Ambrosone's hypothesis that a diet rich in fruits and vegetables can act to minimize the increase in breast cancer risk associated with AA genotype [9,48]. The treatment on PBMC was realized with SeMet because it is available in vegetables and in high concentration in the Brazil' nuts. In the present study, AA-PBMC, when treated with SeMet, improved their antioxidant status, mainly by increasing the activities of GPx-1 and TrxR and decreasing most oxidant variables. In the same way, VV-PBMC showed improvement in their antioxidant status despite cell viability decrease. On the other hand, AV-MnSOD cells presented a toxicogenetic response on intermediary oxidative metabolism, a reductive stress, when exposed to SeMet. These results

showed that the functional role of SeMet was dependent of basal oxidative metabolism in PBMC. Therefore, the analysis of antioxidant and oxidant variables, including enzyme genes expression, confirmed that the effect of SeMet treatment on PBMC was highly influenced by MnSOD genetics. Previous investigations also described some pharmacogenomic, pharmacogenetic as well as toxicogenetic influences of the Val16Ala-MnSOD gene polymorphism on PBMC exposed to several factors, such as ultraviolet radiation [49], clomiphene citrate [50], methotrexate [15], methylmercury [51] and resveratrol [52].

The expression of different selenoproteins is dependent of specific regulator factors and substrates in each cell type and in different tissues [53]. The resistance of selenoproteins to selenium status or oxidative stress variation is related to its physiological importance, as example within members of the GPx family, GPx-2 is the most resistant, followed by GPx-4, GPx-3 or GPx-1. GPx-1 as well as TrxR-1 are essential to maintain PBMC immunocompetence and apoptosis control. Under conditions that GPx-1 efficiency was affected by selenium deprivation or had its expression at maximal limit, the storage of this enzyme in cells is responsible for recovering its activity in an immediate manner; in the same time that TrxR expression was extremely positively responsive to selenium supply [13]. Studies realized on lymphocytes by Wu et al. (2009) [31] suggested that SeMet enhanced genome stability at concentrations ranging from 125 $\mu\text{g Se/L}$ (1.6 μM) to 430 $\mu\text{g/L Se/L}$ (5.5 μM) and was cytotoxic at supraphysiological levels (23.5 μM).

The potential anticancer property [54] and cytoprotective role of selenium in chemotherapy [55] could justify current researches about the management of cancer therapy using selenium molecules. Studies *in vitro* suggested the differential sensitivity to SeMet among different breast cancer cells types. For example, MCF7/S invasive ductal cells showed low sensitivity to SeMet, decreasing cell growth only at higher SeMet concentrations (100 to 1000 μM) [56]. On the other hand, SeMet was cytotoxic at 113 nM concentration on MDA-MB-231 ductal cancer cells. In this case, non-tumorigenic mammary epithelial cells require a high concentration of SeMet (87.9 μM) to increase mortality rate. In the same time HEP-Hepatome cells showed intermediate sensitivity when SeMet exposed [57]. There are some studies that described selenium effect on chemotherapeutic sensibility of cancer cells. This is the case of Park et al. investigation [54], which described no sensitivity of MCF-7 cells exposed to selenium, whereas selenium on MDA-MB-231 cells acted as an anticancer agent. Moreover, the synergism of Docetaxel with selenium caused a decrease on cellular growth. The authors highlight in the present study the PBMC response to SeMet at very low concentrations (1 nM). However, results described here suggest that Val16Ala-MnSOD polymorphism could present some effect on different cancer cell types. Therefore, future investigations using SeMet concentrations (1 nM to 5.5 μM) on MDA-MB-231 and MCF-7 cells considering S-HP imbalance are important to be performed to clarify the potential SeMet chemopreventive effects.

5. Conclusions

In general, the results presented here indicate some positive effect of SeMet on AA-imbalanced cells. However, considering all the methodological limitations found *in vitro* investigations it is necessary to develop complementary studies using another experimental models, such as *in vivo* experiments, to confirm the evidences described in this study. Finally, in front of the evidences we became aware about the relevance of more studies with aim to determine the antioxidant status on humans after consumption of foods or supplements rich in SeMet. This hypothesis is suggested as a promising approach to achieve cellular oxidative metabolism homeostasis and investigate the potential decrease of cancer risk in

in vivo studies using personalized diet or supplements containing SeMet.

Declaration of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)” and “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)” for the Brazilian financial support. Also, authors would like to thank Letícia Cruz, PhD, and Taís Cristina Unfer, PhD for personal contributions, and to all the blood donors.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2017.05.007>.

References

- [1] L. Plecità-Hlavatá, P. Ježek, Integration of superoxide formation and cristae morphology for mitochondrial redox signaling, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (2016) 31–50, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2016.09.010>.
- [2] G. Bresciani, I.B.M. da Cruz, J. González-Gallego, Chapter four – manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation, *Adv. Clin. Chem.* (2015) 87–130, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bs.2014.11.001>.
- [3] K. Aoyama, T. Nakaki, Glutathione in cellular redox homeostasis: association with the excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1), *Molecules* 20 (2015) 8742–8758, <http://dx.doi.org/10.3390/molecules20058742>.
- [4] E.S.J. Arnér, Focus on mammalian thioredoxin reductases - important selenoproteins with versatile functions, *Biochim. Biophys. Acta* 1790 (2009) 495–526, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.01.014>.
- [5] G. Bauer, Tumor cell-protective catalase as a novel target for rational therapeutic approaches based on specific intercellular ROS signaling, *Anticancer Res.* 32 (2012) 2599–2624.
- [6] G. Bresciani, I.B.M. Cruz, J.A. de Paz, M.J. Cuevas, J. González-Gallego, The MnSOD Ala16Val SNP: relevance to human diseases and interaction with environmental factors, *Free Radic. Res.* 47 (2013) 781–792, <http://dx.doi.org/10.3109/10715762.2013.836275>.
- [7] A. Sutton, H. Khoury, C. Prip-Buus, C. Cepanec, D. Pessayre, F. Degoul, The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria, *Pharmacogenetics* 13 (2003) 145–157, <http://dx.doi.org/10.1097/01.fpc.0000054067.64000.81>.
- [8] S. Shimoda-Matsubayashi, H. Matsumine, T. Kobayashi, Y. Nakagawa-Hattori, Y. Shimizu, Y. Mizuno, Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226 (1996) 561–565, <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1996.1394>.
- [9] C.B. Ambrosone, J.L. Freudenheim, P.A. Thompson, E. Bowman, J.E. Vena, J.R. Marshall, S.G. Graham, R. Laughlin, T. Nemoto, P.G. Shields, Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer, *Cancer Res.* 59 (1999) 602–606.
- [10] B. Halliwell, M. Whiteman, Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 142 (2004) 231–255, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>.
- [11] V.F. Azzolin, F.C. Cadoná, A.K. Machado, M.D. Berto, F. Barbisan, E.B. Dornelles, W.G. Glanzner, P.B. Gonçalves, C.G. Bica, I.B.M. da Cruz, Superoxide-hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response, *Toxicol. Vitro* 32 (2016) 8–15, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2015.12.001>.
- [12] M.D. Berto, C.G. Bica, G.P. de Sá, F. Barbisan, V.F. Azzolin, F. Rogalski, M.M.M.F. Duarte, I.B.M. da Cruz, The effect of superoxide anion and hydrogen peroxide imbalance on prostate cancer: an integrative in vivo and in vitro analysis, *Med. Oncol.* 32 (2015) 251–261, <http://dx.doi.org/10.1007/s12032-015-0700-1>.
- [13] M. Roman, P. Jitaru, C. Barbante, Selenium biochemistry and its role for human health, *Metallomics* 6 (2014) 25–54, <http://dx.doi.org/10.1039/c3mt00185g>.
- [14] J.I. Ruiz-Sanz, I. Aurrekoetxea, R. Matorras, M.B. Ruiz-Larrea, Ala16Val SOD2 polymorphism is associated with higher pregnancy rates in in vitro fertilization cycles, *Fertil. Steril.* 95 (2011) 1601–1605, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.11.022>.
- [15] F. Barbisan, J. De Rosso Motta, A. Trott, V. Azzolin, E.B. Dornelles, M. Marcon, T.D. Algarve, M.M.M.F. Duarte, C.P. Mostardeiro, T.C. Unfer, K.L. Schott, I.B.M. Da Cruz, Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism, *PLoS One* 9 (2014) 1–11, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0107299>.
- [16] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63, [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [17] T.T.N. Ha, N.T. Huy, L.A. Murao, N.T.P. Lan, T.T. Thuy, H.M. Tuan, C.T.P. Nga, V. van Tuong, T. van Dat, M. Kikuchi, M. Yasunami, K. Morita, V.T.Q. Huong, K. Hirayama, Elevated levels of cell-free circulating DNA in patients with acute dengue virus infection, *PLoS One* 6 (2011) 1–7, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0025969>.
- [18] M. Degli Esposti, Measuring mitochondrial reactive oxygen species, *Methods* 26 (2002) 335–340, [http://dx.doi.org/10.1016/S1046-2023\(02\)00039-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1046-2023(02)00039-7).
- [19] U. Rauen, F. Petrat, T. Li, H. De Groot, Hypothermia injury/cold-induced apoptosis—evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury in spite of low O₂-H₂O₂ formation, *FASEB J.* 14 (2000) 1953–1964, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.00-0071.com>.
- [20] W.S. Choi, P.G. Shin, J.H. Lee, G. Do Kim, The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells, *Cell. Immunol.* 280 (2012) 164–170, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.12.007>.
- [21] D.R. Spitz, L.W. Oberley, An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates, *Anal. Biochem.* 179 (1989) 8–18, [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90192-9](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(89)90192-9).
- [22] H. Aebi, Catalase in vitro, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121–126, [http://dx.doi.org/10.1016/0076-6875\(84\)05016-3](http://dx.doi.org/10.1016/0076-6875(84)05016-3).
- [23] D.E. Paglia, W.N. Valentine, Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase, *J. Lab. Clin. Med.* 70 (1967) 158–169.
- [24] M. Björnstedt, M. Hamberg, S. Kumar, J. Xue, A. Holmgren, Human thioredoxin reductase directly reduces lipid hydroperoxides by NADPH and selenocysteine strongly stimulates the reaction via catalytically generated selenols, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 11761–11764, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.270.20.11761>.
- [25] A.K. Machado, F.C. Cadoná, V.F. Azzolin, E.B. Dornelles, F. Barbisan, E.E. Ribeiro, M.F. Mânica-Cattani, M.M.M.F. Duarte, J.R.P. Saldanha, I.B.M. da Cruz, Guaraná (Paullinia cupana) improves the proliferation and oxidative metabolism of senescent adipocyte stem cells derived from human lipospirates, *Food Res. Int.* 67 (2015) 426–433, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.056>.
- [26] A.M. Jentsch, H. Bachmann, P. Furst, H.K. Biesalski, Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids, *Free Radic. Biol. Med.* 20 (1996) 251–256.
- [27] L. Reznick, Z. Abraham, Packer, Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay, *Methods Enzymol.* 233 (1994) 357–363.
- [28] E. Mocchegiani, L. Costarelli, R. Giacconi, M. Malavolta, A. Basso, F. Piacenza, R. Ostani, E. Cevenini, E.S. Gonos, D. Monti, Micronutrient-gene interactions related to inflammatory/immune response and antioxidant activity in ageing and inflammation, *A Syst. Rev. Mech. Ageing Dev.* 136–137 (2014) 29–49, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mad.2013.12.007>.
- [29] U.R. Kuppasamy, M. Dharmani, M.S. Kanthimathi, M. Indran, Antioxidant enzyme activities of human peripheral blood mononuclear cells exposed to trace elements, *Biol. Trace Elem. Res.* 106 (2005) 29–40, doi:10.1029/jpl10.1385/BTER:106:1:029
- [30] J.E. Spallholz, V.P. Palace, T.W. Reid, Methionine and selenomethionine but not Se-methylselenocysteine generate methylselenol and superoxide in an in vitro chemiluminescent assay: implications for the nutritional carcinostatic activity of selenoamino acids, *Biochem. Pharmacol.* 67 (2004) 547–554, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2003.09.004>.
- [31] J. Wu, G.H. Lyons, R.D. Graham, M.F. Fenech, The effect of selenium, as selenomethionine, on genome stability and cytotoxicity in human lymphocytes measured using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Mutagenesis* 24 (2009) 225–232, <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/gen074>.
- [32] G. Xu, Y. Shi, Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis, *Cell Res.* 17 (2007) 759–771, <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2007.52>.
- [33] R.R. Jameson, A.M. Diamond, A Regulatory Role for Sec tRNA [Ser] Sec in Selenoprotein Synthesis, 2004, pp. 1142–1152, <http://dx.doi.org/10.1261/rna.7370104.element>.
- [34] I.S. Harris, A.E. Treloar, S. Inoue, M. Sasaki, C. Gorriani, K. Lee, K. Yung, D. Brenner, C.B. Knobbe-Thomsen, M.A. Cox, A. Elia, T. Berger, D.W. Cescon, A. Adeoye, A. Brüstle, S.D. Molyneux, J.M. Mason, W.Y. Li, K. Yamamoto, A. Wakeham, H.K. Berman, R. Khokha, S.J. Done, T.J. Kavanagh, C.W. Lam, T.W. Mak, Glutathione and thioredoxin antioxidant pathways synergize to drive cancer initiation and progression, *Cancer Cell* 27 (2015) 211–222, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2014.11.019>.
- [35] J. Lu, A. Holmgren, Selenoproteins, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 723–727, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R800045200>.
- [36] V. Nascimento, N.L. Ferreira, R.F.S. Canto, K.L. Schott, E.P. Waczuk, L. Sancineto, C. Santi, J.B.T. Rocha, A.L. Braga, Synthesis and biological evaluation of new nitrogen-containing diselenides, *Eur. J. Med. Chem.* 87 (2014) 131–139, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.09.022>.
- [37] H.E. Ganther, Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase, *Carcinogenesis* 20 (1999) 1657–1666, <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/20.9.1657>.
- [38] E.A. Veal, A.M. Day, B.A. Morgan, Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling, *Mol. Cell.* 26 (2007) 1–14, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.016>.

- [39] M. Lazard, M. Dauplais, S. Blanquet, P. Plateau, Trans-sulfuration pathway seleno-amino acids are mediators of selenomethionine toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 10741–10750, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M115.640375>.
- [40] N. Shimizu, K. Kobayashi, K. Hayashi, The reaction of superoxide radical with catalase, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 4414–4418.
- [41] Y.J. Suzuki, M. Carini, D.A. Butterfield, Protein carbonylation, Antioxid. Redox Signal 12 (2010) 323–325, <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2009.2887>.
- [42] L.V. Papp, J. Lu, A. Holmgren, K.K. Khanna, From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health, *Antioxid. Redox Signal* 9 (2007) 775–806, <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2007.1528>.
- [43] H.-S. Park, E. Park, M.-S. Kim, K. Ahn, I.Y. Kim, E.-J. Choi, Selenite inhibits the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) through a thiol redox mechanism, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 2527–2531.
- [44] R. Gopalakrishna, U. Gundimeda, Protein kinase C as a molecular target for cancer prevention by seleno-compounds, *Nutr. Cancer* 40 (2001) 55–63, http://dx.doi.org/10.1207/S15327914NC401_11.
- [45] J.L. Larabee, J.R. Hocker, J.S. Hanas, Mechanisms of inhibition of zinc-finger transcription factors by selenium compounds ebselen and selenite, *J. Inorg. Biochem.* 103 (2009) 419–426, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.12.007>.
- [46] J. Blum, I. Fridovich, Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical, *Arch. Biochem. Biophys.* 240 (1985) 500–508, [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(85\)90056-6](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(85)90056-6).
- [47] E.N. Drake, Cancer chemoprevention: selenium as a prooxidant, not an antioxidant, *Med. Hypotheses* 67 (2006) 318–322, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2006.01.058>.
- [48] C.G. Bica, N.V. da Cruz, Ivana Beatrice Mânica, Leonardo Leiria de Moura da Silva, Toscani, C.G. Zettler, M.S. Graudenz, Association of manganese superoxide dismutase gene polymorphism (Ala-9Val) and breast cancer in males and females, *J. Bras. Patol. E Med. Lab.* 43 (2007) 219–225, <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442007000300012>.
- [49] G.F.F. dos Santos Montagner, M. Sagrillo, M.M. Machado, R.C. Almeida, C.P. Mostardeiro, M.M.M.F. Duarte, I.B.M. da Cruz, Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes, *Toxicol. Vitr.* 24 (2010) 1410–1416, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2010.04.010>.
- [50] F. Costa, E. Dornelles, M.F. Mânica-Cattani, T.D. Algarve, O.C. De Souza Filho, M.R. Sagrillo, L.F.M. Garcia, I.B.M. Da Cruz, Influence of Val16Ala SOD2 polymorphism on the in-vitro effect of clomiphene citrate in oxidative metabolism, *Reprod. Biomed. Online* 24 (2012) 474–481, <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.01.009>.
- [51] T.D. Algarve, F. Barbisan, E.E. Ribeiro, M.M.M.F. Duarte, M.F. Mânica-Cattani, C.P. Mostardeiro, A.F. Lenz, I.B.M. da Cruz, In vitro effects of Ala16Val manganese superoxide dismutase gene polymorphism on human white blood cells exposed to methylmercury, *Genet. Mol. Res.* 12 (2013) 5134–5144, <http://dx.doi.org/10.4238/2013.October.29.7>.
- [52] D. Capeleto, F. Barbisan, V. Azzolin, E.B. Dornelles, F. Rogalski, C.F. Teixeira, A.K. Machado, F.C. Cadoná, T. da Silva, T. Duarte, M.M.M.F. Duarte, I.B.M. da Cruz, The anti-inflammatory effects of resveratrol on human peripheral blood mononuclear cells are influenced by a superoxide dismutase 2 gene polymorphism, *Biogerontology* 16 (2015) 621–630, <http://dx.doi.org/10.1007/s10522-015-9561-4>.
- [53] Z.R. Stoytcheva, M.J. Berry, Transcriptional regulation of mammalian selenoprotein expression, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1790 (2009) 1429–1440, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.05.012>.
- [54] S.O. Park, Y.B. Yoo, Y.H. Kim, K.J. Baek, J.-H. Yang, P.C. Choi, J.H. Lee, K.R. Lee, K.S. Park, Effects of combination therapy of docetaxel with selenium on the human breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7, *Ann. Surg. Treat. Res.* 88 (2015) 55–62, <http://dx.doi.org/10.4174/ast.2015.88.2.55>.
- [55] J. Lü, J. Zhang, C. Jiang, Y. Deng, N. Özten, M.C. Bosland, Cancer chemoprevention research with selenium in the post-SELECT era: Promises and challenges, *Nutr. Cancer* 68 (2016) 1–17, <http://dx.doi.org/10.1080/01635581.2016.1105267>.
- [56] C. Redman, J.A. Scott, A.T. Baines, J.L. Basye, L.C. Clark, C. Calley, D. Roe, C.M. Payne, M.A. Nelson, Inhibitory effect of selenomethionine on the growth of three selected human tumor cell lines, *Cancer Lett.* 125 (1998) 103–110, [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3835\(97\)00497-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3835(97)00497-7).
- [57] R.J. Jariwalla, B. Gangapurkar, D. Nakamura, Differential sensitivity of various human tumour-derived cell types to apoptosis by organic derivatives of selenium, *Br. J. Nutr.* 101 (2009) 182–189, <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114508998305>.

4 ARTIGO 3 – THE INTERACTION BETWEEN A CHEMICAL SUPEROXIDE-HYDROGEN PEROXIDE IMBALANCE AND BRAZIL NUT AQUEOUS EXTRACT REGULATES THE OXIDATIVE METABOLISM OF HFF-1 FIBROBLASTS IN A NUTRIGENOMIC MANNER



Federal University of Santa Maria

September 28th, 2017

Brazil

Redox Biology

T. Grune, C.G. Kevil

Editors-in-Chief

Dear Editors:

On behalf of all collaborators, I would like to submit the manuscript entitled: *“The Interaction Between a Chemical Superoxide-Hydrogen Peroxide Imbalance and Brazil Nut Aqueous Extract Regulates the Oxidative Metabolism of HFF-1 Fibroblasts in a Nutrigenomic Manner”*, by Karen Lilian Schott, Charles Elias Assmann, Cibele Ferreira Teixeira, Aline Augusti Boligon, Samuel Rodrigo Waechter, Fábio Andrei Duarte, Euler Esteves Ribeiro, and Ivana Beatrice Mânica da Cruz for publication in Redox Biology.

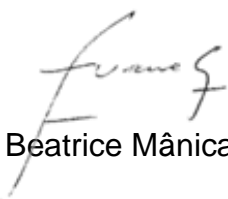
The work presented here is part of a larger project that investigates the impact of the Val16Ala-SOD2 gene polymorphism in health and diseases, addressed in many studies performed by our research team in recent years. The Val16Ala-SOD2 gene polymorphism is a single nucleotide polymorphism (SNP) in the

superoxide dismutase enzyme, which realizes the conversion of superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) into hydrogen peroxide (H_2O_2). However, carriers of the AA genotype have a greater amount of the SOD2 enzyme into the mitochondria due to structural changes that make the enzyme more suitable for passing through the mitochondrial membranes, leading to a higher conversion rate of $O_2^{\cdot-}$ to H_2O_2 . Whereas AA genotype carriers have more H_2O_2 inside the cell, VV genotype carriers have higher levels of $O_2^{\cdot-}$. Either the higher amounts of one reactive oxygen species (ROS) or another leads to an imbalanced redox status in homozygous subjects, that we are calling superoxide-hydrogen peroxide (S-HP) imbalance. The disturbance in cellular homeostasis for this specific SNP has been associated to a higher cancer risk for AA genotype carriers or to cancer aggressiveness for the VV genotype. Nevertheless, the intake of fruits and vegetables rich in antioxidant molecules could benefit homozygous subjects as postulated by Ambrosone et al. (1999). Brazil nut is such a candidate food due to the presence of a rich nutritional matrix composed by many bioactive phytochemicals and essential Selenium in the form of Seleno-L-methionine, recently investigated by our team to improve the antioxidant status of human immune cells, especially those of the AA-genotype (Schott et al., 2017). Taking into account the benefits of isolated molecules, it could be hypothesized that Brazil nut could exert a positive effect on cells that present an inherited imbalanced redox status.

Considering the main focus of this research, we believe that the study described here could be suitable for publication in Redox Biology.

This work is original and is not under consideration by another journal. All authors have read and agreed for the publication of this paper. The authors declare that there are no conflicts of interest.

Kind regards,



Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Corresponding Author

- MnTBAP and Paraquat molecules chemically-mimic AA- and VV-SOD2-like genotypes in human fibroblasts.
- Brazil nut aqueous extract (BNAE) effects on oxidative metabolism variables were not influenced by the S-HP imbalance.
- AA- and VV-SOD2-like human fibroblasts treated with BNAE improved their antioxidant status.
- BNAE modulated gene expression of antioxidant enzymes in a nutrigenomic manner.

The Interaction Between a Chemical Superoxide-Hydrogen Peroxide Imbalance and Brazil Nut Aqueous Extract Regulates the Oxidative Metabolism of HFF-1 Fibroblasts in a Nutrigenomic Manner

Karen Lilian Schott^{a,b,*}, Charles Elias Assmann^{a,b,*}, Cibele Ferreira Teixeira^{a,c}, Aline Augusti Boligon^d, Samuel Rodrigo Waechter^e, Fabio Andrei Duarte^e, Euler Esteves Ribeiro^f, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{a, b, c, #}

^aLaboratory of Biogenomics, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^bGraduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^cGraduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^dLaboratory of Phytochemical Research, Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^eDepartment of Chemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^fThird Age Open University of Amazonas State, Manaus, AM, Brazil

*The first two authors contributed equally to this study.

#Corresponding author. Laboratory of Biogenomics, Federal University of Santa Maria. 1000 Roraima Av., Building 19, Room 3101, Santa Maria-RS, Brazil, Zip Code: 97105-900. E-mail address: ibmcruz@hotmail.com (I. B. M. da Cruz)

Abstract

This study investigated whether Brazil nut aqueous extract (BNAE) modified oxidative metabolism of HFF-1 human fibroblast cells submitted to a chemical superoxide-

hydrogen peroxide (S-HP) imbalance by exposure to Paraquat, which increases S levels or porphyrin, a SOD2-like molecule, which increases HP levels. A BNAE was produced and chemically characterized; Selenium (Se) amounts were also quantified. Further, culture media of balanced and imbalanced cells by Paraquat (VV-SOD2-like) or porphyrin (AA-SOD2-like) were supplemented with different BNAE concentrations, and the effect of these interactions on fibroblasts growth and antioxidant metabolism was addressed. The most effective concentration of BNAE that increased cell growth and decreased oxidative parameters in both imbalanced cells was 75 ng Se/mL. Moreover, complementary analysis showed that this effect occurred due to the modulation of antioxidant enzymes genes. Whereas in AA-SOD2-like cells, thioredoxin reductase (TrxR) gene was upregulated, in VV-SOD2-like cells, an upregulation of glutathione peroxidase (GPx-1) gene expression was observed. These results suggest that BNAE has nutrigenomic effects depending on the S-HP status of cells, been able to decrease negative effects, in both directions of the S-HP imbalance. This study suggests that habitual BN intake could help subjects with a genetic S-HP imbalance to improve the antioxidant metabolism.

Keywords: Val16Ala-SOD2; Selenium; Seleno-L-Methionine; Paraquat; MnTBAP; Redox status.

Abbreviations: Ala, alanine; BN, Brazil nut; BNs, Brazil nuts; BNAE, Brazil nut aqueous extract; CAT, catalase (E.C. 1.11.1.6); DCFH-DA, 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate; DMBA, 7,12-dimethylbenz[a]anthracene; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; FBS, Fetal Bovine Serum; GPx, glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9); Glutathione reduced form (GSH); Glutathione oxidized form (GSSG); HFF-1, Human Foreskin Fibroblast Cell Line; HPLC-DAD, High performance liquid chromatography – Diode-array detection; ICP-MS, Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry ; MnTBAP, Manganese (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin chloride; NADPH, Nicotinamide Adenine dinucleotide phosphate reduced; NO, nitric oxide; $O_2^{\cdot-}$, superoxide radical; OH^{\cdot} , hydroxyl radical; Paraquat, 1,1'-Dimethyl-4,4-Bipyridinium dichloride hydrate; PBS, phosphate-buffered saline; ROS, Reactive Oxygen Species; SD, standard deviation; Se, Selenium; Sec, selenocysteine amino acid; SeMet, seleno-L-methionine; S-HP, Superoxide-hydrogen peroxide; SNP, single nucleotide polymorphism; SOD, superoxide dismutase (EC 1.15.1.1); TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; tRNA, transfer ribonucleic acid; tRNA[Ser]Sec, selenocysteine designated tRNA; TrxR, thioredoxin reductase (EC 1.8.1.9); Val, valine; Val16Ala-SOD2, human manganese-dependent superoxide dismutase enzyme gene polymorphism.

1. Introduction

The mitochondrial manganese-dependent superoxide dismutase (SOD2) antioxidant enzyme acts as a superoxide ($O_2^{\cdot-}$) scavenger, generating hydrogen

peroxide (H_2O_2) uninterruptedly in aerobic cells. SOD2 is a key enzyme in the control of oxidative molecules into mitochondria and cells, and its imbalance can cause extensive body dysfunctions [1]. This assumption was determined especially by studies involving a single nucleotide polymorphism (SNP) present in the 16 codon of the SOD2 gene (rs4880) named Val16Ala-SOD2 SNP [2].

SOD2 is encoded by a nuclear gene and its non-active protein produced in the cytoplasm must be transported into the mitochondria to become a functional enzyme. This transportation is mediated by the presence of a little peptide named mitochondrial target sequence (MTS) in the SOD2 protein. However, the SNP present in the MTS gene sequence produces different alleles (V and A), which directly influence the SOD2 protein conformation. Whereas V allele originates a β -sheet SOD2 protein, A allele originates an α -helix SOD2 protein. A-SOD2 enters more easily into the mitochondria, whereas V-SOD2 is partially trapped within the mitochondrial membranes [3].

The human Val16Ala-SOD2 SNP results in a superoxide-hydrogen peroxide (S-HP) imbalance in both homozygous genotypes. Into the mitochondria, the Ala/Ala genotype presents approximately 30-40% higher enzyme amounts than the VV genotype [3,4]. AA genotype has been associated with the risk of some cancer types, whereas VV genotype, that presents higher $\text{O}_2^{\cdot-}$ levels has been associated with cancer aggressiveness [5–8]. However, there are some evidence that dietary patterns could minimize the AA cancer-risk helping cells to a S-HP rebalance [9–11].

This effect could be associated to the improvement in the capacity to scavenge H_2O_2 , produced at high levels into AA-cells. To test this hypothesis Schott et al. (2017) [12] performed an *in vitro* study in which peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) carriers of different Val16Ala-SOD2 genotypes were exposed to

seleno-L-methionine (SeMet). Results showed that SeMet increased antioxidant status of AA-SOD2 cells [12].

However, the potential effect of fruits rich in Selenium (Se) was not tested yet. This is the case of Brazil nut (BN), *Bertholletia excelsa* (Lecythidaceae), a fruit native from the Amazon Rainforest [13,14]. BN has the highest Se concentration and it also presents a rich nutritional matrix containing proteins, unsaturated fatty acids, vitamins, carbohydrates and antioxidant polyphenols. Moreover, BN seeds contain cysteine, an amino acid precursor of glutathione (GSH), a thiol tripeptide essential for maintaining the oxidative metabolism homeostasis [15].

To test BN effects on the antioxidant status of S-HP imbalance cells, we adapted a previous *in vitro* pharmacological S-HP imbalance model that was initially studied in cancer cells [16,17] to a non-cancer commercial fibroblast cell line (HFF-1). The interaction between S-HP imbalance and a BN aqueous extract (BNAE) was studied by analysis of cellular growth, concentration of different oxidative markers, as well as antioxidant genes modulation.

2. Material and methods

2.1 BNAE production

Brazil nuts (BNs) were obtained from the public market of Santa Maria City, Rio Grande do Sul State, Brazil. The seeds were individually weighted and granulated in a multiprocessor (Philips, São Paulo, Brazil), fractioned in Teflon PTFE flasks containing each one 9.6 g of total homogenate, and stocked at -80°C. For extraction procedures, 9.6 g of total homogenate was added to 200 mL of ultrapure

water at 85°C into a borosilicate bottle and mixed vigorously using a mixer (Philips, São Paulo, Brazil) for 10 minutes.

The homogeneous suspension was transferred to a separation funnel and decanted for 30 min at ambient temperature. Further, the aqueous intermediary phase was collected, filtered through a paper filter and concentrated in a rotatory evaporator (Rotavapor[®] R-300, Buchi Brasil Ltda., São Paulo, Brazil) at 50°C and 96 mbar until reaching 10 mL. Further, extract was fractionated in 2 mL Eppendorf[®] microtubes and maintained at -80°C until utilization. Ultrapure water was obtained from a Milli-Q[®] system (Merk Millipore, São Paulo, Brazil).

All glass material was decontaminated for metals and trace elements by immersion in HNO₃ 10% ethanolic solution for 72 h followed by rigorous rinse.

2.2 BNAE chemical characterization

BNAE was characterized by high-performance liquid chromatography (HPLC-DAD) performed with a Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to a DGU 20A5 degasser with a CBM 20A integrator, SPD-M20A diode-array detector and LC solution 1.22 SP1 software. All chemicals were of analytical grade. Methanol, acetic acid, phosphoric acid, gallic acid, catechin, resveratrol, ellagic acid, epicatechin, rutin, quercetin and kaempferol were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

The BNAE was filtered through 0.45 µm syring filter (Merck Millipore Brazil[®], São Paulo, Brazil) and was injected onto reversed phase Phenomenex C₁₈ column (4.6 mm x 250 mm) packed with 5 µm diameter particles (Phenomenex[®], São Paulo, Brazil). The mobile phases were 0.5% (v/v) aqueous phosphoric acid (solvent A) and

1% (v/v) acetic acid in methanol (solvent B). The binary elution system was as follows: 2% B at initial 5 min to wash the column, a linear gradient was 8% B (15 min), 12% B (30 min), 24% B (45 min). After 50 min, the organic phase concentration was brought back to 2% (B) and lasted 10 min for column equilibration. Flow rate of 0.6 mL/min and injection volume 40 μ l [18]. The wavelengths used were 254 nm for gallic acid and ellagic acid; 280 nm for catechin and epicatechin; 327 nm for resveratrol; and 365 nm for rutin, quercetin and kaempferol. The extract and mobile phase were filtered through 0.45 μ m membrane filter (Merck Millipore Brazil[®], São Paulo, Brazil) and thus degassed by ultrasonic bath prior to use. Stock solutions of standards references were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.030 – 0.500 mg/mL. Chromatography peaks were confirmed by comparing its retention time with those of reference standards and by DAD spectra (200 to 500 nm). All chromatography operations were carried out at ambient temperature and in triplicate. Calibration curve for catechin: $Y = 11957x + 1348.3$ ($r = 0.9998$); ellagic acid: $Y = 12563x + 1185.9$ ($r = 0.9995$); gallic acid: $Y = 14262x + 1075.1$ ($r = 0.9999$); epicatechin: $Y = 13840x + 1319.0$ ($r = 0.9998$); resveratrol: $Y = 12945x + 1367.6$ ($r = 0.9996$); quercetin: $Y = 10937x + 1275.3$ ($r = 0.9999$); rutin: $Y = 11810x + 1098.2$ ($r = 0.9995$) and kaempferol: $Y = 11495x + 1386.2$ ($r = 0.9997$).

The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated based on the standard deviation of the responses and the slope using three independent analytical curves. LOD and LOQ were calculated as 3.3 and 10 σ/S , respectively, where σ is the standard deviation of the response and S is the slope of the calibration curve [19].

2.4 Determination of Se concentration in the BNAE

About 200 mg of sample was weighted, which was left at ambient temperature for 12 h with 6 mL of 14.4 mol/L HNO₃. Afterwards, the digestion was done in a closed system with microwaves radiation heating (Multiwave 3000[®], Microwave Sample Preparation System, Anton Paar GmbH, Graz, Austria), using Teflon PTFE flasks. After decomposition, the digests were transferred to polypropylene vials and gauged to 25 mL with ultrapure water.

The determination of Se was performed by Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry (ICP-MS) employing a NexION[®] 300/350 model spectrometer (PerkinElmer, Thornhill, Canada), equipped with concentric nebulizer, cyclone nebulizer chamber and injector torch Quartz with a 2 mm internal diameter. The power used was 1400 W and the argon flow rate was 18.0, 1.2 and 1.05 L/ min, for the main, auxiliary and nebulizing gas, respectively. The determinations were made using the ⁸²Se isotope.

2.3 Cell culture and chemical S-HP imbalance production

Fibroblasts of the HFF-1 cell line (ATCC[®] SCRC-1041[™]) were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Cells were cultured using DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco[®] Thermo Fisher Scientific – 1196509; São Paulo, SP, Brazil) supplemented with 15% of FBS - fetal bovine serum (Gibco[®] Thermo Fisher Scientific – 12657029; São Paulo, SP, Brazil) and 10,000 U/mL penicillin / 10 mg/mL streptomycin (Gibco[®] Thermo Fisher Scientific – 15140122; São Paulo, SP, Brazil) at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. To

carry out all protocols HFF-1 cells were counted in a Neubauer chamber using Trypan blue[®] exclusion dye. The initial cellular concentration was 5×10^5 cells/mL for all protocols.

To produce chemical S-HP imbalance we exposed HFF-1 cells to 1,1'-dimethyl-4,4-bipyridinium dichloride (Paraquat) (Syngenta Brazil, São Paulo, SP Brazil), which triggers increase in S levels leading an oxidative status similar to VV-genotype, and manganese (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin chloride (MnTBAP) (Sigma-Aldrich – 453161; São Paulo, SP, Brazil), which triggers increase of HP levels similar to AA genotype. Fibroblast exposed to Paraquat were named VV-SOD2 like cells, whereas fibroblast exposed to MnTBAP were named AA-SOD2 like cells.

2.4 Interaction between S-HP imbalance and BNAE

Three protocols (Fig. 1) were performed in order to study the interaction between S-HP fibroblast imbalance and BNAE on cellular growth and oxidative indicators modulation. In the first protocol, both MnTBAP and Paraquat concentration-effect curves were performed in order to select concentrations that increased $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 levels to about 20% when compared to control balanced group. The curve of MnTBAP and Paraquat chemicals was performed with the following concentrations: 0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, and 0.9 μ M.

The second protocol evaluated the effect of a BNAE concentration-effect curve (0, 1.25, 2.5, 25, 50, 75, 100, and 125 ng Se/ mL) on fibroblast balanced-cells. Finally, the third protocol studied the interaction between S-HP imbalance and BNAE. In this protocol, the selected concentrations of MnTBAP and Paraquat which validated the S-HP imbalance model were treated with 0, 1.25, 2.5, 25, 50, 75, 100,

and 125 ng Se/ mL BNAE concentrations to evaluate chemical and biological interactions. From this analysis, we selected the most effective BNAE concentration that increased cellular growth of VV- and AA-SOD2 like cells to evaluate its effect on the modulation of oxidative metabolism indicators and antioxidant enzymes gene expression.

2.6 Cellular growth and cytotoxicity assays

Two different assays were used to evaluate fibroblast cell culture growth and cytotoxicity: Crystal violet staining assay and double-strand (ds) DNA quantification. In the crystal violet staining assay, cellular growth of cells was detected using crystal violet dye, which binds to proteins and DNA of adherent cells. Cells that undergo cell death lose their adherence and are subsequently lost from the population of cells, reducing the amount of crystal violet staining in a culture. In brief, cell culture plates were washed with phosphate-buffered saline (PBS 50 mM, pH 7.4) to remove dead cells; live cells were stained and fixed with 0.2% crystal violet dye dissolved in 2% ethanol solution for 30 minutes at 37°C. After, the excess of dye was discarded and plates were washed by immersion into abundant water. The excess of water was removed by inversion onto absorbent paper and dried at room temperature. After 48 h, cellular growth was determined by dye dissolving with 1% sodium dodecyl sulphate (SDS) and the absorbance was measured at 550 nm wavelength as previously described by Cubillos-Rojas et al. (2014) [20].

The dsDNA was quantified in cell culture supernatant using the Quant-IT™ PicoGreen® dsDNA fluorescent dye (Thermo Fischer Scientific - P7589; São Paulo, SP, Brazil), as previously described by Há et al. (2011) [21]. Samples were incubated

for 5 min protected from light at ambient temperature; and after excited at 480 nm and the fluorescence emission intensity was measured at 520 nm wavelength using a SpectraMax[®] i3 Multimode plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

2.7 Evaluation of oxidative metabolism indicators

2.7.1 Analysis of oxidant molecules

Determination of oxidative metabolism parameters, total ROS and $O_2^{\bullet-}$ levels was realized for all protocols, whereas Nitric oxide ($\cdot NO$) levels and oxidation products measurement (TBARS and protein carbonylation) were performed only in the Protocol 4. The consumption of total ROS was determined by the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate fluorimetric assay (DCF-DA) [22] with fluorescence measured using excitation and emission wavelengths of 488 nm and 525 nm, respectively. The $O_2^{\bullet-}$ levels was performed according to the method previously described by Rauen et al. (2000) [23]. The $\cdot NO$ levels were quantified by the Griess spectrophotometric method at 540 nm wavelength [24].

2.7.2. Analysis of products of oxidation

Lipid peroxidation was spectrophotometrically estimated through the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) as previously described by Jentzsch et al. (1996) [25] and protein carbonylation according to Levine et al. (1990) [26], using 532 nm and 370 nm wavelengths, respectively.

2.8 Analysis of antioxidant enzymes gene expression

The investigation of antioxidant enzymes gene expression was performed to verify the modulation of BNAE on imbalanced HFF-1 cells by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis. The expression levels of five different genes involved in oxidative metabolism regulation, namely: copper/zinc-dependent superoxide dismutase 1 (SOD1), manganese-dependent superoxide dismutase 2 (SOD2), glutathione peroxidase 1 (GPx-1), thioredoxin reductase 1 (TrxR-1) and catalase (CAT) were measured by qRT-PCR analysis using a similar approach to that described by Barbisan et al. (2014) [27]. Briefly, total RNA was isolated using TRIzol[®] reagent and quantified using a NanoDrop[™] 1000 Spectrophotometer System[®] (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). cDNA was obtained with the iScript[™] cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and qRT-PCR assay was performed with the QuantiFast SYBR[®] Green PCR Kit (Qiagen, São Paulo, SP, Brazil) in a Rotor Gene[®] Q equipment (Qiagen, São Paulo, SP, Brazil). The specific SOD1, SOD2, GPx-1, TrxR-1 and CAT forward and reverse primer sequences are described below (Table 1). The β -actin housekeeping gene was used as an internal control. Relative gene expression was calculated using the comparative Ct method and was expressed as fold expression relative to the control.

TABLE 1 HERE**2.9 Statistical analysis**

Data were firstly validated by mean and standard deviation calculations and values differing more than 10% (outliers) from the mean were excluded. Data were then normalized by the mean of cellular growth and, subsequently, transformed to percentage of negative control using Microsoft[®] Excel[®] software. After, all data were compared by one- or two-way analysis of variance followed by Tukey's *post hoc* test using GraphPad Prism[®] 6.0 version software. For all analysis, $p < 0.05$ was considered statistically significant. All experiments were performed in triplicate.

3. Results**3.1 BNAE chemical characterization**

Eight different main bioactive molecules were found in BNAE: gallic acid, catechin, resveratrol, ellagic acid, epicatechin, rutin, quercetin and kaempferol (Figure 2). The representative peaks of the phytochemical molecules are shown in figure 2. Peaks 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 were identified as gallic acid, catechin, resveratrol, ellagic acid, epicatechin, rutin, quercetin and kaempferol, respectively. Gallic acid, resveratrol, epicatechin and kaempferol were the phytochemicals found in higher amounts in the BNAE (Table 2). A complementary analysis showed a Se concentration of $2.09 \pm 0.10 \mu\text{g/mL}$ in BNAE.

FIGURE 2 HERE

TABLE 2 HERE

3.2 S-HP imbalance and BNAE on cellular growth and oxidative markers of fibroblast cells

Concentration-effect curves were performed to determine the effect of stressors and BNAE on fibroblasts. The concentration to decrease cellular growth around 20% and increase dsDNA levels to approximately 35% was 0.9 μM for both MnTBAP and Paraquat treatments (Fig. 3 A and C). At this concentration ROS levels increased in both treatments whereas $\text{O}_2^{\cdot-}$ levels significantly increased only in fibroblasts treated with Paraquat (Fig. 3 B and D), validating our S-HP model.

A concentration-effect curve of BNAE was also performed to evaluate the cytotoxic effects of BNAE on HFF-1 cells. Cell growth increased in a concentration manner and overall, the maximum levels of cellular growth were 85% higher in cells treated with BNAE at 75 ng Se/mL, whereas dsDNA levels decreased 36% at 75 ng Se/mL BNAE when compared to negative control (Fig. 3 E). At the same time, ROS and $\text{O}_2^{\cdot-}$ levels significantly decreased in a concentration manner, with the minimal levels of ROS found at 75 ng Se/mL BNAE concentration (Fig. 3 F).

FIGURE 3 HERE*3.3 Interaction between S-HP imbalance and BNAE on fibroblast cells*

AA-SOD2-like fibroblasts treated with BNAE concentrations strongly increased cell growth in a concentration manner (1.25-75 ng Se/mL BNAE) when compared to positive control. The increment on cell growth was higher when cells were exposed at 75 ng Se/mL BNAE concentration. Data analysis of dsDNA assay showed a decrease in the cytotoxicity for cells treated with the BNAE for all concentrations when compared to positive control. When ROS and $O_2^{\bullet-}$ levels were investigated, a significant increase in these reactive species production was found. BNAE concentrations showed to decrease the levels of ROS and $O_2^{\bullet-}$ for almost all concentrations when compared to positive control for both assays (Figure 4 A).

In the AA-SOD2-like model, MnTBAP concentration of 0.9 μ M confirmed the MnTBAP-induced AA-genotype showing a decrease in cellular growth using the crystal violet staining assay. Surprisingly, the effect observed for all assays was similar to the found for the VV-SOD2-like model. Cellular growth significantly increased in fibroblasts treated with BNAE concentrations whereas dsDNA levels and oxidative metabolism variables, such as ROS and $O_2^{\bullet-}$ levels, decreased in cells BNAE-treated (Figure 4 B).

Oxidative metabolism variables and enzyme gene expression were analysed to evaluate the potential beneficial effect of BNAE selected concentration (75 ng Se/mL) on HFF-1 imbalanced cells (Fig. 5). The complete chemical composition of Se effective concentration and proportional amounts of phytochemical molecules in BNAE that was used on S-HP imbalanced HFF-1 fibroblasts are shown below (Table 3).

TABLE 3 HERE

Oxidative metabolism parameters evaluated in this protocol, namely ROS, $O_2^{\cdot-}$, $\cdot NO$, TBARS and protein carbonylation (PC) levels, significantly increased in the AA- and VV-SOD2-like genotypes. Treatment with the selected concentration of BNAE containing 75 ng Se/mL was able to significantly decrease the oxidative metabolism parameters when compared with the respective positive controls in the S-HP imbalance models (Fig. 5 A).

FIGURE 5 HERE

Gene expression analysis revealed that the *in vitro* AA- and VV-SOD2-like models and BNAE differentially modulated gene expression of antioxidant enzymes of the intrinsic antioxidant system (Fig. 5 B). For SOD1, only BNAE significantly increased the levels of this enzyme in the VV-SOD2-like model whereas the other treatments decreased gene expression. SOD2 gene expression analysis showed a significant decrease in the expression of this enzyme in the VV-SOD2-like whereas AA-SOD2-like and BNAE had increased expression of this enzyme, especially in VV-SOD2-like cells treated with BNAE selected concentration.

For enzymes such as GPx-1 and TrxR-1, closely dependent on Se metabolism, gene expression analysis revealed that treatment with BNAE selected concentration was able to significantly increase the expression of GPx-1 and TrxR-1 in the VV-SOD2-like and AA-SOD2-like models, respectively. For GPx-1, all other treatments decreased the expression of this enzyme. For CAT, a significant increase

in the expression of this enzyme was found in both AA- and VV- SOD2-like HFF-1 cells and BNAE selected concentration did further increase CAT enzyme expression.

4. Discussion

The present study explored the possible beneficial nutrigenomic effect that BNAE treatment could have on cells of homozygous subjects for the human Val16Ala-SOD2 gene polymorphism (AA- and VV-SOD2 genotypes), that present an inherited imbalanced redox status. To perform this test, we validated here an *in vitro* model using MnTBAP and Paraquat chemicals to produce a S-HP imbalanced redox status on HFF-1 human fibroblasts.

Fibroblasts were chosen because these cells are widely distributed throughout the body, interacting with other cellular types to execute various physiological functions, and could thereby serve as a S-HP imbalance model to explore the redox status of cells exposed to chemicals and natural products [28].

Cells were exposed either to MnTBAP, which is a SOD2-like molecule or to Paraquat, which generates high levels of $O_2^{\cdot-}$ in the cytosol and mitochondria [28]. MnTBAP and Paraquat at the same molar concentration (0.9 μ M) increased the production of H_2O_2 and $O_2^{\cdot-}$, respectively, proven that our model was able to generate an *in vitro* S-HP imbalance on human fibroblasts. Complementary, we also found that MnTBAP and Paraquat decreased cellular growth to around 20% at the same molar concentration, suggesting that the chemically-induced imbalance could be toxic in some way for cells, due to the generation of ROS that could not be effectively neutralized by the endogenous antioxidant system of redox imbalanced individuals. Despite these findings, BNAE treatment was able to revert the oxidative stress of

fibroblasts exposed to both stressors. In addition, the results of our study showed that the effect of BNAE on human fibroblasts in terms of oxidative metabolism variables and antioxidant enzyme gene expression was not directly influenced by the S-HP imbalance.

ROS production was among the oxidative metabolism variables addressed here. ROS, at low levels, are involved in many physiological processes such as cellular growth and differentiation, being also indispensable for signalling processes. On the other hand, high ROS levels recruit endogenous and/or exogenous antioxidant systems in order to prevent cell damages [29]. Once oxidative stress is a key regulator mechanism in many disease processes, it can be suggested that the antioxidant molecules found in BNAE could act as beneficial phytochemicals against ROS production.

In fact, components of both exogenous and endogenous antioxidant systems contribute to alleviate oxidative stress and help to protect cells from ROS generation, also interacting to spare or replace each other [30]. An important ROS scavenger capacity can be attributed to BNAE phytochemicals, especially for polyphenols identified in the extract. Previous studies correlate the consumption of polyphenols, such as resveratrol, with a protective effect against numerous diseases, such as diabetes, cancer, inflammatory, neurodegenerative and cardiovascular diseases [30].

As part of the endogenous antioxidant system, GPx-1 and TrxR-1 selenoenzymes rely on Se supply for its synthesis and correct functioning [31]. It is well-known that BNs contain high amounts of Se in the organic form of SeMet, a naturally occurring amino acid which is randomly incorporated into proteins instead of Methionine (Met) [32] and also cysteine, a precursor for glutathione [33] and TrxR synthesis [34].

In our study, we showed that the effects of BNAE on gene expression of antioxidant enzymes of both SOD2-like fibroblasts were different from those found when immune cells carriers of AA- and VV-SOD2 genotypes were treated with purified SeMet [12]. Here, BNAE was able to promote a balance between mammalian glutathione (GSH) and thioredoxin (Trx) systems with similar GPx-1 gene expression and TrxR-1 upregulation in AA-SOD2-like fibroblasts, whereas VV-SOD2-like fibroblasts had highly upregulated GPx-1 gene expression and unaltered TrxR-1 expression.

These findings suggest that the BNAE could provide an homeostasis on the regulation of mammalian GSH and Trx systems once these can act as free radical scavengers and serve as backup systems for each other as postulated previously by Lu and Holmgren (2012) [35]. GSH and Trx systems are the most prominent reductive systems in mammalian cells, and among other already mentioned enzymes, help to protect against oxidative damages in order to regulate signalling pathways. If Se intake is diminished, there could be an inefficient production of selenoproteins and selenoenzymes which in turn leaves the cell more vulnerable to oxidative damages. Moreover, the regulation of both GSH and Trx systems are TrxR-1 dependent via Nrf2 transcription factor in the absence and presence of Se. The Nrf2-Keap1 response system (not investigated here) could be also activated by ROS and reactive nitrogen species (RNS) to coordinate cellular responses to oxidative and electrophilic stress [36].

SOD and CAT antioxidant enzymes are likewise part of the endogenous antioxidant system and are well-known for their ROS scavenger properties, once they realize the conversion of $O_2^{\cdot-}$ to H_2O_2 (SOD) and, posteriorly to water and molecular oxygen (CAT) [29]. The increased expression of both SOD1 (cytoplasmic) and SOD2

(mitochondrial) enzyme genes, especially in the VV-SOD2-like model, could be explained due to the supplementation of cells with BNAE, once BNs contain bioactive antioxidant molecules such as resveratrol, quercetin and epicatechin [37]. Complementary, CAT expression was increased in both SOD2-like models, demonstrating some nutrigenomic effect of BNAE as well.

It is known that BN is rich in several phytochemicals, mineral elements (Mg, Ca, Fe, Cu, Cr, Se), vitamins, such as Vitamin B3 e B6, many proteins and amino acids, fibres and unsaturated fatty acids [38]. Taking into account the above mentioned chemical constituents of BN, its inclusion in moderate amounts as a diet component have been widely investigated. BN consumption has been shown beneficial for the remission and prevention of cardiovascular diseases risk factors in heterogeneous populations as described in a recent review [39]. Overall, a decrease in the risk factors for cardiovascular diseases (like heart attacks and stroke) and associated diseases such as obesity, hypertension, hypercholesterolemia and type 2 diabetes mellitus was found in subjects that consumed BN regularly [40–43].

In the case of cancer, the use of BN and Se-derived molecules as chemopreventive agents is still in debate, due to contrary results found in literature data. In the case of Se-derived molecules, organic purified SeMet and SeMet-rich selenized-yeast (Se-yeast) have been investigated as chemopreventive agents in double-blinded, randomized, placebo-controlled Phase III human clinical trials but the results lead to rejection of SeMet/Se-yeast as cancer prevention agents [44, 45].

On the other hand, the chemopreventive effect of Se-containing BN was proposed in animals by Ip and Lisk at 1994 [46] once the parallel treatment with sodium selenite (Na_2SeO_3), a Se-derived molecule, showed similar results. More recently, an investigation performed by Hu et al. (2016) [47] postulated that the intake

of moderate concentrations of BN (48 µg Se/day for consecutive 6 weeks) could be beneficial for the remission of colorectal cancer risk factors, once this type of cancer is associated with a gene polymorphism in selenoprotein P.

Based on these diverse results, Nicastro and Dunn (2013) [48] suggested that Se biology should be taking into consideration to choose appropriate intake forms of Se, possibly associated with a rich nutritional matrix similarly to that found in BN. In addition, gene polymorphisms, especially those found in selenoproteins, seem to be important criteria for the use of BN for chemopreventive effect.

The results found in our study suggest the relevance of the chemically-induced S-HP imbalance once AA- and VV-SOD2-like genotypes showed a similar regulatory mechanism in relation to oxidative metabolism indicators. However, it seems that the chemically-induced S-HP imbalance does not influence the effect of BNAE treatment, suggesting a nutrigenomic effect on the modulation of antioxidant enzyme gene expression and oxidative metabolism parameters. In a contrary manner, a previous work performed by Capeleto et al. (2015) [10] described that the anti-inflammatory effects of purified resveratrol on AA- and VV-SOD2 genotypes of human immune cells are influenced by the Val16Ala-SOD2 gene polymorphism.

In general, despite some differential gene expression regulation, cells treated with BNAE presented a higher expression level of the antioxidant enzymes, suggesting that BNAE was able to revert the oxidative stress generated by both stressors, and also presented an increase in cellular growth, possibly due to the antioxidant properties of BNAE chemical constituents. Further, we suggest that the nutrigenomic effects observed for AA- and VV-like fibroblasts could be due to the BNAE nutritional matrix rather than isolated constituents, such as resveratrol and

SeMet, since previous studies observed nutrigenetic effects when human PBMCs were exposed to these substances alone.

5. Conclusion

In conclusion, the present work suggests the relevance of the S-HP imbalance in health and disease for human subjects as previously investigated in other studies. Also, we provide evidence that diet components rich in bioactive molecules and trace essential elements, such as BN, could positively impact subjects' health improving their antioxidant status and maintaining cellular homeostasis. Despite some methodological limitations of our study, our results suggest the plausible extrapolation to *in vivo* studies to confirm the potential benefits of BN intake for human subjects.

Acknowledgements

The authors would like to express their gratitude to João Batista Teixeira da Rocha, PhD, and Francine Carla Cadoná, PhD, for personal contributions. The authors are also very thankful for the financial support provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Disclosure of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest. All funding sources are non-profit Brazilian Governmental Agencies and had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

- [1] G. Bresciani, I.B.M. da Cruz, J. González-Gallego, Chapter Four – Manganese Superoxide Dismutase and Oxidative Stress Modulation, in: *Adv. Clin. Chem.*, 2015: pp. 87–130. doi:10.1016/bs.acc.2014.11.001.
- [2] G. Bresciani, I.B.M. Cruz, J.A. de Paz, M.J. Cuevas, J. González-Gallego, The MnSOD Ala16Val SNP: relevance to human diseases and interaction with environmental factors, *Free Radic. Res.* 47 (2013) 781–792. doi:10.3109/10715762.2013.836275.
- [3] A. Sutton, H. Khoury, C. Prip-Buus, C. Capanec, D. Pessayre, F. Degoul, The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria., *Pharmacogenetics.* 13 (2003) 145–157. doi:10.1097/01.fpc.0000054067.64000.8f.
- [4] S. Shimoda-matsubayashi, H. Matsumine, T. Kobayashi, Y. Nakagawa-hattori, Y. Shimizu, Y. Mizuno, Structural Dimorphism in the Mitochondrial Targeting Sequence in the Human Manganese Superoxide Dismutase Gene superoxide anions are produced from electron transport system and are scavenged by an is not well understood , because it also produces hydrogen, 565 (1996) 561–565.
- [5] C.G. Bica, L.L. de Moura da Silva, N.V. Toscani, C.G. Zettler, M.G. do Valle Gottlieb, C.O.P. Alexandre, M.S. Graudenz, I.B. Mânica da Cruz, Polymorphism (ALA16VAL) correlates with regional lymph node status in breast cancer, *Cancer Genet. Cytogenet.* 196 (2010) 153–158. doi:10.1016/j.cancergencyto.2009.09.011.
- [6] D. Kang, K.-M. Lee, S.K. Park, S.I. Berndt, U. Peters, D. Reding, N. Chatterjee, R. Welch, S. Chanock, W.-Y. Huang, R.B. Hayes, Functional Variant of Manganese Superoxide Dismutase (SOD2 V16A) Polymorphism Is Associated with Prostate Cancer Risk in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Study, *Cancer Epidemiol. Biomarkers & Prev.* 16 (2007) 1581–1586. doi:10.1158/1055-9965.EPI-07-0160.
- [7] T. Iguchi, C.Y. Wang, N.B. Delongchamps, M. Kato, S. Tamada, T. Yamasaki, G. De La Roza, T. Nakatani, G.P. Haas, Association of MnSOD AA genotype with the progression of prostate cancer, *PLoS One.* 10 (2015) 4–11. doi:10.1371/journal.pone.0131325.
- [8] A.N. Minlikeeva, R.W. Browne, H.M. Ochs-Balcom, C. Marian, P.G. Shields, M. Trevisan, S. Krishnan, R. Modali, M. Seddon, T. Lehman, J.L. Freudenheim, Single-nucleotide polymorphisms and markers of oxidative stress in healthy women, *PLoS One.* 11 (2016) 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0156450.

- [9] C.B. Ambrosone, J.L. Freudenheim, P.A. Thompson, E. Bowman, J.E. Vena, J.R. Marshall, S. Graham, R. Laughlin, T. Nemoto, P.G. Shields, Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) Genetic Polymorphisms, Dietary Antioxidants, and Risk of Breast Cancer, *Cancer Res.* 59 (1999) 602–606.
- [10] D. Capeleto, F. Barbisan, V. Azzolin, E.B. Dornelles, F. Rogalski, C.F. Teixeira, A.K. Machado, F.C. Cadoná, T. da Silva, T. Duarte, M.M.M.F. Duarte, I.B.M. da Cruz, The anti-inflammatory effects of resveratrol on human peripheral blood mononuclear cells are influenced by a superoxide dismutase 2 gene polymorphism, *Biogerontology.* 16 (2015) 621–630. doi:10.1007/s10522-015-9561-4.
- [11] M.G. Kakkoura, C.A. Demetriou, M.A. Loizidou, G. Loucaides, I. Neophytou, S. Malas, K. Kyriacou, A. Hadjisavvas, MnSOD and CAT polymorphisms modulate the effect of the Mediterranean diet on breast cancer risk among Greek-Cypriot women, *Eur. J. Nutr.* 55 (2016) 1535–1544. doi:10.1007/s00394-015-0971-5.
- [12] K.L. Schott, C.E. Assmann, F. Barbisan, V.F. Azzolin, B. Bonadiman, M.M.M.F. Duarte, A.K. Machado, I.B.M. da Cruz, Superoxide-hydrogen peroxide genetic imbalance modulates differentially the oxidative metabolism on human peripheral blood mononuclear cells exposed to seleno-L-methionine, *Chem. Biol. Interact.* 273 (2017) 18–27. doi:10.1016/j.cbi.2017.05.007.
- [13] S.A. Mori, G.T. Prance, Taxonomy, Ecology, and Economic Botany of the Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae), *Adv. Econ. Bot.* 8 (1990) 130–150.
- [14] A. Németh, J.F. García Reyes, J. Kosáry, M. Dernovics, The relationship of selenium tolerance and speciation in Lecythidaceae species., *Metallomics.* 5 (2013) 1663–73. doi:10.1039/c3mt00140g.
- [15] H.R. Cardarelli, A.J. De Oliveira, Conservation of Brazil nut extract, *Sci. Agric.* 57 (2000) 617–622. doi:10.1590/S0103-90162000000400004.
- [16] V.F. Azzolin, F.C. Cadoná, A.K. Machado, M.D. Berto, F. Barbisan, E.B. Dornelles, W.G. Glanzner, P.B. Gonçalves, C.G. Bica, I.B.M. da Cruz, Superoxide-hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response, *Toxicol. Vitr.* 32 (2016) 8–15. doi:10.1016/j.tiv.2015.12.001.
- [17] M. dal Berto, C.G. Bica, G.P. de Sá, F. Barbisan, V.F. Azzolin, F. Rogalski, M.M.M.F. Duarte, I.B.M. da Cruz, The effect of superoxide anion and hydrogen peroxide imbalance on prostate cancer: an integrative in vivo and in vitro analysis, *Med. Oncol.* 32 (2015) 251–61. doi:10.1007/s12032-015-0700-1.
- [18] C.E.F. Fernandes, J. Scapinello, A. Bohn, A.A. Boligon, M.L. Athayde, J.D. Magro, M. Palliga, J.V. Oliveira, M. V. Tres, Phytochemical profile, antioxidant and antimicrobial activity of extracts obtained from erva-mate (*Ilex paraguariensis*) fruit using compressed propane and supercritical CO₂, *J. Food Sci. Technol.* 54 (2016) 98–104. doi:10.1007/s13197-016-2440-4.
- [19] A.A. Boligon, M. Piana, T.F. Kubiça, D.N. Mario, T.V. Dalmolin, P.C. Benez, R. Weiblen, L. Lovato, S.H. Alves, M.M.A. Campos, M.L. Athayde, HPLC analysis and antimicrobial, antimycobacterial and antiviral activities of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC, *J. Appl. Biomed.* 13 (2015) 7–18. doi:10.1016/j.jab.2014.01.004.
- [20] M. Cubillos-Rojas, F. Amair-Pinedo, R. Peiró-Jordán, R. Bartrons, F. Ventura, J.L. Rosa, The E3 ubiquitin protein ligase HERC2 modulates the activity of tumor protein p53 by regulating its oligomerization, *J. Biol. Chem.* 289 (2014)

- 14782–14795. doi:10.1074/jbc.M113.527978.
- [21] T.T.N. Ha, N.T. Huy, L.A. Murao, N.T.P. Lan, T.T. Thuy, H.M. Tuan, C.T.P. Nga, V. van Tuong, T. van Dat, M. Kikuchi, M. Yasunami, K. Morita, V.T.Q. Huong, K. Hirayama, Elevated levels of cell-free circulating DNA in patients with acute dengue virus infection, *PLoS One*. 6 (2011) 1–7. doi:10.1371/journal.pone.0025969.
- [22] B. Halliwell, M. Whiteman, Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?, *Br. J. Pharmacol.* 142 (2004) 231–55. doi:10.1038/sj.bjp.0705776.
- [23] U. Rauen, F. Petrat, T. Li, H. De Groot, Hypothermia injury/cold-induced apoptosis--evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury in spite of low O₂-/H₂O₂ formation., *FASEB J.* 14 (2000) 1953–64. doi:10.1096/fj.00-0071com.
- [24] W.S. Choi, P.G. Shin, J.H. Lee, G. Do Kim, The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells, *Cell. Immunol.* 280 (2012) 164–170. doi:10.1016/j.cellimm.2012.12.007.
- [25] A.M. Jentsch, H. Bachmann, P. Furst, H.K. Biesalski, Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids, *Free Radic. Biol. Med.* 20 (1996) 251–256.
- [26] R.L. Levine, D. Garland, C.N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A.G. Lenz, B.W. Ahn, S. Shaltiel, E.R. Stadtman, Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 464–478. doi:10.1016/0076-6879(90)86141-H.
- [27] F. Barbisan, J. De Rosso Motta, A. Trott, V. Azzolin, E.B. Dornelles, M. Marcon, T.D. Algarve, M.M.M.F. Duarte, C.P. Mostardeiro, T.C. Unfer, K.L. Schott, I.B.M. Da Cruz, Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism, *PLoS One*. 9 (2014) 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0107299.
- [28] T.T. Huang, M. Yasunami, E.J. Carlson, A.M. Gillespie, A.G. Reaume, E.K. Hoffman, P.H. Chan, R.W. Scott, C.J. Epstein, Superoxide-mediated cytotoxicity in superoxide dismutase-deficient fetal fibroblasts, *Arch. Biochem. Biophys.* 344 (1997) 424–432. doi:10.1006/abbi.1997.0237.
- [29] J.É.M. Matés, C. Pérez-Gómez, I.N. De Castro, Antioxidant enzymes and human diseases, *Clin. Biochem.* 32 (1999) 595–603. doi:10.1016/S0009-9120(99)00075-2.
- [30] R. Rodrigo, A. Miranda, L. Vergara, Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease, *Clin. Chim. Acta.* 412 (2011) 410–424. doi:10.1016/j.cca.2010.11.034.
- [31] U. Tinggi, Selenium: Its role as antioxidant in human health, *Environ. Health Prev. Med.* 13 (2008) 102–108. doi:10.1007/s12199-007-0019-4.
- [32] M. Roman, P. Jitaru, C. Barbante, Selenium biochemistry and its role for human health., *Metallomics.* 6 (2014) 25–54. doi:10.1039/c3mt00185g.
- [33] Shelly C. Lu, Glutathione Synthesis, *Biochim Biophys Acta.* 1830 (2013) 3143–3153. doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.008.
- [34] J. Lu, A. Holmgren, Selenoproteins., *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 723–7. doi:10.1074/jbc.R800045200.
- [35] J. Lu, A. Holmgren, Thioredoxin System in Cell Death Progression, *Antioxid. Redox Signal.* 17 (2012) 1738–1747. doi:10.1089/ars.2012.4650.
- [36] M. Cebula, E.E. Schmidt, E.S.J. Arnér, TrxR1 as a potent regulator of the Nrf2-Keap1 response system, *Antioxid. Redox Signal.* 23 (2015) 823–853.

- doi:10.1089/ars.2015.6378.
- [37] J.A. John, F. Shahidi, Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*), *J. Funct. Foods*. 2 (2010). doi:10.1016/j.jff.2010.04.008.
- [38] J. Yang, Brazil nuts and associated health benefits: A review, *LWT - Food Sci. Technol.* 42 (2009) 1573–1580. doi:10.1016/j.lwt.2009.05.019.
- [39] G. Grosso, J. Yang, S. Marventano, A. Micek, F. Galvano, S.N. Kales, Nut consumption on all-cause, cardiovascular, and cancer mortality risk: a systematic review and meta-analysis of epidemiologic studies 1 – 4, *Am. J. Clin. Nutr.* 101 (2015) 783–793. doi:10.3945/ajcn.114.099515.1.
- [40] E. Colpo, C.D.D.A. Vilanova, L.G. Brenner Reetz, M.M. Medeiros Frescura Duarte, I.L.G. Farias, E. Irineu Muller, A.L.H. Muller, E.M. Moraes Flores, R. Wagner, J.B.T. Da Rocha, A single consumption of high amounts of the Brazil nuts improves lipid profile of healthy volunteers, *J. Nutr. Metab.* 2013 (2013). doi:10.1155/2013/653185.
- [41] G.V.B. Huguenin, G.M.M. Oliveira, A.S.B. Moreira, T.D. Saint’Pierre, R.A. Gonçalves, A.R. Pinheiro-Mulder, A.J. Teodoro, R.R. Luiz, G. Rosa, Improvement of antioxidant status after Brazil nut intake in hypertensive and dyslipidemic subjects., *Nutr. J.* 14 (2015) 54. doi:10.1186/s12937-015-0043-y.
- [42] C.E. O’Neil, V.L. Fulgoni, T.A. Nicklas, Tree Nut consumption is associated with better adiposity measures and cardiovascular and metabolic syndrome health risk factors in U.S. Adults: NHANES 2005–2010, *Nutr. J.* 14 (2015) 64. doi:10.1186/s12937-015-0052-x.
- [43] L.C. Del Gobbo, M.C. Falk, R. Feldman, K. Lewis, D. Mozaffarian, Effects of tree nuts on blood lipids, lipoproteins, and blood pressure: Meta-analysis and dose-response of 61 trials, *Am. J. Clin. Nutr.* 102 (2015) 1347–56. doi:10.3945/ajcn.115.110965.
- [44] J. Lü, J. Zhang, C. Jiang, Y. Deng, N. Özten, M.C. Bosland, Cancer chemoprevention research with selenium in the post-SELECT era: Promises and challenges, *Nutr. Cancer*. 68 (2016) 1–17. doi:10.1080/01635581.2016.1105267.
- [45] M.S. Lippman, E.A. Klein, P.J. Goodman, M.S. Lucia, I.M. Thompson, L.G. Ford, H.L. Parnes, L.M. Minasian, J.M. Gaziano, J.A. Hartline, J.K. Parsons, J.D.B. III, E.D. Crawford, G.E. Goodman, J. Claudio, E.D. Cook, D.D. Karp, P. Walther, M.M. Lieber, A.R. Kristal, A.K. Darke, K.B. Arnold, P. a Ganz, R.M. Santella, D. Albanes, P.R. Taylor, J.L. Probstfield, L.H. Baker, C.A.C. Jr, Effect of Selenium and Vitamin E on Risk of Prostate Cancer and Other Cancers The Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT), *JAMA*. 301 (2009) 39–51. Trial (SELECT). *JAMA*. 301 (2009) 39–51. doi:10.1001/jama.2008.864.
- [46] C. Ip, D.J. Lisk, Bioactivity of selenium from Brazil nut for cancer prevention and selenoenzyme maintenance., *Nutr. Cancer*. 21 (1994) 203–212. doi:10.1080/01635589409514319.
- [47] Y. Hu, G.H. McIntosh, R.K. Le Leu, R. Somashekar, X.Q. Meng, G. Gopalsamy, L. Bambaca, R.A. McKinnon, G.P. Young, Supplementation with Brazil nuts and green tea extract regulates targeted biomarkers related to colorectal cancer risk in humans, *Br. J. Nutr.* 116 (2016). doi:10.1017/S0007114516003937.
- [48] H.L. Nicastro, B.K. Dunn, Selenium and prostate cancer prevention: Insights from the Selenium and Vitamin E cancer prevention trial (SELECT), *Nutrients*. 5 (2013) 1122–1148. doi:10.3390/nu5041122.

Table captions

Table 1

Forward and reverse primer sequences used to perform gene expression analysis.

Table 2

Phytochemical composition of Brazil nut aqueous extract (BNAE).

Table 3

Phytochemical composition of BNAE selected concentration.

Figure Captions

Fig. 1. General experimental design.

Fig. 2. Representative HPLC analysis of BNAE using standard and spectral analysis. Peaks 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 were identified as gallic acid, catechin, resveratrol, ellagic acid, epicatechin, rutin, quercetin and kaempferol, respectively.

Fig. 3. Concentration-effect curves were performed in parallel for the validation of the S-HP imbalance model and to evaluate BNAE cytotoxicity on fibroblasts. MnTBAP [a) CV and dsDNA, b) ROS and $O_2^{\bullet-}$], Paraquat [c) CV and dsDNA, d) ROS and $O_2^{\bullet-}$] and BNAE [e) CV and dsDNA, f) ROS and $O_2^{\bullet-}$]. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test. $p < 0.05$ was considered statistically significant. The error bars show the SD ($n=3$). CV, crystal violet; dsDNA, double-strand DNA; ROS, reactive oxygen species and $O_2^{\bullet-}$, superoxide radical.

Fig. 4. Concentration-effect curves were performed to determine the interaction between BNAE concentrations and the chemically-induced S-HP models: AA-SOD2-like [4 A) CV, dsDNA, ROS and $O_2^{\bullet-}$] and VV-SOD2-like [4 B) CV, dsDNA, ROS and $O_2^{\bullet-}$]. Data were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test. $p < 0.05$ was considered statistically significant. Significance levels are indicated by different letters. The errors bars show the SD ($n=3$). CV, crystal violet; dsDNA, double-strand DNA; ROS, reactive oxygen species and $O_2^{\bullet-}$, superoxide radical.

Fig. 5. Oxidative metabolism variables [(5 A) ROS, $O_2^{\cdot-}$, $^{\cdot}NO$, TBARS, PC] and enzyme gene expression [(5 B) SOD1, SOD2, GPx-1, TrxR-1 and CAT] were analysed to evaluate the potential beneficial effect of BNAE selected concentration. Data were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test. $p < 0.05$ was considered statistically significant. Significant differences are indicated by different letters. The errors bars show the SD (n=3). ROS, reactive oxygen species and $O_2^{\cdot-}$, superoxide radical; $^{\cdot}NO$, nitric oxide; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances and PC, protein carbonylation.

Table 1

Table 1

Forward and reverse primer sequences used to perform gene expression. analysis

Genes	Primers	
	Forward sequence	Reverse sequence
β -actin	TGTGGATCAGCAAGCAGGAGTA	TGCGCAAGTTAGGTTTTGTCA
SOD1	GCCCTGGAACCTCACATCAA	GGTACTTCTCCTCGGTGACGTT
SOD2	GCACACTGGTGGTCCATGAA	ACACCACAAGCCAAACGACTT
GPx-1	GGTTTTCATCTATGAGGGTGTTC	GCCTTGGTCTGGCAGAGACT
TrxR-1	GCCCTGCAAGACTCTCGAAATTA	GCCATAAGCATTCTCATAGACGA
CAT	GATAGCCTTCGACCCAAGCA	ATGGCGGTGAGTGTCAGGAT

Table 2

Table 2

Phytochemicals	BNAE	LOD	LOQ
	mg/mL	µg/mL	µg/mL
Gallic acid	5.68 ± 0.01	0.017	0.055
Catechin	0.63 ± 0.03	0.008	0.026
Resveratrol	3.71 ± 0.02	0.023	0.076
Ellagic acid	1.85 ± 0.01	0.029	0.095
Epicatechin	4.02 ± 0.01	0.014	0.047
Rutin	0.69 ± 0.04	0.011	0.036
Quercetin	1.97 ± 0.01	0.028	0.092
Kaempferol	1.93 ± 0.03	0.025	0.082

Phytochemical composition of Brazil nut aqueous extract (BNAE)
 Results were expressed as mean ± standard deviation (SD) of three determinations.
 LOD: limit of detection and LOQ: limit of quantification.

Table 3

Table 3

Chemical composition of BNAE selected concentration

Selenium	75 ng/mL BNAE ~ 1000 nM = 1 μ M Se
Polyphenol molecules	mg/mL BNAE
Gallic acid	0,2130
Catechin	0,0236
Resveratrol	0,1391
Ellagic acid	0,0694
Epicatechin	0,1508
Rutin	0,0259
Quercetin	0,0739
Kaempferol	0,0724

1 ng se /mL = 0.0133 nM Se

Figure 1

Experimental design

Protocol 1. Brazil nut aqueous extract preparation, phytochemical characterization and quantification by HPLC-DAD and selenium determination by ICP-MS.

Protocol 2. Concentration-response curves were performed with stressors for determination of S-HP imbalance model and BNAE cytotoxicity on fibroblasts HFF-1 cell line.

5x10 ⁵ HFF-1/mL	Stressors and BNAE concentrations	Evaluation
0	24	48 Time (h)
150 µL cellular suspension Resting	+ 50 µL stressors and BNAE were added in parallel	Cellular growth, ROS and O ₂ ^{•-}

Protocol 3. Concentration-response curve was performed with BNAE concentrations on S-HP imbalanced model chemically-induced.

5x10 ⁵ HFF-1/mL	Stressors selected concentration	BNAE concentrations	Evaluation
0	24	48	72 Time (h)
150 µL cellular suspension Resting	50 µL stressors were added in parallel	Medium was replaced for new 150 µL and 50 µL BNAE were added	Cellular growth, ROS and O ₂ ^{•-}

Protocol 4. S-HP imbalanced chemically-induced model with BNAE selected concentration.

4.1. Oxidative metabolism variables determination

5x10 ⁵ HFF-1/mL	Stressors selected concentration	BNAE selected concentration	Evaluation
0	24	48	72 Time (h)
750 µL cellular suspension Resting	250 µL stressors were added in parallel	Medium was replaced for new 750 µL and 250 µL BNAE was added	Cellular growth, ROS, O ₂ ^{•-} NO, TBARS and PC

4.2. Antioxidant enzyme gene expression evaluation

5x10 ⁵ HFF-1/mL	Selected stressors concentration	BNAE selected concentration	Evaluation
0	24	48	72 Time (h)
1500 µL cellular suspension Resting	500 µL stressors were added in parallel	Medium was replaced for new 1500 µL and 500 µL BNAE was added	Antioxidant enzyme gene expression

Stressors: MnTBAP and Paraquat; BNAE: Brazil nut aqueous extract.

Cellular growth: crystal violet staining on cell and double-strand DNA (ds-DNA) on supernatant.

Negative control received medium instead treatment volumes.

Figure 2

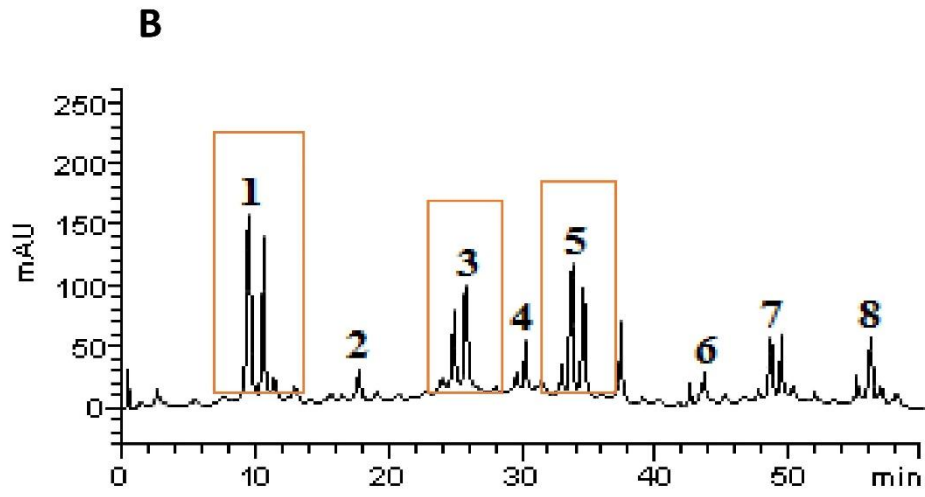


Figure 3

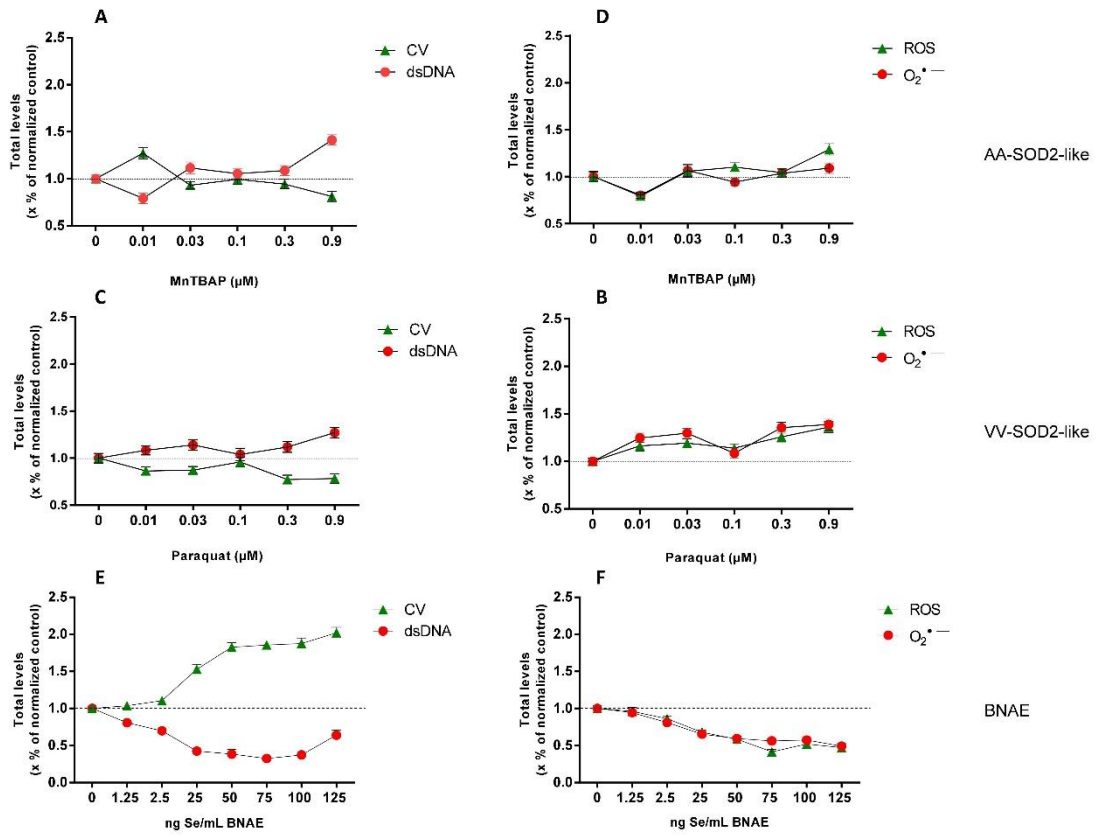


Figure 4

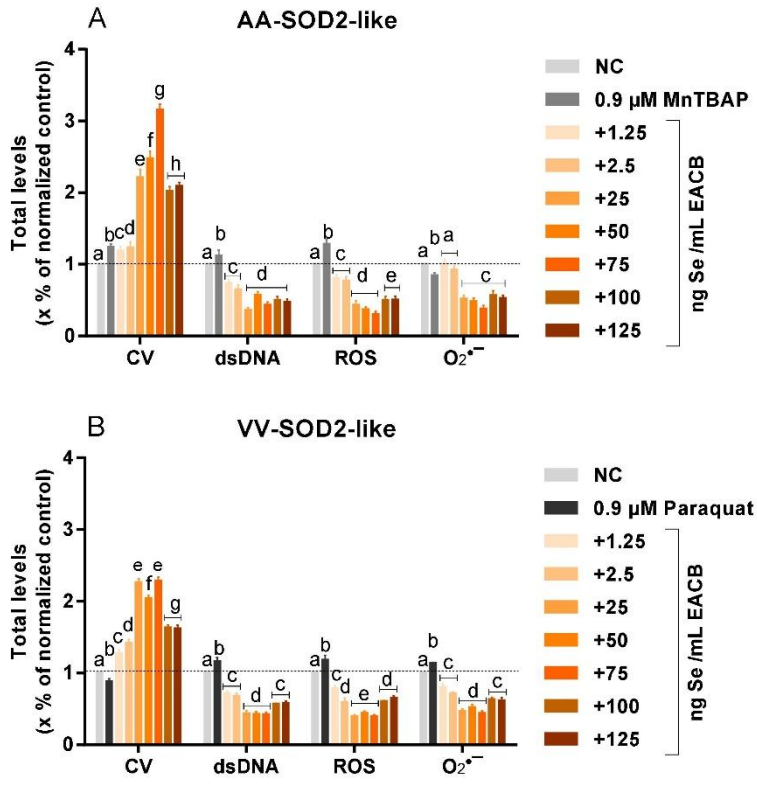
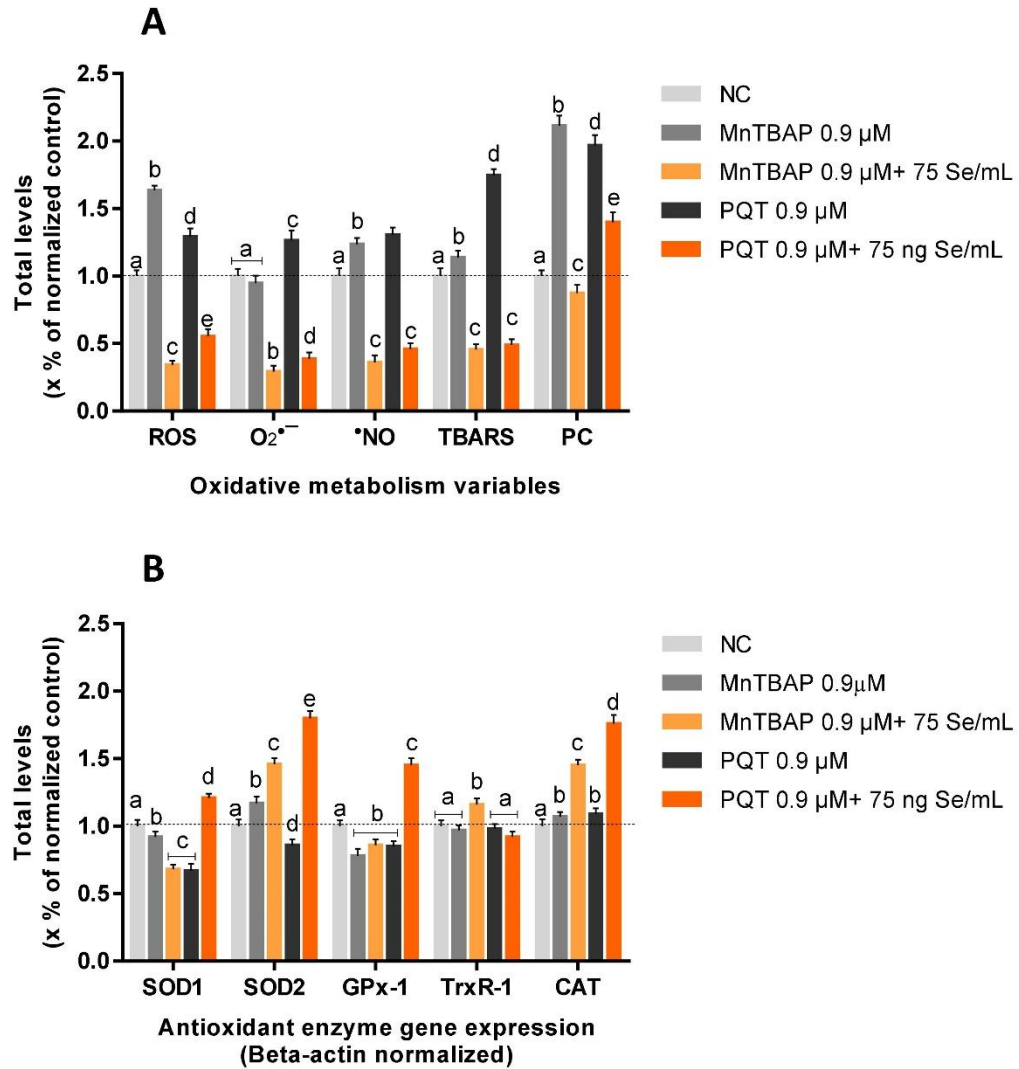


Figure 5



5 DISCUSSÃO

Em uma visão global, o trabalho de revisão da literatura contemplou mais de duas décadas de estudo sobre os benefícios da inclusão da castanha-do-brasil na dieta, iniciando pelo trabalho de IP e LISK (1994) que consagrou a ideia de que esta semente possui potencial efeito anticarcinogênico. Da mesma forma benéfica, indivíduos acometidos ou com fatores de risco para doenças metabólicas ou cardiovasculares mostraram uma resposta positiva a quantidades moderadas de castanha-do-brasil na dieta.

Considerando os benefícios dos constituintes químicos da castanha-do-brasil (ALASALVAR; BOLLING, 2015b; CARDOSO et al., 2016; JOHN; SHAHIDI, 2010; O'NEIL; FULGONI; NICKLAS, 2015), sua inclusão em quantidades moderadas como componente da dieta tem sido amplamente investigada. O consumo de castanha-do-brasil mostrou-se benéfico para a remissão e prevenção de fatores de risco de doenças cardiovasculares em populações heterogêneas conforme descrito em uma revisão recente (GROSSO et al., 2015). No geral, uma diminuição nos fatores de risco para doenças cardiovasculares (como ataques cardíacos e acidentes vasculares cerebrais) e doenças associadas, como obesidade, hipertensão, hipercolesterolemia e diabetes mellitus tipo 2, foi encontrada em indivíduos que consumiam castanha-do-brasil regularmente (HUGUENIN et al., 2015; O'NEIL; FULGONI; NICKLAS, 2015; DEL GOBBO et al., 2015).

O uso da castanha-do-brasil na prevenção do câncer está em debate desde que o seu efeito quimiopreventivo foi proposto por IP e LISK (1994) em um estudo que utilizou um modelo de câncer de mama induzido por DMBA em ratos. Os resultados mostraram efeito anticarcinogênico associado ao Se nas cobaias, uma vez que o tratamento em paralelo com selenito de sódio (Na_2SeO_3) apresentou resultados similares.

No entanto, em humanos, quando são utilizadas moléculas ou alimentos contendo Se com propriedades antioxidantes os fatores genéticos devem ser considerados. No polimorfismo genético Val16Ala-SOD2, a maior eficiência da SOD2 no genótipo AA produz altos níveis de H_2O_2 em comparação com os genótipos AV e VV-SOD2, em contrapartida maiores níveis de $\text{O}_2^{\cdot-}$ são atribuídos ao genótipo VV. Assim, o desbalanço S-PH gerado no genótipo AA foi associado ao desenvolvimento de câncer e, ao maior risco de acometimento de doenças

cardiometabólicas e vasculares no genótipo VV (BRESCIANI et al., 2013). Apesar de haver um consenso da relação entre as DCNT e o polimorfismo da SOD2, a interação deste polimorfismo com moléculas que atuam na modulação de H₂O₂, como a SeMet, não havia sido profundamente investigada.

Nos estudos *in vitro* realizados no presente trabalho, utilizamos células humanas e testamos a hipótese gerada na investigação de AMBROSONE et al. (1999), a qual demonstra que mulheres AA-SOD2, as quais relataram inclusão de vegetais e frutas na dieta, diminuiram expressivamente o risco de câncer de mama. Este referido trabalho tem uma importância chave para explicar a resposta individual diante da intervenção dietética.

Em função disso, investigamos a regulação do metabolismo oxidativo considerando a hipótese de que a SeMet poderia melhorar a funcionalidade das (seleno)enzimas no sentido de minimizar o desequilíbrio oxidativo nas células. Dois diferentes protocolos foram realizados. No protocolo 1, a SeMet purificada foi utilizada em CMSP humanas. No protocolo 2 utilizou-se SeMet associada à matriz química do EACB em fibroblastos HFF-1 S-PH desbalanceados quimicamente.

No primeiro protocolo, o uso da SeMet purificada foi baseado no fato de que as selenoenzimas GPx-1 e TrxR-1 desempenham um papel essencial no controle da concentração de moléculas oxidantes na CMSP (KUPPUSAMY et al., 2005; SPALLHOLZ; PALACE; REID, 2004). As CMSP foram extraídas do sangue total oriundo de voluntários portadores de diferentes genótipos da SOD2, AA, AV e VV-SOD2.

Inicialmente, uma curva de concentração-efeito de SeMet foi realizada em CMSP AV-SOD2 S-PH balanceadas. Todas as concentrações de SeMet testadas neste estudo foram capazes de reduzir o metabolismo mitocondrial em comparação com o controle negativo. Adicionalmente, 1 e 3 nM de SeMet apresentaram um perfil de viabilidade celular, nível de dsDNA, similar ao controle negativo. A avaliação global das curvas concentração-efeito evidenciou uma condição de declínio da atividade metabólica mitocondrial e não a mortalidade celular. A concentração selecionada foi de 1 nM SeMet que teve um declínio abrupto do metabolismo mitocondrial comparado ao controle negativo.

Uma via que pode influenciar drasticamente a homeostase das células imunes, viabilidade, proliferação e condições do ciclo celular é a apoptose (LARABEE; HOCKER; HANAS, 2009). A ativação da apoptose das CMSP expostas

a 1 nM de SeMet foi medida através de análise de citometria de fluxo e atividade das proteínas da castata das caspases.

Ambos os ensaios mostraram efeito não citotóxico da SeMet 1 nM após 24h de exposição para genótipos AA e AV-SOD2, exceto para as células VV-SOD2, onde a população celular necrótica aumentou após o tratamento com SeMet analisado por meio de citometria de fluxo. Uma influência de indução de mortalidade celular SeMet ocorreu especificamente neste genótipo da SOD2.

Por outro lado, todos os genótipos da SOD2 apresentaram níveis reduzidos de iniciadores e efetores de caspases (caspase 1, 3 e 8) após o tratamento com SeMet 1 nM. Adicionalmente, na citometria de fluxo, todos os genótipos da SOD2 nas CMSP apresentaram um perfil da apoptose similar entre células tratadas e não tratadas, indicando que a SeMe 1 nM não influenciou na ativação das caspases.

Todas as variáveis do metabolismo oxidativo foram medidas em células não tratadas para avaliar os padrões basais considerando diferenças de genótipos da SOD2. Conforme foi previamente postulado (BRESCIANI et al., 2013), a atividade de SOD foi aumentada em células AA-SOD2 enquanto estava diminuída em células VV-SOD2 em comparação com as AV-SOD2. Além disso, a atividade de TrxR seguiu a resposta dos genótipos da SOD2.

As células AA-SOD2 apresentaram níveis elevados de enzima TrxR, enquanto as células VV-SOD2 apresentaram atividade TrxR mais baixa. A modulação da atividade TrxR dependente do genótipo da SOD2 é sugestiva de ser uma via alternativa para preservar o equilíbrio oxidativo celular. A GPx-1 tem síntese celular e atividade limitadas, neste sentido, observamos que as células aumentaram ou diminuíram a atividade de TrxR para recuperar e manter a homeostase celular, pois esta enzima atua de forma sinérgica e de forma compensatória com a enzima GPx-1 em resposta a altas ou baixos níveis de H₂O₂ (HARRIS et al., 2015).

Neste estudo, sob a exposição da SeMet 1 nM, todos os genótipos do polimorfismo SOD2 apresentaram perfis de regulação de atividades GPx e TrxR similares. Essas enzimas são proteínas dependentes de Se, e a TrxR é capaz de controlar a síntese de selenoproteínas, uma vez que a mesma participa no metabolismo do Se calisando as interações Se-Se (NASCIMENTO et al., 2014; GANTHER, 1999), além de regular a utilização de Se (VEAL; DAY; MORGAN, 2007), justificando nossos achados.

Tanto as células AA e VV-SOD2 expostas a 1 nM de SeMet aumentaram as atividades GPx e TrxR. Por outro lado, as células AV-SOD2 apresentaram níveis reduzidos dessas enzimas antioxidantes, em contrapartida tiveram um aumento expressivo de CAT. Isto pode ser explicado pelo fato de que a CAT é uma enzima não dependente de Se, nestes termos, a SeMet não é capaz de modular CAT de forma positiva, exceto em situações de toxicidade da SeMet através da geração de $O_2^{\cdot-}$ citosólico, possivelmente na via da transselenação (LAZARD et al., 2015).

O $O_2^{\cdot-}$ é o ativador dos complexos I e II da CAT como descrito por SHIMIZU; KOBAYASHIS; HAYASHI (1984). Além disso, ao mesmo tempo em que o $\bullet NO$ pode interagir com $O_2^{\cdot-}$ resultando em formação de $ONOO^-$, a CAT é capaz de consumir $\bullet NO$ por oxidação e decompor o H_2O_2 , bem como o $ONOO^-$ (BAUER, 2012). No entanto, apenas as células VV-SOD2 seguiram o padrão de resposta GPx e TrxR para a CAT, mas não para atividade SOD, em paralelo, a carbonilação de proteínas foi aumentada. A proteína carbonilada é considerada o principal biomarcador do estresse oxidativo porque essas modificações são geralmente irreversíveis.

Todos os genótipos da SOD2 apresentaram a expressão do gene SOD1 e SOD2 de maneira similar encontrada para a atividade SOD, em ambas as enzimas a expressão gênica aumentou em células AA-SOD2 e diminuiu em CMSP AV e VV-SOD2. No entanto, todas as outras enzimas antioxidantes não apresentaram resposta de expressão gênica similar com atividades enzimáticas, sugerindo uma função não-nuclear da SeMet. Além disso, é bem descrito na literatura que a síntese da Sec é pós-transcricional influenciando na etapa de tradução através da substituição Sec no ribossomo, atuando apenas no RNAt, mas não diretamente no DNA, explicando o feedback da expressão gênica observado para as selenoenzimas antioxidantes avaliadas neste estudo (ROMAN; JITARU; BARBANTE, 2014).

As enzimas antioxidantes seleno-dependentes GPx e TrxR são capazes de modular a produção de moléculas oxidativas e conseqüentemente podem modificar produtos de oxidação em células sob um desequilíbrio metabólico. Os resultados aqui observados para a GPx, e especialmente para a TrxR, através da via SeMet, parecem alterar diretamente os possíveis danos celulares como a peroxidação lipídica e conseqüentemente o dano do DNA.

Todos os genótipos Mn-SOD apresentaram níveis reduzidos de 8-OHdG sob a exposição da SeMet, enquanto que a peroxidação lipídica foi reduzida principalmente no genótipo AA-SOD2 provavelmente pelo balanceamento de H_2O_2 .

Além disso, a carbonilação de proteínas também seguiu o mesmo perfil de TBARS e 8-OHdG, sendo reduzida após o tratamento com SeMet 1 nM, com exceção do genótipo VV-SOD2. Talvez VV-SOD2 apresentou níveis aumentados de carbonilação de proteínas sob a exposição SeMet por níveis totais de EROs e $\bullet\text{NO}$.

Além disso, o estresse oxidativo causado por níveis aumentados de EROs e $\bullet\text{NO}$ pode quebrar cadeias de proteínas laterais que comprometem sua função. A modificação de tiol em proteínas através de ligações de selenilsulfeto pode causar alterações estruturais e inativação funcional (LARABEE; HOCKER; HANAS, 2009; PARK et al., 2000). Em mamíferos, as proteínas reguladoras essenciais que contêm tióis são alvos de oxidação na presença de moléculas contendo Se.

Outro fato importante é que o $\text{O}_2^{\bullet-}$ é capaz de inativar o centro ativo da GPx por oxidação, mantendo esta enzima antioxidante em um estado de reserva intracelular (BLUM; FRIDOVICH, 1985). Neste sentido, níveis diminuídos de $\text{O}_2^{\bullet-}$ podem influenciar a atividade GPx. As células de genótipos de AA e VV-SOD2 expostas à SeMet apresentaram níveis reduzidos de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e uma atividade GPx aumentada esperada. Por outro lado, o genótipo AV-SOD2 respondeu à SeMet 1nM com aumento da quantidade de $\text{O}_2^{\bullet-}$, justificando a redução da atividade GPx e aumento da atividade da CAT, uma vez nestas condições esta enzima pode atuar como uma via secundária para prevenir o excesso de ONOO^- e danos celulares.

Em geral, nossos resultados corroboram a hipótese de AMBROSONE et al (1999) de que uma dieta rica em frutas e vegetais pode atuar para minimizar o aumento do risco de câncer de mama em mulheres portadoras do genótipo AA, uma vez que a SeMet está disponível em vegetais e em alta concentração nas castanhas-do-brasil.

No presente estudo, o AA-CMSP, quando tratado com SeMet, melhorou o seu estado antioxidante, principalmente aumentando as atividades de GPx-1 e TrxR e diminuindo a maioria das variáveis oxidantes. Da mesma forma, VV-CMSP mostrou melhora no seu estado antioxidante, apesar da diminuição da viabilidade celular. Por outro lado, as células AV-SOD2 apresentaram uma resposta toxicogênica no metabolismo oxidativo intermediário, um estresse redutivo, quando exposto a SeMet.

Estes resultados mostraram que o papel funcional da SeMet foi dependente do metabolismo oxidativo basal nas CMSP. Portanto, a análise de variáveis antioxidantes e oxidantes, incluindo a expressão de genes das enzimas, confirmou que o efeito do tratamento com SeMet em CMSP foi altamente influenciado pela

genética da SOD2. Este resultado corrobora com estudo prévio de Capeleto et al. (2015) em que os efeitos anti-inflamatórios do resveratrol, na forma purificada, foram influenciados pelo polimorfismo do gene Val16Ala-SOD2 em células CMSP humanas.

Outras investigações anteriores também descreveram algumas influências farmacogenômicas, farmacogenéticas e toxicogenéticas do polimorfismo do gene Val16Ala-SOD2 em CMSP expostas a vários fatores, como citrato de clomifeno (COSTA et al., 2012), metotrexato (BARBISAN et al., 2014) e metilmercúrio (ALGARVE et al., 2013).

A expressão de selenoproteínas diferentes é dependente de fatores reguladores específicos e substratos em cada tipo de célula e em diferentes tecidos (STOYTCHIEVA; BERRY, 2009). A resistência das selenoproteínas ao aporte de Se ou a variação do estresse oxidativo está relacionada à sua importância fisiológica, como exemplo dentro dos membros da família GPx, a GPx-2 é a mais resistente, seguida de GPx-4, GPx-3 ou GPx-1 (ROMAN; JITARU; BARBANTE, 2014).

A GPx-1 e a TrxR-1 são essenciais para manter a imunocompetência das CMSP e controle de apoptose. Sob condições em que a eficiência de GPx-1 foi afetada pela privação de Se ou teve sua expressão no limite máximo, o armazenamento dessa enzima nas células é responsável pela recuperação de sua atividade de forma imediata; ao mesmo tempo em que a expressão de TrxR responde rapidamente ao fornecimento de Se (ROMAN; JITARU; BARBANTE, 2014).

Estudos realizados em linfócitos por (WU et al., 2009) sugeriram que a SeMet aumentou a estabilidade do genoma em concentrações variando de 125 µg Se / L (1,6 µM) a 430 µg / L Se / L (5,5 µM) e foi citotóxica em níveis (23,5 µM) acima dos considerados fisiológicos (100 ng/mL = 1,28 µM).

A potencial propriedade anticarcinogênica (quimioprevenção) (PARK et al., 2015) e o papel citoprotetor do Se na quimioterapia (quimioproteção) (LÜ et al., 2016) poderiam justificar pesquisas atuais sobre o manejo da terapia do câncer usando moléculas de Se. Estudos *in vitro* sugeriram a sensibilidade diferencial à SeMet entre diferentes tipos de células de câncer de mama. Por exemplo, as células ductais invasivas MCF7/S apresentaram baixa sensibilidade à SeMet, diminuindo o crescimento celular somente em concentrações de SeMet de 100 a 1000 µM (REDMAN et al., 1998).

Por outro lado, a SeMet foi citotóxica na concentração de 113 nM em células de câncer ductal MDA-MB-231, ao mesmo tempo que as células epiteliais mamárias não-tumorigênicas requereram uma alta concentração de SeMet (87,9 μ M) para aumentar a taxa de mortalidade. Em paralelo, as células HEP-Hepatoma apresentaram sensibilidade intermediária quando foram expostas à SeMet (JARIWALLA; GANGAPURKAR; NAKAMURA, 2009).

O efeito quimioprotetivo do Se também foi investigado, o estudo mostrou o efeito do Se, sozinho ou combinado com agentes quimioterápicos, na sensibilidade quimioterapêutica das células cancerígenas e demonstrou a não sensibilidade das células MCF-7 expostas ao Se, enquanto que nas células MDA-MB-231 o Se atuou como agente anticarcinogênico. Além disso, a sinergia do Docetaxel com Se causou uma diminuição no crescimento celular (PARK et al., 2015).

Os autores destacam, no presente estudo, a resposta das CMSP à SeMet em concentrações muito baixas (1 nM). No entanto, os resultados aqui descritos sugerem que o polimorfismo Val16Ala-SOD2 pode apresentar algum efeito em diferentes tipos de células cancerígenas. Portanto, sugerimos aqui investigações futuras usando concentrações de SeMet de 1 nM a 5,5 μ M em que as células imunes são preservadas. Esta compreensão do efeito da SeMet em diferentes tipos celulares é importante para avaliar os possíveis efeitos quimiopreventivos da SeMet purificada.

O segundo protocolo explorou os possíveis efeitos nutricionais benéficos que o tratamento com extrato aquoso da castanha-do-brasil (EACB) poderia ter em células de indivíduos homocigotos do polimorfismo humano do gene Val16Ala-SOD2 (genótipos AA- e VV-SOD2), que apresentam um estado redox desequilibrado herdado utilizando um modelo S-PH quimicamente induzido.

Portanto, validamos aqui um modelo *in vitro* usando agentes químicos MnTBAP e Paraquat para produzir um estado redox desequilibrado S-PH em fibroblastos humanos HFF-1. Os fibroblastos foram escolhidos porque estas células são amplamente distribuídas por todo o corpo, interagindo com outros tipos celulares para executar várias funções fisiológicas e, portanto, podem servir de modelo para explorar para explorar o estado redox de células expostas a produtos químicos e produtos naturais (CHANG; LI; GUO, 2014; HUANG et al., 1997; JAIN; TURNER, 2012).

As células foram expostas ao MnTBAP, molécula mimética da SOD2 ou ao Paraquat, que gera altos níveis de $O_2^{\cdot-}$. A mesma concentração molar (0,9 μ M) de MnTBAP e Paraquat aumentaram a produção de H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$, respectivamente, mostrando que nosso modelo foi capaz de gerar um desequilíbrio S-PH *in vitro*.

Adicionalmente, também observamos que o MnTBAP e o Paraquat diminuíram a viabilidade celular para cerca de 20% na mesma concentração molar, mostrando que o desequilíbrio induzido quimicamente poderia ser tóxico de alguma forma para as células, devido à geração de EROs que não poderia ser efetivamente neutralizado pelo sistema antioxidante endógeno de indivíduos redox desequilibrados.

Apesar destes achados, o tratamento com EACB foi capaz de reverter o estresse oxidativo em fibroblastos expostos a ambos os estressores. Além disso, os resultados do nosso estudo mostraram que o efeito da EACB em fibroblastos humanos, em termos de variáveis do metabolismo oxidativo e expressão de enzimas antioxidantes, não foi influenciado pelo desequilíbrio da S-PH.

Sabe-se que a castanha-do-brasil é rica em vários fitoquímicos e oligoelementos, como o Se, na forma de SeMet, também tem vitaminas, como Vitamina B6 e B3 (precursora de NADPH), muitas proteínas e aminoácidos, fibras e ácidos graxos insaturados (YANG, 2009). Assim, produzimos e caracterizamos um EACB e determinamos as quantidades de fitoquímicos e Se.

Várias moléculas bioativas, tais como, ácido gálico, epicatequina e resveratrol, entre outros, foram encontradas em quantidades consideráveis no extrato. No entanto, baixas concentrações de Se foi extraído no extrato o que, provavelmente, é um ponto positivo em um futuro estudo translacional, evitando assim o excesso de selênio aliado à uma suplementação natural rica em fitoquímicos antioxidantes.

Níveis baixos de EROs estão envolvidos em muitos processos fisiológicos, como o crescimento e diferenciação celular e, portanto, são indispensáveis para os processos de sinalização celular responsáveis pela manutenção da homeostasia. Níveis elevados de EROs recrutam sistemas antioxidantes endógenos e moléculas exógenas para prevenir danos celulares (BARREIROS; DAVID, 2006). No entanto, quando os níveis de espécies reativas suplantam a capacidade antioxidante endógena e exógena, ocorre o estresse oxidativo que causa dano ao DNA e às membranas celulares levando às doenças (BRESCIANI et al., 2013).

A capacidade importante de eliminação de EROs e ERNs pode ser atribuída aos fitoquímicos presentes na matriz química do EACB, especialmente polifenóis identificados no extrato (YILMAZ; TOLEDO, 2004). Vários estudos correlacionam o consumo de moléculas bioativas na castanha-do-brasil e benefício à saúde (ALASALVAR; BOLLING, 2015). O resveratrol, por exemplo, mostrou efeito protetor contra inúmeras doenças, como diabetes, câncer, doenças inflamatórias, neurodegenerativas e cardiovasculares (RODRIGO; MIRANDA; VERGARA, 2011).

Como parte do sistema antioxidante endógeno, as selenoenzimas GPx-1 e TrxR-1 dependem do fornecimento de Se para sua síntese e funcionamento correto. Em células AA-SOD2-like tratadas com EACB, a expressão gênica da GPX-1 foi similar ao controle positivo, enquanto a TrxR foi regulada positivamente. De maneira contrária, as células VV-SO2-like tratadas com EACB apresentaram maior expressão de GPx-1 e TrxR inalterada. Estes achados sugerem que os sistemas da GSH e Trx de mamíferos podem fornecer elétrons e servir como sistemas de backup um para o outro, como postulado anteriormente por Lu e Holmgren (2012).

As enzimas antioxidantes SOD e CAT são bem conhecidas por suas propriedades sequestradoras de EROs, uma vez que catalisam a conversão de $O_2^{\cdot-}$ para H_2O_2 (SOD) e, posteriormente, de água e oxigênio molecular (CAT) (BARREIROS; DAVID, 2006). O aumento da expressão dos genes enzimáticos SOD1 (citoplasmáticos) e SOD2 (mitocondriais), especialmente no modelo VV-SOD2, pode ser explicado devido à suplementação com EACB, uma vez que as castanhas-do-brasil contêm SeMet, um aminoácido análogo à metionina, um precursor de SOD (ROMAN; JITARU; BARBANTE, 2014) e também cisteína, um precursor de GSH (SHELLY; LU, 2013) e síntese de TrxR (LU; HOLMGREN, 2009). Adicionalmente, a expressão da CAT foi aumentada em ambos os modelos SOD2-like, demonstrando a modulação positiva da enzima, provavelmente associada à matriz química do EACB.

Os sistemas da GSH e Trx são os sistemas redutores mais proeminentes em células de mamíferos e, dentre outras enzimas já mencionadas, ajudam a proteger contra danos oxidativos para regular as vias de sinalização. Se a ingestão de Se for diminuída, pode haver uma produção ineficiente de selenoproteínas e selenoenzimas que, por sua vez, deixa a célula mais vulnerável aos danos oxidativos. EROs e ERNs podem ativar o sistema de resposta Nrf2-Keap1 (não

investigado aqui), que coordenam respostas celulares ao estresse oxidativo e eletrofílico (CEBULA; SCHMIDT; ARNÉR, 2015).

Em geral, os fibroblastos tratados com EACB apresentaram um maior nível de expressão das enzimas antioxidantes, mostrando que a matriz química do extrato, contendo a SeMet e fitoquímicos antioxidantes, foi capaz de reverter o estresse oxidativo gerado por ambos os estressores e também apresentou aumento no crescimento celular, possivelmente devido às propriedades antioxidantes dos constituintes químicos do EACB.

Recentemente, uma investigação realizada por HU et al. (2016) postulou que a ingestão de concentrações moderadas de Se (48 µg Se / dia por 6 semanas consecutivas) poderia ser benéfica para a remissão de fatores de risco de câncer colorretal, uma vez que este tipo de câncer está associado a um polimorfismo genético na SePP1 (HU et al., 2016).

Em função disto, a SeMet associada à matriz química do EACB, além da capacidade de reversão do estresse oxidativo causado pelos estressores, ainda mostrou um maior efeito nutrigenômico na expressão de todas as enzimas antioxidantes em fibroblastos S-PH desbalanceados quimicamente. A relação entre a expressão gênica das enzimas GPx-1 e TrxR-1 dependentes de selênio indicaram que ambos os sistemas GSH e Trx foram mantidos e acompanhados pela maior expressão das demais enzimas antioxidantes CAT e SODs. Assim sendo, nossos resultados suportam a hipótese de que a castanha-do-brasil pode atuar para minimizar o aumento do risco DCNT nos homozigotos da SOD2, incluindo o câncer de mama.

6 CONCLUSÃO

No trabalho de revisão da literatura sobre a importância da castanha-do-brasil na dieta, os dados indicam que quantidade moderada está diretamente envolvida com a proteção contra as DCNT. Atuais estudos e meta-análises sustentam dados que mostram a diminuição dos fatores de risco de doenças metabólicas e cardiovasculares e remissão das já estabelecidas. Estudos sobre a prevenção do câncer são escassos, mas a semente tem mostrado benefício na diminuição de risco do câncer colorretal quando há o envolvimento de polimorfismo genético da SePP1.

Em função da variabilidade dos indivíduos na resposta à suplementação com SeMet, os trabalhos experimentais *in vitro* mostraram a relevância dos estudos sobre o polimorfismo Val16Ala-SOD2 e o desbalanço S-PH quimicamente induzido no efeito da SeMet purificada e da SeMet associada à matriz química do EACB.

Considerando o polimorfismo Val16Ala-SOD2, no primeiro protocolo *in vitro*, a SeMet mostrou um efeito nutrigenético expressivo na modulação da expressão das (seleno)enzimas antioxidantes em todos os genótipos da SOD2. Contudo, o efeito da SeMet nas AA-CMSP corrobora a hipótese de Ambrosone et al. (1999) de que frutos e vegetais teriam potencial para diminuir os fatores de risco de câncer de mama no genótipo AA-SOD2, uma vez que a SeMet está disponível em vegetais e em alta concentração nas castanhas-do-brasil.

O segundo protocolo *in vitro* indicou que a SeMet associada à matriz química do EACB foi capaz de restaurar a homeostasia celular em situação de estresse oxidativo de maneira nutrigenômica nos fibroblastos AA-SO2-like e VV-SO2-like tratados com EACB, uma vez que mostraram diminuição dos parâmetros oxidativos e um mecanismo regulatório sinérgico em relação à expressão gênica das (seleno)enzimas antioxidantes. Por conseguinte, é provável atribuir à castanha-do-brasil um maior efeito nutrigenômico do que a SeMet purificada.

Apesar das limitações metodológicas das investigações *in vitro*, os autores sugerem a realização de mais investigações para avaliar o potencial efeito quimiopreventivo/ quimioprotetivo do EACB em células tumorais. Adicionalmente, nossos resultados sugerem a plausível extrapolação em estudos *in vivo* para confirmar os potenciais benefícios baseados na inclusão da castanha-do-brasil na dieta, considerando o polimorfismo humano Val16Ala-SOD2.

REFERÊNCIAS

- ALASALVAR, C.; BOLLING, B. W. Review of nut phytochemicals, fat-soluble bioactives, antioxidant components and health effects. **The British Journal of Nutrition**, v. 113 Suppl, n. S2, p. S68-78, apr. 2015.
- ALGARVE, T. D. et al. In vitro effects of Ala16Val manganese superoxide dismutase gene polymorphism on human white blood cells exposed to methylmercury. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 5134-5144, 2013.
- AMBROSONE, C. B. et al. Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) Genetic Polymorphisms, Dietary Antioxidants, and Risk of Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 59, p. 602-606, 1999.
- AUNE, D. et al. Nut consumption and risk of cardiovascular disease, cancer, all-cause and cause-specific mortality: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. **British Medical Journal**, p. 1-14, 2016.
- BARBISAN, F. et al. Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 1-11, 2014.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BAUER, G. Tumor cell-protective catalase as a novel target for rational therapeutic approaches based on specific intercellular ROS signaling. **Anticancer Research**, v. 32, n. 7, p. 2599-2624, 2012.
- BINDOLI, A.; RIGOBELLO, M. P. Principles in redox signaling: from chemistry to functional significance. **Antioxidant Redox Signaling**, v. 18, n. 13, p. 1557-1593, 2013.
- BJÖRNSTEDT, M. et al. Human thioredoxin reductase directly reduces lipid hydroperoxides by NADPH and selenocystine strongly stimulates the reaction via catalytically generated selenols. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 20, p. 11761-11764, 1995.
- BLUM, J.; FRIDOVICH, I. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 240, n. 2, p. 500-508, 1985.
- BRAICU, C. et al. Nutrigenomics in cancer: revisiting the effects of natural compounds. **Seminars in Cancer Biology**, 2017.
- BRASIL. Resolução ANVISA/MS RDC nº 269, de 22 setembro de 2005. **Regulamento Técnico Sobre Ingestão Diária Recomendada (IDR) Para Proteína, Vitaminas e Minerais**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2005.
- BRESCIANI, G. et al. The MnSOD Ala16Val SNP: relevance to human diseases and interaction with environmental factors. **Free Radical Research**, v. 47, n. 10, p. 781-792, 2013.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. et al. The Yin and Yang of Nrf2-regulated selenoproteins in carcinogenesis. **International Journal of Cell Biology**, v. 2012, 2012.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; FLOHÉ, L. Basic Principles and Emerging Concepts in the Redox Control of Transcription Factors. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 15, n. 8, p. 2335-2381, 2011.

BULTEAU, A.; CHAVATTE, L. Update on selenoprotein biosynthesis. **Antioxidants and Redox Signaling**, n. June 2017, p. 1-59, 2015.

CAPELETO, D. et al. The anti-inflammatory effects of resveratrol on human peripheral blood mononuclear cells are influenced by a superoxide dismutase 2 gene polymorphism. **Biogerontology**, v. 16, n. 5, p. 621-630, 2015.

CARDARELLI, H. R.; DE OLIVEIRA, A. J. Conservation of Brazil nut extract. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 4, p. 617-622, 2000.

CARDOSO, B. R. et al. Effects of Brazil nut consumption on selenium status and cognitive performance in older adults with mild cognitive impairment: a randomized controlled pilot trial. **European Journal of Nutrition**, v. 55, n. 1, p. 107-116, 2016.

CEBULA, M.; SCHMIDT, E. E.; ARNÉR, E. S. J. TrxR1 as a potent regulator of the Nrf2-Keap1 response system. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 23, n. 10, p. 823-853, 2015.

CHANG, J. C. et al. Selenium content of Brazil nuts from two geographic locations in Brazil. **Chemosphere**, v. 30, n. 4, p. 801-802, 1995.

CHANG, Y.; LI, H.; GUO, Z. Mesenchymal stem cell-like properties in fibroblasts. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 34, n. 3, p. 703-714, 2014.

CIRCU, M. L.; YEE AW, T. Glutathione and apoptosis. **Free Radical Research**, v. 42, n. 8, p. 689-706, 7 jan. 2008.

COSTA, F. et al. Influence of Val16Ala SOD2 polymorphism on the in-vitro effect of clomiphene citrate in oxidative metabolism. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 24, n. 4, p. 474-481, 2012.

DEL GOBBO, L. C. et al. Effects of tree nuts on blood lipids, lipoproteins, and blood pressure: Meta-analysis and dose-response of 61 trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 102, p. 1347-1356, 2015.

FAO/WHO/2001. **Human Vitamin and Mineral Requirements**. In: Report 7th Joint FAO/WHO Expert Consultation. Bangkok, Thailand, 2001.

FENECH, M. Genome health nutrigenomics and nutrigenetics - diagnosis and nutritional treatment of genome damage on an individual basis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 4, p. 1365-1370, 2008.

FLOEN, M. J. et al. Thioredoxin-1 redox signaling regulates cell survival in response to hyperoxia. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 75, n. 605, p. 167-177, 2014.

FLOHÉ, L. The labour pains of biochemical selenology: The history of selenoprotein biosynthesis. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1790, n. 11, p. 1389-1403, 2009.

FLOHÉ, L. et al. A comparison of thiol peroxidase mechanisms. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 15, n. 3, p. 763-780, 2011.

GANTHER, H. E. Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: Complexities with thioredoxin reductase. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 9, p. 1657-1666, 1999.

GROSSO, G. et al. Nut consumption on all-cause , cardiovascular , and cancer mortality risk : a systematic review and meta-analysis of epidemiologic studies 1 – 4. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 101, p. 783-793, 2015.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HARRIS, I. S. et al. Glutathione and Thioredoxin Antioxidant Pathways Synergize to Drive Cancer Initiation and Progression. **Cancer Cell**, v. 27, n. 2, p. 211-222, 2015.

HU, Y. et al. Supplementation with Brazil nuts and green tea extract regulates targeted biomarkers related to colorectal cancer risk in humans. **British Journal of Nutrition**, v. 116, n. 11, 2016.

HUANG, T. T. et al. Superoxide-mediated cytotoxicity in superoxide dismutase-deficient fetal fibroblasts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 344, n. 2, p. 424-432, 1997.

HUGUENIN, G. V. B. et al. Improvement of antioxidant status after Brazil nut intake in hypertensive and dyslipidemic subjects. **Nutrition Journal**, v. 14, n. 1, p. 54, jan. 2015.

INCA. Ministério da Saúde – Instituto Nacional do Câncer – **Números**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama>. Acesso em: 18 jun. 2017.

_____. Ministério da Saúde – Instituto Nacional do Câncer – **Números**. Disponível em:<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/perostata>>. Acesso em: 18 jun. 2017.

_____. Ministério da Saúde – Instituto Nacional do Câncer – **Números**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colorretal>>. Acesso em: 18 jun. 2017.

_____. Ministério da Saúde – Instituto Nacional do Câncer – **Números**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/estomago>>. Acesso em: 18 jun. 2017.

INOUE, H.; TANI, K. Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments. **Cell Death and Differentiation**, v. 21, n. 1, p. 39-49, 2014.

IP, C.; LISK, D. J. Bioactivity of selenium from Brazil nut for cancer prevention and selenoenzyme maintenance. **Nutrition and Cancer**, v. 21, n. 3, p. 203-212, 1994.

JAIN, V. K.; TURNER, N. C. Challenges and opportunities in the targeting of fibroblast growth factor receptors in breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 14, n. 3, p. 208, 2012.

JARIWALLA, R. J.; GANGAPURKAR, B.; NAKAMURA, D. Differential sensitivity of various human tumour-derived cell types to apoptosis by organic derivatives of selenium. **The British Journal of nutrition**, v. 101, n. 2, p. 182-189, 2009.

JEET, G. et al. Community health workers for non-communicable diseases prevention and control in developing countries: Evidence and implications. **PloS one**, v. 12, n. 7, p. e0180640, 2017.

JOHN, J. A.; SHAHIDI, F. Phenolic compounds and antioxidant activity of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*). **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 3, 2010.

KUPPUSAMY, U. R. et al. Antioxidant enzyme activities of human peripheral blood mononuclear cells exposed to trace elements. **Biological Trace Element Research**, v. 106, n. 1, p. 29-40, 2005.

LARABEE, J. L.; HOCKER, J. R.; HANAS, J. S. Mechanisms of inhibition of zinc-finger transcription factors by selenium compounds ebselen and selenite. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 3, p. 419-426, 2009.

LAZARD, M. et al. Trans-sulfuration pathway seleno-amino acids are mediators of selenomethionine toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 17, p. 10741-10750, 2015.

LILLIG, C. H.; BERNDT, C.; HOLMGREN, A. Glutaredoxin systems. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1780, n. 11, p. 1304-1317, 2008.

LÜ, J. et al. Cancer chemoprevention research with selenium in the post-SELECT era: Promises and challenges. **Nutrition and Cancer**, v. 68, n. 1, p. 1-17, 2016.

LU, J.; HOLMGREN, A. Selenoproteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 2, p. 723-727, 9 jan. 2009.

LU, J.; HOLMGREN, A. Thioredoxin System in Cell Death Progression. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 17, n. 12, p. 1738-1747, 2012.

LU, J.; HOLMGREN, A. The thioredoxin antioxidant system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 66, p. 75-87, 2014.

MORI, S. A.; PRANCE, G. T. Taxonomy, Ecology, and Economic Botany of the Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). **Advances in Economic Botany**, v. 8, p. 130-150, 1990.

NASCIMENTO, V. et al. Synthesis and biological evaluation of new nitrogen-containing diselenides. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 87, p. 131-139, 2014.

NÉMETH, A. et al. The relationship of selenium tolerance and speciation in Lecythidaceae species. **Metallomics : Integrated Biometal Science**, v. 5, n. 12, p. 1663–1673, 2013.

O'NEIL, C. E.; FULGONI, V. L.; NICKLAS, T. A. Tree Nut consumption is associated with better adiposity measures and cardiovascular and metabolic syndrome health risk factors in U.S. Adults: NHANES 2005-2010. **Nutrition journal**, v. 14, p. 64, 2015.

OTTEN, J. J.; HELLWIG, J. P.; MEYERS, L. D. IOM (INSTITUTE OF MEDICINE). **Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements**. Washington, DC: The National Academies Press, 2006. 1326 p.

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

PARK, H.-S. et al. Selenite Inhibits the c-Jun N-terminal Kinase/Stress-activated Protein Kinase (JNK/SAPK) through a Thiol Redox Mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 4, p. 2527-2531, 2000.

PARK, S. O. et al. Effects of combination therapy of docetaxel with selenium on the human breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7. **Annals of Surgical Treatment and Research**, v. 88, n. 2, p. 55-62, 2015.

PROSKURYAKOV, S. Y.; KONOPLYANNIKOV, A. G.; GABAI, V. L. Necrosis: A specific form of programmed cell death? **Experimental Cell Research**, v. 283, n. 1, p. 1-16, 2003.

REDMAN, C. et al. Inhibitory effect of selenomethionine on the growth of three selected human tumor cell lines. **Cancer Letters**, v. 125, n. 1-2, p. 103-110, 1998.

RIEDL, S. J.; SALVESEN, G. S. The apoptosome: signalling platform of cell death. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 5, p. 405-413, 2007.

RODRIGO, R.; MIRANDA, A.; VERGARA, L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 5-6, p. 410-424, 2011.

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

SAFA, A. R. Roles of c-FLIP in Apoptosis, Necroptosis, and Autophagy. **Journal of Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 76, n. 3-5, p. 211-220, 25 jul. 2013.

SHELLY, C.; LU. Glutathione Synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 5, p. 3143-3153, 2013.

SHIMIZU, N.; KOBAYASHI, K.; HAYASHI, K. The Reaction of Superoxide Radical with Catalase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 7, p. 4414-4418, 1984.

SHIMODA-MATSUBAYASHI, S. et al. Structural Dimorphism in the Mitochondrial Targeting Sequence in the Human Manganese Superoxide Dismutase Gene. A Predictive Evidence for Conformational Change to Influence Mitochondrial Transport and a Study of Allelic Association in Parkinson's Disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 226, p. 561-565, 1996.

SPALLHOLZ, J. E.; PALACE, V. P.; REID, T. W. Methioninase and selenomethionine but not Se-methylselenocysteine generate methylselenol and superoxide in an in vitro chemiluminescent assay: Implications for the nutritional carcinostatic activity of selenoamino acids. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, n. 3, p. 547-554, 2004.

STOYTICHEVA, Z. R.; BERRY, M. J. Transcriptional regulation of mammalian selenoprotein expression. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1790, n. 11, p. 1429-1440, 2009.

SUTTON, A. et al. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. **Pharmacogenetics**, v. 13, n. 3, p. 145-157, 2003.

SUZUKI, Y. J.; CARINI, M.; BUTTERFIELD, D. A. Protein carbonylation. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 12, n. 3, p. 323-325, 2010.

VEAL, E. A.; DAY, A. M.; MORGAN, B. A. Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling. **Molecular Cell**, v. 26, n. 1, p. 1-14, 2007.

WHO/2013. Global Action Plan for the Prevention and Control of Noncommunicable Diseases 2013-2020. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/94384/1/9789241506236_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 18 jun. 2017.

WROBEL, J. K.; POWER, R.; TOBOREK, M. Biological activity of selenium: Revisited. **IUBMB Life**, v. 68, n. 2, p. 97-105, 2016.

WU, J. et al. The effect of selenium, as selenomethionine, on genome stability and cytotoxicity in human lymphocytes measured using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Mutagenesis**, v. 24, n. 3, p. 225-232, 2009.

XU, G.; SHI, Y. Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. **Cell Research**, v. 17, n. 9, p. 759-771, 2007.

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

YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. T. Major Flavonoids in Grape Seeds and Skins : Antioxidant Capacity of Catechin , Epicatechin , and Gallic Acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 255-260, 2004.

ZENG, H. Selenium as an Essential Micronutrient: Roles in Cell Cycle and Apoptosis. **Molecules**, v. 14, p. 1263-1278, 2009.

ZHANG, J. et al. Targeting the Thioredoxin System for Cancer Therapy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 9, p. 794-808, 2017.