

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE NUTRIÇÃO EMÍLIA DE JESUS FERREIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

KAREN SALVE COUTINHO WOLINO

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) NOS NÍVEIS DE N-ÓXIDO DE TRIMETILAMINA EM PACIENTES COM DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

Niterói, RJ

2020

KAREN SALVE COUTINHO WOLINO

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) NOS NÍVEIS DE N-ÓXIDO DE TRIMETILAMINA EM PACIENTES COM DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal Fluminense como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre.

Campo de confluência: Ciências da Nutrição.

Orientadora:

PROF^a. DR^a MILENA BARCZA STOCKLER PINTO

Co-orientadora:

PROF^a. DR^a DENISE MAFRA

Niterói, RJ

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica automática - SDC/BNO
Gerada com informações fornecidas pelo autor

W848e Wolino, KAREN SALVE COUTINHO
Efeitos Da Suplementação Com Castanha-Do-Brasil
(Bertholletia excelsa H.B.K.) Nos Níveis De N-óxido De
Trimetilamina Em Pacientes Com Doença Arterial Coronariana /
KAREN SALVE COUTINHO Wolino ; MILENA BARCZA STOCKLER-PINTO,
orientadora ; DENISE MAFRA, coorientadora. Niterói, 2020.
71 f. : il.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense,
Niterói, 2020.

DOI: <http://dx.doi.org/10.22409/PPGCN.2020.m.15497012744>

1. Estudo sobre os efeitos da suplementação com a castanha-
do-Brasil nos níveis de N-óxido de trimetilamina (TMAO) em
pacientes com doença arterial coronariana.. 2. Ensaio
clínico randomizado controlado. 3. Produção intelectual. I.
STOCKLER-PINTO, MILENA BARCZA, orientadora. II. MAFRA, DENISE,
coorientadora. III. Universidade Federal Fluminense.
Faculdade de Nutrição. IV. Título.

CDD -

Bibliotecária responsável: Lúcia Espogeiro - CRB7/4708

KAREN SALVE COUTINHO WOLINO

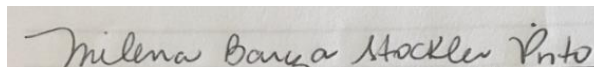
EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) NOS NÍVEIS DE N-ÓXIDO DE TRIMETILAMINA EM PACIENTES COM DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal Fluminense como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre.

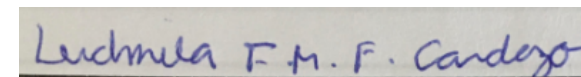
Campo de confluência: Ciências da Nutrição.

Aprovada em 04 de fevereiro de 2020

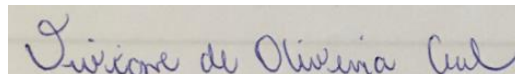
BANCA EXAMINADORA



Prof^ª Dr^ª Milena Barcza Stockler-Pinto – UFF
Orientadora



Prof^ª Dr^ª Ludmila Ferreira Medeiros de França Cardozo - UFF



Prof^ª Dr^ª Viviane de Oliveira Leal – UERJ

Niterói
2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, em especial aos meus pais, Zenilton do Amaral Coutinho e Sônia Lúcia Salve Coutinho, grandes apoiadores e incentivadores da minha trajetória acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradecer a Deus que é a minha esperança, meu refúgio e fortaleza e por ter me proporcionado chegar até aqui. Sem Ele, eu nada seria.

Gostaria de agradecer a minha orientadora Milena Barcza pela oportunidade, paciência, atenção, por todo o conhecimento transmitido e pelo grande crescimento e aprendizado que me proporcionou.

À minha co-orientadora Denise Mafra por todo o auxílio e conhecimentos transmitidos.

À todas as pessoas que compõe o grupo de pesquisa em nutrigenômica e nutrigenética por toda a ajuda e experiências compartilhadas, em especial a minha amiga e companheira de pesquisa Beatriz por ter me ajudado em todas as horas que precisei, por cada conselho e conhecimento transmitido.

Aos meus pais que sempre me apoiaram, incentivaram, pela força que me passavam em momentos de fraqueza e que apesar da distância não mediam esforços para estar junto comigo.

Aos meus irmãos e minhas cunhadas por todo apoio e amizade.

Ao meu esposo Guilherme, que muito me incentivou, pela compreensão, carinho e amor.

Ao programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição, por conceder a oportunidade para a realização do Mestrado.

“Bem-aventurado o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire conhecimento porque é melhor a sua mercadoria do que artigos de prata, e maior o seu lucro que o ouro mais fino; Mais preciosa é do que os rubis, e tudo o que mais possas desejar não se pode comparar a ela.”

(Provérbio 3: 13-15)

RESUMO

A doença arterial coronariana (DAC) é uma das principais causas de morte em todo o mundo. Diversos fatores de risco estão associados ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV) e recentemente o desequilíbrio da microbiota intestinal tem sido considerada um novo fator de risco relacionado a esse desfecho. Estudos vêm mostrando que as toxinas produzidas pela microbiota intestinal como o N-óxido de trimetilamina (TMAO) estão associadas com a formação da placa aterosclerótica. Nesse sentido, diversas estratégias têm sido sugeridas com o objetivo de modular a microbiota intestinal e reduzir os níveis de TMAO. O uso de alimentos fontes de nutrientes e compostos bioativos com funções de pré e probióticos têm sido propostos como uma estratégia promissora e nesse contexto, destaca-se a castanha-do-Brasil, um alimento tipicamente brasileiro, rico em selênio e compostos bioativos como os polifenóis. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da suplementação com castanha-do-Brasil nos níveis de TMAO em pacientes com DAC. Foram selecionados 69 pacientes com DAC atendidos no Hospital Universitário Antônio Pedro. Os pacientes foram randomizados em dois grupos, o grupo suplementação recebeu 1 castanha-do-Brasil por dia durante 3 meses e, o grupo controle, não recebeu nenhum tipo de suplementação durante 3 meses. Os dados antropométricos, clínicos e bioquímicos foram coletados antes e após o período de intervenção. Os níveis de TMAO, colina e betaína plasmáticos foram avaliados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). Finalizaram o estudo 25 pacientes do grupo suplementação (H=13/M=12; $62,6 \pm 6,6$ anos e média de IMC de $29,7 \pm 4,7$ kg/m²) e 14 pacientes do grupo controle (H=6/M=8; $65,1 \pm 7,1$ anos e média de IMC de $33,6 \pm 22,0$ kg/m²), totalizando 39 pacientes. Foi encontrado uma redução significativa na ingestão de fibra total após a suplementação com a castanha-do-Brasil ($26,6 \pm 16,2$ vs $18,2 \pm 6,7$ g; $p= 0,00$) e um aumento do selênio após a suplementação com a castanha-do-Brasil ($62,7 \pm 50,4$ vs $370,4 \pm 19,9$ µg; $p=0,00$). Quanto aos parâmetros bioquímicos, houve uma redução relevante no Índice de Castelli I ($4,3 \pm 2,3$ vs $3,6 \pm 0,7$ mg/dL; $p= 0,03$) no grupo suplementação e não foram encontradas alterações expressivas nos níveis de glutathiona peroxidase (GPx) no grupo suplementação ($24,0 \pm 12,8$ vs $35,0 \pm 17,4$ mg/dL; $p= 0,50$). Também não foram encontradas mudanças significativas nos níveis de TMAO no grupo suplementação e no controle, respectivamente ($0,15 \pm 0,1$ vs $0,16 \pm 0,08$ ng/µL $p= 0,79$; $0,16 \pm 0,1$ vs $0,17 \pm 0,08$ ng/µL $p= 0,14$). Da mesma forma, também não foram encontrados resultados expressivos nos níveis plasmáticos de colina no grupo suplementação e controle, respectivamente ($6,5 \pm 1,8$ vs $6,5 \pm 1,4$ ng/µL $p= 0,82$; $7,1 \pm 1,1$ vs $7,2 \pm 1,0$ ng/µL $p= 0,56$) bem como também não foram encontradas alterações nos níveis plasmáticos de betaína em ambos os grupos, respectivamente ($4,9 \pm 2,0$ vs $5,8 \pm 1,8$ ng/µL $p= 0,69$; $6,9 \pm 2,3$ vs $7,1 \pm 1,7$ ng/µL $p= 0,69$). Não foram encontradas alterações significativas nos demais parâmetros bioquímicos avaliados. Em conclusão, a suplementação com uma castanha-do-Brasil por dia durante três meses não promoveu alterações na toxina TMAO produzida pela microbiota intestinal.

Palavras-Chave: Doença Arterial Coronariana; Microbiota Intestinal; TMAO; Castanha-do-Brasil.

ABSTRACT

Coronary artery disease (CAD) is a leading cause of death worldwide. Several risk factors are associated with the development of cardiovascular disease (CVD) and recently the intestinal microbiota imbalance has been considered a new risk factor related to this outcome. The Studies have shown that toxins produced by microbiota as trimethylamine N-oxide (TMAO) are associated with the of atherosclerotic plaque formation. In this sense, several strategies have been suggested aiming to gut microbiota modulate and reduce TMAO levels. The use of nutrient source foods and bioactive compounds with pre-probiotic functions are proposed as a promising strategy, in this context, highlights on Brazil nuts, rich a selenium and bioactive compounds as the polyphenols. The aim of this study is to evaluate the effects of Brazil nut supplementation on TMAO levels in patients with CAD. 69 patients with CAD were selected treated at the University Hospital Antonio Pedro. Patients were randomized into two groups, the supplementation group that received 1 Brazil nut a day for 3 months and the control group without supplementation. Anthropometric, clinical and biochemical data have been collected before and after the intervention period. TMAO levels have been evaluated by high performance liquid chromatography coupled to sequential mass spectrometry (LC-MS / MS). The study concluded with 25 patients in the supplementation group (H = 13 / W = 12) and 14 patients in the control group (H = 6 / W = 8), totaling 39 patients. A significant reduction in total fiber intake was found after Brazil nuts supplementation ($26,6 \pm 16,2$ vs $18,2 \pm 6,7$ g; $p = 0,00$) and a increase in selenium after brazil nuts supplementation ($62,7 \pm 50,4$ vs $370,4 \pm 19,9$ μg; $p = 0,00$). Regarding biochemical parameters, there was a relevant reduction in the Castelli I Index ($4,3 \pm 2,3$ vs $3,6 \pm 0,7$ mg / dL; $p = 0,03$) in the supplementation group. There have been no significant changes in TMAO levels in the supplementation and control groups, respectively ($0,15 \pm 0,1$ vs $0,16 \pm 0,08$ ng/μL $p = 0,79$; $0,16 \pm 0,1$ vs $0,17 \pm 0,08$ ng/μL $p = 0,14$) Likewise, not expressive results in choline plasma levels were found in the supplementation and control group, respectively ($6,5 \pm 1,8$ vs $6,5 \pm 1,4$ ng / μL $p = 0,82$; $7,1 \pm 1,1$ vs $7,2 \pm 1,0$ ng / μL $p = 0,56$) and no changes in plasma betaine levels were also found in the supplementation and control group, respectively ($4,9 \pm 2,0$ vs $5,8 \pm 1,8$ ng / μL $p = 0,69$, $6,9 \pm 2,3$ vs $7,1 \pm 1,7$ ng / μL $p = 0,69$). No significant changes were found in the other biochemical parameters evaluated. In conclusion, Brazil nut supplementation one a day for three months does not promoted changes in the TMAO toxin produced by the gut microbiota.

Key Words: Coronary Artery Disease; Gut Microbiota; TMAO; Brazil Nut.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1. Características gerais da população avaliada	35
Tabela 2. Medicamentos utilizados pela população avaliada	35
Tabela 3. Características antropométricas dos pacientes com DAC	37
Tabela 4. Avaliação da ingestão alimentar dos pacientes estudados	39
Tabela 5. Avaliação bioquímica dos pacientes estudados	41
Tabela 6. Análise dos níveis de TMAO, colina, betaína e GPx	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resumo da formação do TMAO	23
Figura 2. Fluxograma da análise da suplementação com Castanha-do-Brasil	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABESO	Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica
AVC	Acidente vascular cerebral
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CAT	Acidente de trabalho
CC	Circunferência da cintura
CD36	Receptores de <i>scavenger</i> 36
CP	Circunferência do pescoço
CSE	Cistationina- γ -liase
CT	Colesterol total
Cyp7a1	Colesterol 7-Alfa Hidroxilase
DAC	Doença arterial coronariana
DCV	Doença cardiovascular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
FABP4	Proteína de ligação a ácidos
FMO	Monooxygenase de flavina
GAE.g ⁻¹	Equivalentes a ácido gálico
GPx	Glutationa peroxidase
HAH	American Heart Association
HDL	Lipoproteína de alta densidade

H ₂ Se	Seleneto de hidrogênio
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corporal
IRF8	Interferon 8
LC-MS/MS sequencial	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial
LDL-c	Lipoproteína de baixa densidade
LDL ox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
MAV	Malformação arteriovenosa
miRNAs	RNA não codificantes
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Pressão arterial
PCR	Proteína C-reativa
Pós SCA	Pós síndromes coronarianas agudas
PTCA	Angioplastia transluminal percutânea
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
TMA	Trimetilamina
TMA liases	Trimetilamina liase
TMAO	N-óxido de trimetilamina
USDA	United States Department of Agriculture Database
VCAM	Molécula de adesão celular vascular

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
2.0	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA	18
2.2	MICROBIOTA INTESTINAL.....	20
2.3	DISBIOSE INTESTINAL	21
2.4	O PAPEL DO TMAO NA DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA	22
2.5	NUTRIENTES E COMPOSTOS BIOATIVOS NA MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL E DOS NÍVEIS DE TMAO.....	24
2.6	CASTANHA-DO-BRASIL	26
3.0	OBJETIVOS	28
3.1	OBJETIVO GERAL	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4.0	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	CASUÍSTICA.....	29
4.1.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E NÃO-INCLUSÃO	29
4.1.3	PROCEDIMENTOS ÉTICOS	29
4.1.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	29
4.1.5	COMPOSIÇÃO DA CASTANHA-DO-BRASIL	30
4.1.6	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS DA CASTANHA-DO-BRASIL.....	31
4.1.7	AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL E DE INGESTÃO ALIMENTAR.....	31

4.1.8 AFERIÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL	31
4.1.9 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	32
4.1.10 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE TMAO, COLINA E BETAÍNA.....	32
5.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
6.0 RESULTADOS	34
7.0 DISCUSSÃO	46
8.0 CONCLUSÃO.....	53
9.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
10.0 ANEXOS	68

1.0 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Cerca de 17,5 milhões de pessoas morrem todos os anos vítimas de doenças cardiovasculares (DCV). Dentre as DCV, a Doença Arterial Coronariana (DAC) é uma doença crônica que se desenvolve ao longo de anos, se tornando grande problema de saúde pública. A incidência desta enfermidade aumenta com a idade, sendo maior em homens do que em mulheres, além disso, essa enfermidade pode se manifestar de diversas formas, como: como angina instável e estável, isquemia miocárdica, infarto agudo do miocárdio, morte súbita e outras.¹ A DAC é caracterizada pelo processo de aterosclerose, uma doença inflamatória que atinge a parede arterial causando lesões pelo acúmulo de gordura e células inflamatórias dentro da camada íntima da artéria.² Diversos fatores influenciam na formação das lesões ateroscleróticas, como envelhecimento, hipertensão arterial sistêmica, hipercolesterolemia, diabetes, tabagismo e a obesidade, esses fatores causam uma reação inflamatória na parede das artérias levando ao aumento de citocinas pró-inflamatórias que como consequência estimulam a expressão de moléculas de adesão leucocitária, moléculas de adesão intercelular (Proteína 1 de adesão celular vascular- VCAM, molécula de adesão intercelular 1- ICAM-1, P-selectina, E-selectina e L-selectina) e aumento de elementos quimiotáticos (Ligantes da proteína de quimioatração de monócitos- MCP-1 e fator estimulante de colônias de macrófagos- M-CSF), todos esses são amplificadores da cascata inflamatória.³

Nos últimos anos, evidências sugerem que o desequilíbrio da microbiota intestinal também é um fator de risco para as DCV, estimulando ainda mais essa cascata inflamatória.⁴ Através da metabolização de alguns nutrientes, a microbiota intestinal pode gerar compostos biologicamente ativos, como compostos de sinalização e toxinas.⁵⁻⁶ O N-óxido de trimetilamina (TMAO) é uma toxina derivada da microbiota intestinal e tem sido recentemente associado com o desenvolvimento de DCV,⁷⁻¹⁰ principalmente por induzir e agravar o processo de aterosclerose afetando o metabolismo do colesterol através da inibição da síntese de ácidos biliares hepáticos e por inibir o transporte reverso de colesterol.⁹⁻¹⁴

Diante disso, a modulação da microbiota intestinal tem sido proposta como estratégia terapêutica para redução do risco e desenvolvimento das DCV e desordens metabólicas.¹⁵ Atualmente, diversos estudos vêm mostrando o papel de nutrientes e compostos bioativos presentes nos alimentos na modulação da microbiota intestinal e na possível redução de seus metabólitos e redução do risco cardiovascular.¹⁶⁻¹⁹

Os alimentos de origem vegetal são as principais fontes de compostos bioativos, dentre estes alimentos, as oleaginosas tem se destacado por serem ricas em polifenóis como os flavonóides que são metabolizados pela microbiota intestinal alterando o perfil da microbiota e favorecendo o crescimento de bactérias do gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, promovendo assim, efeito prebiótico.²⁰⁻²³ Além dos compostos bioativos, os nutrientes presentes nas oleaginosas como as fibras, também podem auxiliar na homeostase intestinal através da modulação do perfil da microbiota.²⁴ Dentre as oleaginosas destaca-se a castanha-do-Brasil, fonte de diferentes classes de polifenóis, como os ácidos fenólicos e flavonoides e considerada principal fonte de selênio.²⁵⁻³⁰

Apesar das evidências mostrarem os efeitos benéficos das oleaginosas sobre a microbiota intestinal, ainda não há relatos sobre os efeitos dos nutrientes e compostos bioativos presentes na castanha-do-Brasil nos níveis de metabólitos derivados da microbiota intestinal como o TMAO nas DCV. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação com castanha-do-Brasil nos níveis plasmáticos de TMAO em pacientes com DAC.

2.0 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

As DCV estão entre as principais causas de morte no mundo e segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que cerca de 13 milhões de pessoas morrem todos os anos antes dos 70 anos por DCV.³¹ A DAC é uma doença crônica e multifatorial, resultado da obstrução das artérias coronárias e como consequência insuficiência da irrigação sanguínea ao coração, considerada dentre as DCV a mais comum e responsável por um elevado número de óbitos, sendo caracterizada pelo processo de aterosclerose.³²⁻³³

A aterosclerose é uma doença com diversas respostas celulares específicas,³⁴ sendo uma de suas características a obstrução das paredes das artérias causado pelo acúmulo de lipídios, células inflamatórias e elementos fibrosos que se depositam formando placas de gorduras.³⁵ Duas fases envolvem a formação do processo de aterosclerose, a primeira corresponde a formação anatômica da lesão através dos fatores de riscos aterogênicos podendo levar décadas para evoluir e por isso não traz manifestações clínicas e a segunda fase corresponde aos fatores de riscos trombogênicos que leva a formação do trombo sobre a placa aterosclerótica, onde ocorrem as manifestações clínicas importantes, como infarto, angina instável e morte súbita.³⁶ A principal consequência da obstrução das artérias coronárias e ruptura da placa é a angina instável, infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral isquêmico (AVC) podendo levar ao indivíduo a morte súbita.³⁷

A formação da placa aterosclerótica ocorre através da exposição das células endoteliais ao excesso de lipoproteína de baixa densidade (LDL-c), juntamente com a exposição a outros fatores como hipertensão, diabetes, estresse e tabagismo.³⁸ Todos esses fatores levam a uma disfunção do endotélio vascular que então permite a entrada de LDL e o acúmulo na matriz extracelular e sua oxidação, a LDL oxidado (LDL-ox) por sua vez leva ao aumento de reações pró-inflamatórias levando a ativação de células imunes inatas, principalmente os monócitos, que ao entrarem no subendotélio transformam-se em macrófagos através do estimulador de colônias de macrófagos. Uma vez transformados em macrófagos, estes têm a capacidade de fagocitar as LDL-ox e se transformarem em células espumosas que por sua vez liberam fatores de crescimento e citocinas que estimulam a migração de células musculares lisas vasculares (VSMC) para a camada íntima do endotélio contribuindo para a formação da capa fibrosa. Os

macrófagos com muitos lipídios fagocitados podem sofrer apoptose, liberando lipídios, mediadores inflamatórios e pró-trombóticos favorecendo assim a ruptura da placa.³⁸

O estresse oxidativo, condição presente nas DCV, também desempenha um papel importante na formação da placa aterosclerótica. O estresse oxidativo acontece quando se tem o desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) e fatores antioxidantes. O aumento da produção de EROs estimula respostas inflamatórias que afetam a função endotelial e o desenvolvimento da placa de aterosclerose, levando a um aumento de citocinas inflamatórias e de moléculas de adesão, principalmente a molécula de adesão celular vascular (VCAM).³⁹ Ademais a produção de EROs estimula a oxidação das LDL, facilitando a fagocitose pelos monócitos e macrófagos e sua transformação em células espumosas e o acúmulo de lipídios intracelulares,⁴⁰⁻⁴¹ contribuindo dessa forma para a proliferação celular, migração, inflamação, apoptose, necrose e finalmente trombose das placas ateroscleróticas.⁴²

Além disso, alterações epigenéticas, como metilação do DNA, alterações nas histonas e RNA não codificantes (miRNAs) também podem favorecer a formação da placa aterosclerótica através da diferenciação e ativação de monócitos a macrófagos. A hipometilação de algumas proteínas como a interferon 8 (IRF8) e a proteína de ligação a ácidos graxos 4 (FABP4) promovem o desenvolvimento de monócitos, acelerando o acúmulo de colesterol nos macrófagos contribuindo para a formação de células espumosas. Em contra partida, a hipermetilação de determinadas enzimas pode também acelerar o processo de aterogênese. A enzima cistationina- γ -liase (CSE) é o principal substrato para a formação do sulfeto de hidrogênio, uma molécula de sinalização gasosa que possui diversos efeitos fisiológicos, logo, a via CSE/sulfeto de hidrogênio estão envolvidos em processos como a vasorregulação, angiogênese, neuromodulação, citoproteção, redução do estresse oxidativo e sinalização celular, sendo assim, foi demonstrado que a hipermetilação e conseqüentemente o silenciamento dessa enzima pode ativar a resposta inflamatória dos macrófagos contribuindo para o estado inflamatório presente na aterogênese. Os miRNAs também tem forte associação com a formação da placa aterosclerótica, primeiro porque podem atuar no estresse oxidativo e no metabolismo lipídico, processos pelos quais tem efeitos iniciais na aterogênese, em segundo porque alterações nos miRNAs podem influenciar o envelhecimento vascular e contribuir para a formação da placa.⁴³⁻⁴⁴ Além dos fatores supracitados, recentemente o desequilíbrio da microbiota intestinal também tem sido relacionado à inflamação e ao surgimento da placa de aterosclerose.⁴

2.2 MICROBIOTA INTESTINAL

A microbiota intestinal refere-se aos microrganismos (bactérias, fungos, vírus) presentes no intestino podendo ter até 1000 espécies variadas, no entanto, os principais microrganismos presentes são as bactérias, destacando-se as bactérias do filo Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobactérias e Verrucomicrobia.⁴⁵⁻⁴⁶ Embora a microbiota intestinal varie de pessoa para pessoa, cada indivíduo carrega em torno de 3 a 6 quilos de bactérias com cerca de 3 milhões de genes que sintetizam proteínas, vitaminas e hormônios.⁴⁷

Diversos fatores influenciam no tipo de colonização microbiana no intestino, como o tipo de parto, idade, sexo, peso, estado de saúde, uso de antibióticos e estilo de vida,⁴⁸ além disso, a microbiota pode variar ao longo da vida, sendo nos primeiros anos de vida predominarem as bactérias dos filios Actinobacteria devido ao parto e ao aleitamento materno e na fase adulta predominam-se as Bacteroidetes e Firmicutes, ambas relacionadas ao estilo de vida e hábitos alimentares.⁴⁹⁻⁵¹

O filo mais abundante de bactérias presentes na microbiota intestinal são os Bacteroidetes, presentes principalmente na parte distal do intestino e com alta capacidade metabólica, capazes principalmente de metabolizar carboidratos de fontes alimentares. O filo Firmicutes expressa genes que participam do transporte intracelular de nutrientes, além de sustentar o crescimento e a integridade das células epiteliais do cólon. O terceiro filo mais abundante são as Actinobacteria, capazes de transformar carboidratos não-digeríveis em ácidos graxos de cadeia curta e de neutralizar patógenos. As Proteobactérias estão em menor número e agem como bactérias oportunistas e as Verrucomicrobia estão relacionadas com a melhora da saúde metabólica.⁴⁹

A microbiota intestinal desempenha funções que estão relacionadas ao sistema imunológico, digestão, armazenamento de gordura, regulação da angiogênese, metabolização de nutrientes e síntese de vitaminas, bem como regulação neuroendócrina repercutindo no comportamento dos indivíduos.⁵² Em condições específicas, as comunidades microbianas vivem em equilíbrio, no entanto, fatores genéticos e condições ambientais como fumo, álcool, hábitos alimentares e estilo de vida podem desequilibrar as comunidades bacterianas e contribuir para o desenvolvimento de determinadas patologias.⁴⁸

2.3 DISBIOSE INTESTINAL

O termo disbiose intestinal refere-se ao desequilíbrio da integridade (estrutural) e da composição (funcional) da microbiota intestinal e está relacionada ao surgimento de doenças metabólicas, como a diabetes, obesidade, hipertensão, insuficiência cardíaca⁵³⁻⁵⁴ e mais recentemente estudos mostraram que a disbiose está relacionada também ao surgimento da aterosclerose.⁴⁻⁷⁻⁵⁵ Grandes mudanças nas proporções dos filos bacterianos ou o crescimento de novos grupos bacterianos levam a disbiose intestinal, assim, uma redução na diversidade microbiana são características cruciais da disbiose.⁵⁶ Exemplo característico de disbiose é o desequilíbrio entre os filos Firmicutes e Bacteroidetes, uma mudança na abundância relativa destes dois filos com o crescimento de Firmicutes em detrimento de Bacteroidetes está associado a maior risco de ganho de peso e doenças associadas a obesidade.⁵⁷⁻⁵⁸ Além disso, algumas bactérias que vivem em simbiose podem se tornar patogênicas quando presentes em maior proporção no intestino, como é o caso das bactérias Patobiontes, sendo difícil identificar a sua expansão quando ocorre paralelamente a outras mudanças na composição microbiana do intestino.⁵⁶

Normalmente um único fator não é o suficiente para causar a disbiose intestinal, visto que, a microbiota intestinal tem a capacidade de se adaptar às mudanças das condições ambientais e da disponibilidade de nutrientes, no entanto, a combinação de diversos fatores intrínsecos e extrínsecos pode afetar a composição microbiana e até causar alterações que podem ser transitórias ou duradouras com consequências inofensivas ou maléficas. O estresse oxidativo, os bacteriófagos e as bacteriocinas, até mesmo a temperatura e a pressão parcial do oxigênio são exemplos de fatores agravantes que contribuem para transposição da microbiota, diminuindo a diversidade microbiana até chegar ao nível de disbiose.⁵⁹⁻⁶¹

Alterações na composição da microbiota intestinal pode justificar o motivo de alguns indivíduos serem mais propensos a desenvolver algumas doenças, além disso, alterações na composição microbiana difere em diferentes condições de doenças, como por exemplo, em pacientes com diabetes tipo 2 ocorre uma diminuição de Firmicutes e aumento não muito significativo de Bacteroidetes e Proteobacteria, entretanto, em pacientes com DAC ocorre o aumento significativo de Firmicutes e uma diminuição de Bacteroidetes.⁶²⁻⁶³

A disbiose intestinal tem se tornado um alvo promissor de pesquisas e ganhado destaque no desenvolvimento de DCV principalmente por esta relacionada a progressão da aterosclerose e da hipertensão arterial, principais fatores de riscos relacionados a DCV.⁶⁴ Em um estudo a

análise de amostras fecais de 218 indivíduos com aterosclerose foi comparada com amostras fecais de 187 indivíduos saudáveis, os resultados mostraram que a microbiota intestinal de indivíduos com aterosclerose foi diferente de indivíduos saudáveis principalmente pela presença aumentada de bactérias *Enterobacteriaceae* e *Streptococcus spp* nos indivíduos com aterosclerose.⁶⁵⁻⁶⁶ Além disso, estudos vêm mostrando que o aumento de grupos bacterianos específicos na disbiose está associado a uma produção aumentada de toxinas pelas bactérias intestinais, promovendo inflamação, estresse oxidativo e favorecendo o desenvolvimento de DCV.⁵⁵⁻⁶⁷

2.4 O PAPEL DO TMAO NA DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

Toxinas são produtos orgânicos que podem ser produzidas pela microbiota intestinal, metabolismo endógeno ou ingeridas através da alimentação,⁶⁷ além disso, em situações de disbiose intestinal ocorre o aumento de bactérias capazes de produzir essas toxinas.⁶⁸ O N-Óxido de trimetilamina é uma das principais toxinas produzidas pela microbiota intestinal e pode ter os seus níveis aumentados na presença de disbiose⁶⁷⁻⁶⁹ e nesse contexto, níveis elevados de TMAO podem afetar a homeostase lipídica e levar ao desenvolvimento de aterosclerose.⁷⁰

A produção do TMAO acontece através da atuação de bactérias específicas que contém enzimas denominadas de trimetilamina liases (TMA liases), estas enzimas agem nos nutrientes provenientes dos alimentos fonte de colina, L carnitina e betaína, transformando esses nutrientes em trimetilamina (TMA), que por sua vez é absorvida pelo hospedeiro e posteriormente transformada em TMAO no fígado pelas monooxygenase de flavina (FMO).⁵³ Alimentos que contém os precursores do TMAO podem aumentar os níveis de TMAO no sangue e na urina, assim sendo, as carnes vermelhas, ovos, leites são as principais fontes de precursores (colina e carnitina) de TMA e conseqüentemente de TMAO. Além disso, os peixes e frutos do mar também são ricos em colina, já os grãos e os vegetais verdes como o espinafre são fontes ricas em betaína, que também podem ser precursores de TMA.⁷¹⁻⁷³ (Figura 1).

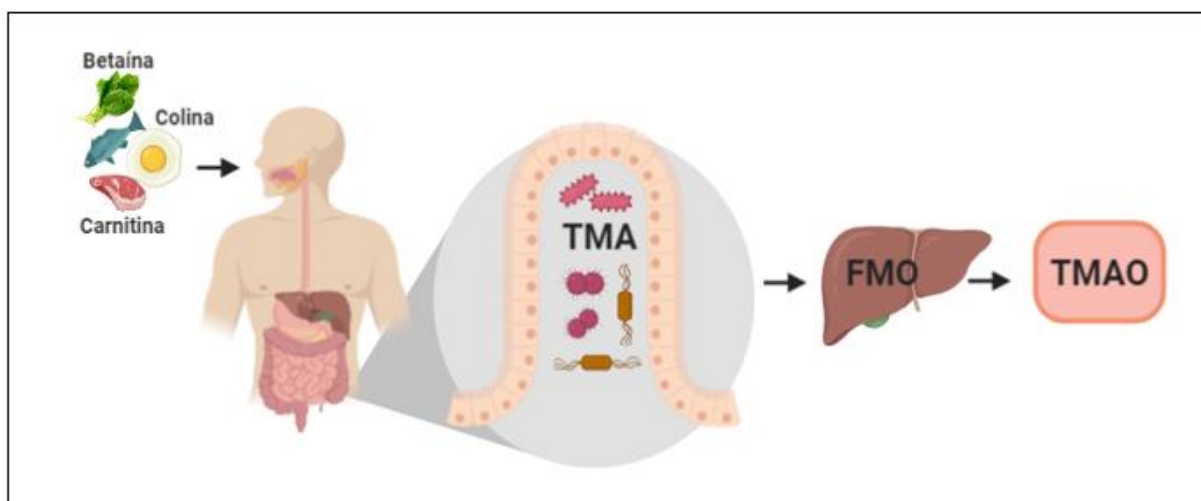


Figura 1. Resumo da formação do TMAO. Ingestão de alimentos ricos em betaína, colina e carnitina. Na microbiota intestinal esses nutrientes são metabolizados, absorvido pelo hospedeiro e transformado em TMAO no fígado pelas FMO.

Em um estudo realizado em 2013 com 4007 pacientes, os autores mostraram que após a supressão da microbiota intestinal com antibióticos orais a produção de TMAO foi suprimida, no entanto, quando retirados os antibióticos os níveis de TMAO voltaram a ser produzidos.⁷⁴ Diante disso, alguns estudos tem investigado quais bactérias intestinais poderiam estar relacionadas com a produção de TMA e conseqüentemente formação do TMAO, nesse sentido foi demonstrado que, dentre as espécies produtores de TMA, encontram-se as *Deferribacteraceae*, *Anaeroplasmataceae*, *Prevotellaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Anaerococcus*, *Cladidium asparagiforme*, *Clostridium hathewayi*, *Clostridium sporogenes*, *Escherichiafergusonii* *Proteuspenneri*, *Providencia rettgeri* e *Edwardsiella*.⁹⁻⁷⁵⁻⁷⁶

A produção elevada de TMAO pelas bactérias intestinais acelera o processo de aterosclerose através da sua ligação com os sais biliares, esse processo acontece através da inibição do Colesterol 7-Alfa Hidroxilase (Cyp7a1), enzima que tem função de oxidar o colesterol o transformando em hidroxicolessterol que é uma substância fundamental para a síntese de ácidos biliares e controle do metabolismo do colesterol. Com a inibição da Cyp7a1 e conseqüentemente da síntese dos ácidos biliares, a capacidade de eliminar lipídios como o colesterol fica prejudicada podendo gerar um acúmulo de colesterol na corrente sanguínea e conseqüentemente acúmulo de colesterol nas artérias, contribuindo para o desenvolvimento da placa aterosclerótica.⁹⁻⁷⁷⁻⁷⁹ Além disso, o aumento dos níveis de TMAO pode inibir o transporte reverso de colesterol, contudo, o mecanismo pelo qual o TMAO inibe esse processo ainda não está bem compreendido.⁸⁰ Níveis elevados de TMAO também estão relacionados

com alterações nos estímulos para a liberação de cálcio, aumentando dessa forma a ativação plaquetária, levando então ao maior risco de trombose e de eventos coronarianos.¹⁰

Além desses mecanismos, a produção elevada de TMAO pode influenciar vias moleculares importantes. Alterações moleculares transcricionais nas células endoteliais e nas células musculares lisas precedem a formação da placa de aterosclerose, nesse sentido, o fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB) está envolvido na resposta inflamatória celular e é estimulado pelo estresse oxidativo, radicais livres e LDL-ox. Recentemente estudos vêm mostrando que o TMAO também pode estimular a ativação do NF-κB levando ao aumento de citocinas pró-inflamatórias principalmente o fator de crescimento tumoral alfa (TNF-α), interleucina 6 (IL-6) e proteína C-reativa (PCR), agravando ainda mais a disfunção endotelial, inflamação vascular e a formação da placa aterosclerótica.⁸¹⁻⁸² Ademais, níveis aumentados de TMAO também aumentam a expressão de receptores de *scavenger* 36 (CD36) em macrófagos. Esses receptores são responsáveis pela captação de lipídios e quando estimulados podem levar ao acúmulo de lipídios nos macrófagos, formação de células espumosas e estimulando assim a formação da placa aterosclerótica.⁸³

Diante desses resultados, controlar os níveis de TMAO através da modulação da microbiota intestinal, pode ser uma estratégia terapêutica na DCV.¹⁵⁻⁸⁴ A alimentação é um dos principais fatores que podem influenciar a composição da microbiota intestinal, assim, hábitos alimentares saudáveis, rica em vegetais, fibras e baixo teor de gorduras saturadas podem reduzir o risco de disbiose, em contrapartida, uma dieta rica em gorduras saturadas, açúcares, reduzida em fibras pode diminuir a diversidade da microbiota intestinal e favorecer o surgimento da disbiose.⁸⁵⁻⁸⁷ Dessa forma, diversos estudos recentes têm mostrado que os compostos bioativos e nutrientes presentes nos alimentos são capazes de alterar os níveis de TMAO através da modulação da microbiota intestinal, favorecendo o crescimento de bactérias benéficas como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* ou através da diminuição das bactérias produtoras de TMA.¹⁶⁻¹⁹

2.5 NUTRIENTES E COMPOSTOS BIOATIVOS NA MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL E DOS NÍVEIS DE TMAO

Compostos bioativos são substâncias presentes nos alimentos que podem agir benéficamente em mecanismos de ação celular, prevenindo o surgimento de doenças e trazendo diversos benefícios para a saúde.⁸⁸ Esses compostos atuam em diversas funções como, atividade antioxidante, modulação de enzimas de detoxificação, estímulo ao sistema imune, redução da

agregação plaquetária, da atividade antibacteriana e antiviral.⁸⁹ Além dos compostos bioativos, os nutrientes presentes nos alimentos como as fibras, os ácidos graxos poli-insaturados e monoinsaturados, as vitaminas e os minerais podem também promover o bem estar dos indivíduos e ajudar na prevenção de diversas doenças, principalmente as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT).⁹⁰⁻⁹¹

Utilizar alimentos ricos em nutrientes e compostos bioativos pode ser uma estratégia para modular a microbiota intestinal e reduzir o risco de desenvolvimento de DCV.¹⁵ Dentre os compostos bioativos, os polifenóis são os que até o momento apresentam maior associação com a modulação da microbiota intestinal e redução dos níveis de TMAO¹⁹⁻⁹². Chen et al., (2016), demonstraram que a suplementação com resveratrol, um polifenol encontrado principalmente nas uvas, aumentou as concentrações de bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e diminuiu as concentrações de bactérias produtoras de TMA, reduzindo os níveis de TMAO em camundongos C57BL/6J e knockout para apolipoproteína E (ApoE^{-/-}). Os autores observaram ainda que a suplementação com resveratrol aumentou a atividade dos sais biliares através do aumento da enzima Cyp7a1.¹⁹ Annunziata et al., (2019), também demonstraram que a suplementação por 4 semanas com extrato de uva (300mg) em indivíduos saudáveis foi capaz de reduzir em torno de 63% os níveis de TMAO plasmático em comparação ao grupo controle.⁹³

Além do resveratrol, a alicina, outro polifenol presente no alho, também foi capaz de reduzir os níveis de TMAO em camundongos C57BL/6. O grupo que recebeu água rica em carnitina (0,02%) tiveram os níveis de TMAO aumentados, no entanto, o grupo que recebeu água rica em carnitina (0,02%) em conjunto com 10 mg/kg/dia de alicina tiveram os seus níveis de TMAO reduzidos. Os níveis de TMAO no grupo que recebeu a suplementação com alicina também foi menor quando comparado ao grupo controle que recebeu apenas a dieta padrão.⁹²

Os nutrientes como as fibras presentes nos alimentos também estão relacionados a diminuição dos níveis de TMAO através da remodelação da microbiota intestinal. Liu et al., (2017) demonstraram que a suplementação de fibras solúveis em baixas doses (7,5%) ou em altas doses (15%) em camundongos C57BL/6 reduziu significativamente os níveis de TMA, TMAO e favoreceu o crescimento de Bifidobactérias.⁹⁴

Outros nutrientes, como o selênio também são capazes de modular a microbiota intestinal. Em um estudo onde a microbiota intestinal de ave foi analisada, os autores demonstraram que a suplementação de 0,9 mg/kg selênio foi capaz de modular a microbiota intestinal, aumentando o crescimento de bactérias benéficas (*Lactobacillus* e *Faecalibacterium*)

além de aumentar da produção de ácidos graxos de cadeia curta, principalmente o ácido butírico.⁹⁵ Paralelamente a esse estudo, um outro estudo também utilizou a suplementação com selênio e avaliou a composição da microbiota intestinal em camundongos. Os camundongos foram submetidos a uma dieta deficiente em selênio e dietas ricas em selênio (0,1, 0,4 ou 2,25 ppm de selênio sob a forma de selenito de sódio). Em todas as dosagens de suplementação com selênio houve um aumento na diversidade da microbiota intestinal principalmente nos filos pertencentes a classe Bacteroidetes. Esses resultados mostram que o selênio pode afetar a composição da microbiota intestinal, levando principalmente ao aumento de bactérias benéficas,³⁰ no entanto ainda não se tem relatos se o selênio é capaz de diminuir os níveis de TMAO.

2.6 CASTANHA-DO-BRASIL

Dentre os principais alimentos fontes de selênio, destaca-se a castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) nativa da região amazônica com concentrações que podem variar 55 mg/g até mais de 400 mg/g,⁹⁶ todavia, essas concentrações dependem da biodisponibilidade do solo que pode ser influenciada principalmente por fatores geológicos e por diversos fatores biológicos, físicos e químicos.⁹⁷⁻⁹⁸ A castanha-do-Brasil faz parte do grupo das oleaginosas juntamente as amêndoas, macadâmias, pecãs, avelãs, castanhas do caju e nozes. Especialmente a castanha-do-Brasil destaca-se as concentrações de polifenóis como catequinas, ácido gálico e estilbenos bem como alguns nutrientes como o selênio, cálcio, folato, potássio e fibras, além de apresentar importantes concentrações de ácidos graxos ômega 6 e ômega 3.⁹⁹⁻¹⁰²

O selênio, principal nutriente encontrado na castanha-do-Brasil, é um nutriente essencial para a saúde humana desempenhando diversas funções no organismo como fortalecimento do sistema imune e regulação do metabolismo da tireoide.¹⁰³⁻¹⁰⁴ Suas funções são mediadas por diversas selenoproteínas, dentre as quais se destaca a glutathione peroxidase (GPx), uma importante selenoproteína envolvida no metabolismo dos EROS principalmente por catalisar a redução de diversos peróxidos em água e álcool desempenhando dessa forma atividade antioxidante.¹⁰⁵

O aumento dos níveis de selênio no sangue pode ser observado em indivíduos que consumiam grandes quantidades de castanha-do-Brasil, além disso, populações que incluem esta castanha regularmente nas suas dietas apresentam também níveis altos de selênio no sangue demonstrando dessa forma que o selênio encontrado na castanha-do-Brasil é de alta biodisponibilidade e que a inclusão da mesma na alimentação diária pode ser uma alternativa

eficaz para melhorar o status de selênio principalmente em populações deficientes em selênio.¹⁰⁶⁻¹⁰⁷

Estudos mostram que o consumo diário de uma castanha-do-Brasil está relacionado a diminuição do risco de DCV devido aos seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, além disso, uma revisão publicada recentemente por Ferrari (2020) mostrou que a castanha-do-Brasil pode atuar protegendo contra DCV por melhorar a função endotelial, diminuir a pressão sanguínea proteger o LDL da peroxidação, diminuir a oxidação do DNA e melhorar o metabolismo lipídico.¹⁰⁸⁻¹⁰⁹ Além do mais, estudos recentes vêm mostrando que o alto teor de polifenóis presentes nas oleaginosas podem modular o perfil da microbiota intestinal auxiliando na saúde, homeostase intestinal e melhora do perfil de diversas doenças.¹¹⁰ Diante desses resultados, a castanha-do-Brasil pode ser uma estratégia para modular a microbiota intestinal e reduzir os níveis plasmáticos de TMAO em indivíduos com DAC.

3.0 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da suplementação com castanha-do-Brasil nos níveis plasmáticos de TMAO em pacientes com DAC.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar antes e após a suplementação:

- Os polifenóis presentes na castanha-do-Brasil;
- O estado nutricional geral desses pacientes;
- Os parâmetros bioquímicos de rotina;
- Os níveis plasmáticos de colina e betaína;
- Os níveis plasmáticos de glutathione peroxidase (GPx);
- A ingestão colina, carnitina, betaína e selênio;
- Correlacionar à ingestão de energia, macronutrientes e micronutrientes com os níveis de TMAO e parâmetros bioquímicos.

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Esta pesquisa trata-se de um ensaio clínico randomizado controlado, onde foram randomizados 39 pacientes com DAC encaminhados à cintilografia miocárdica no Setor de Medicina Nuclear do Hospital Universitário Antônio Pedro - UFF, localizado em Niterói – RJ, que receberam a castanha-do-Brasil e foram comparados com 30 pacientes com DAC que não receberam a castanha (grupo controle) (Figura 2). A randomização foi feita em blocos através de amostra de conveniência. Foi elaborado um banco de dados incluindo, dados antropométricos bem como clínicos e bioquímicos.

4.1.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E NÃO-INCLUSÃO

Foram incluídos no estudo homens e mulheres maiores de 20 anos. Foram excluídos do estudo pacientes com doenças autoimune e infecciosa, câncer, HIV, hepatopatias e doença renal crônica, pacientes em uso de drogas catabolizantes, de suplementos vitamínicos antioxidantes e em uso de antibióticos ou probióticos e prebióticos e pacientes com o hábito de consumir oleaginosas.

4.1.3 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

Este projeto de pesquisa é parte do projeto denominado “Efeitos da suplementação com Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa H.B.K.*) na expressão de NRF2 e NF- κ B em pacientes com Doença Arterial Coronariana” que foi aprovado pelo Comitê de Ética – da Faculdade de Medicina do Hospital Universitário Antônio Pedro – UFF (Número: 826.041) (Anexo). Registro: RBR-5MZZD4.

4.1.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL,

Inicialmente o sangue foi coletado dos participantes da pesquisa, logo após, estes receberam 1 unidade de castanha-do-Brasil por dia durante 3 meses. As castanhas foram doadas pela empresa Arauanã Agricultura S/A. A castanha foi oferecida aos pacientes em dois momentos com uma duração de seis semanas cada (totalizando três meses) e foram separadas em embalagens contendo sete unidades. As embalagens foram identificadas semanalmente a fim de reduzir a possibilidade de erros na ingestão. A adesão ao suplemento foi verificada semanalmente através do contato telefônico com os participantes. O grupo controle não recebeu a suplementação e foram orientados a não consumirem castanha-do-Brasil e nenhuma outra oleaginosa durante o período da pesquisa. Durante esse período foram coletados os dados

antropométricos, de ingestão alimentar e durante o período de intervenção foi feito o acompanhamento dos exames bioquímicos de rotina. Antes e após a suplementação foram feitas todas as análises citadas nos métodos.

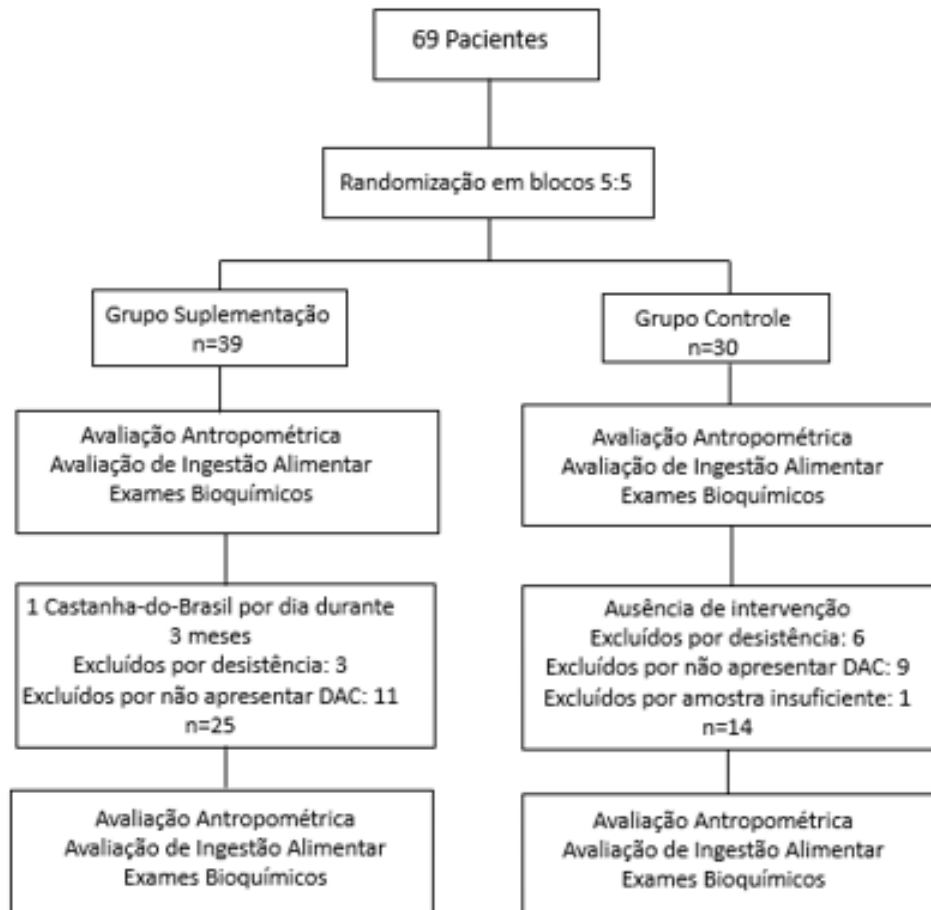


Figura 2. Fluxograma da análise da suplementação com Castanha-do-Brasil

4.1.5 COMPOSIÇÃO DA CASTANHA-DO-BRASIL

De acordo com a análise química feita anteriormente pelo grupo e publicado por Stockler-Pinto et al., (2010), a castanha-do-Brasil utilizada nesse estudo pesa em média 5g e contém 0,75g de proteína, 0,45g de carboidrato e 3,53g de lipídios. O valor calórico total é de 36,7 kcal e a quantidade de selênio é de 290,5 µg.¹¹¹ De acordo com a Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos (TACO), em 100g de castanha-do-Brasil contém em média 7,9g de fibras totais.

4.1.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS DA CASTANHA-DO-BRASIL

Primeiramente foi feito o preparo do extrato da castanha-do-Brasil e foi realizado segundo Buratto et al., (2011).¹¹² Duas gramas da castanha-do-Brasil foram pesados e então foi adicionado 15ml de metanol a 80%, após isto, a amostra foi colocada a 70°C em banho de água termostaticado por 30 minutos e posteriormente foi filtrada para a obtenção do extrato. A análise do teor de polifenóis foi feita então através da redução do reagente Folin-Ciocalteu e a leitura foi feita a 725nm no espectrofotômetro.

4.1.7 AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL E DE INGESTÃO ALIMENTAR

Foram avaliados os seguintes parâmetros antropométricos: massa corporal, estatura, circunferência da cintura (CC) e circunferência do pescoço (CP). O estado nutricional foi avaliado segundo o Índice de Massa Corporal (IMC), obtido pela razão entre a massa corporal e o quadrado da estatura, e sua classificação seguiu o proposto pela OMS.¹¹³⁻¹¹⁴

Quanto à classificação da circunferência da cintura, foram utilizados os valores ≥ 94 cm e ≥ 102 cm para homens ou ≥ 94 cm e $80 \geq$ cm para mulheres que são considerados pontos de corte para risco aumentado de desenvolver DCV.⁵ Quanto à classificação da circunferência do pescoço, foram utilizados os valores <37 cm e >37 cm para homens ou <34 cm e >34 cm para mulheres que também são considerados pontos de corte para risco aumentado de desenvolver DCV.¹¹⁵

A ingestão alimentar foi obtida segundo a técnica de recordatório alimentar de 24 horas de 2 dias, sendo um dia do final de semana e um dia de semana, e analisada através do software DietWin®, para a análise de ingestão de fibra total foi considerado os valores de recomendação adequada de 14g de fibra para cada 1.000 caloria.¹¹⁶ Para a análise da colina foi utilizado o software DietWin, para a betaína foi utilizado à base de dados da USDA (United States Department of Agriculture Database) e para análise da carnitina foi utilizado a tabela proposta por Rebouche, 1984.¹¹⁷

4.1.8 AFERIÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL

A aferição da pressão arterial (PA) foi feita com o paciente em repouso por mais de cinco minutos, após isso o paciente foi orientado a ficar sentado com os pés apoiados ao chão, dorso apoiado na cadeira, braço na altura do coração com as palmas das mãos voltado para

cima. A medida da PA foi então realizada através da técnica auscultatória com uso de esfigmomanômetro e manguito.

4.1.9 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Foram coletadas amostras de sangue de todos os participantes no período da manhã, após 12 horas de jejum. O sangue foi coletado em tubo (Vacutainer®) contendo anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e o plasma centrifugado a 4500 rpm durante 15 minutos a 4°C, separado e armazenado em -80 °C para posterior análises. Os níveis séricos de colesterol total (CT), triglicerídeos (TG), lipoproteína de alta densidade (HDL), glicose, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foram determinados usando kits Bioclin® através do analisador bioquímico automático Bioclin BS-120 Chemistry Analyze. O LDL foi calculado através da fórmula de Friedewald ($LDL: CT - HDL - TG/5$) considerando os valores para triglicerídeos inferiores a 400mg/dL.¹¹⁸ Para avaliar o risco aterogênico foi utilizado o índice de Castelli I e II, considerando os valores de referência de: índice de Castelli I < 4,3mg/dL e índice de Castelli II < 2,9mg/dL.¹¹⁹ A análise da GPX foi feita por meio do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) através do kit da Cayman chemical de acordo com o protocolo do fabricante.

Os valores de CT, HDL, LDL e TG foram comparados com os valores de referências recomendados pela V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção de Aterosclerose (2017)¹¹⁷ e foram estratificado de acordo com o risco cardiovascular, considerando os valores de referência de < 200mg/dL para CT, hipercolesterolemia isolada ($LDL > 160mg/dL$), hipertrigliceridemia isolada ($TG > 150mg/dL$ em jejum), hiperlipidemia mista ($LDL > 160mg/dL$ e $TG > 150mg/dL$ em jejum), HDL-c baixo (homens < 40 mg/dL e mulheres < 50 mg/dL).¹²⁰ Para a glicose foi considerado o valor de referência recomendado pela Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018, considerando os valores de glicemia em jejum < 100 mg/dL.¹²¹ Quanto aos valores de AST e ALT foram utilizados os valores de referência respectivamente de até 31 U/L para mulheres e de até 37 U/L para homens e de até 31 U/L para mulheres e de 41 U/L para homens.

4.1.10 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE TMAO, COLINA E BETAÍNA

A quantificação de TMAO, colina e betaína foi realizada pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) no Instituto Karolinska na Suécia, utilizando um protocolo projetado especialmente para este fim. As alíquotas extraídas do plasma foram codificadas com padrões internos, constituídos por

TMAO-D9 em metanol e água com prolina como padrão de recuperação. TMAO, colina e betaína foram então detectados com espectrofotômetro de massa Agilent 6490 Triple Quadrupole e para o processamento dos dados foi utilizado o software da análise quantitativa do MassHunter.¹²² Segundo a European Uremic Solutes Database (EUTox-db) são considerados valores de referência para indivíduos saudáveis de TMAO de 2,9 μmol e de colina e betaína de 10,0 μmol e de 4,3 μmol , respectivamente.¹²³

5.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do software SPSS 20.0. O teste Shapiro-Wilk foi utilizado para testar a distribuição normal dos dados. Para a análise dos dados paramétricos foi utilizado o teste t student e para a análise dos dados não paramétricos foi utilizado o teste Wilcoxon. Os dados foram expressos em média e desvio padrão, os dados categóricos foram expressos em percentual e a correlação entre as variáveis foram analisados através do teste de Pearson ou Spearman, considerando os níveis de significância 5% ($p < 0,05$). O teste qui quadrado foi utilizado para avaliar as frequências. O efeito da suplementação (Δ) em cada variável foi definida como o sujeito da diferença entre a variável ao final da suplementação e o valor da variável ao início da suplementação, já para analisar o efeito da suplementação (ANOVA) em cada variável foi utilizado o sujeito da diferença entre a variável ao final da suplementação e o valor da variável ao final do grupo controle.

6.0 RESULTADOS

Foram selecionados 69 pacientes encaminhados à cintilografia miocárdica no Setor de Medicina Nuclear do Hospital Universitário Antônio Pedro - UFF, localizado em Niterói – RJ. Os pacientes foram então randomizados para dois grupos: Grupo Suplementação (n=39) e Grupo Controle (n=30), no entanto, foram excluídos do grupo suplementação por desistência 3 pacientes e 11 pacientes que não apresentavam DAC e do grupo controle foram excluídos 6 por desistência, 7 não apresentavam DAC e 1 por amostra biológica insuficiente, dessa forma, concluíram o estudo somente 25 pacientes no grupo suplementação e 14 pacientes no grupo controle, totalizando 39 pacientes. Dentre os pacientes avaliados neste estudo a maioria relatou não praticar nenhuma atividade física por orientação médica. De acordo com a história clínica dos pacientes avaliados, 79,4% dos pacientes foram designados para a realização do exame de cintilografia miocárdica devido a dor torácica e 15,3% foram designados para a realização do exame devido a outros motivos como cansaço, risco cirúrgico e pós síndromes coronarianas agudas (Pós SCA). Além disso, dos 39 pacientes avaliados neste estudo, 46,1% apresentaram histórico de infarto agudo do miocárdio (IAM), 41% apresentaram angioplastia transluminal percutânea (PTCA), 10,2% apresentaram revascularização miocárdica e 7,6% apresentaram comunicação de acidente de trabalho (CAT) e 23% não relataram nenhum histórico de doenças prévias. Dentre as comorbidades, 7,6% relataram AVC, 2,5% enfisema pulmonar, 2,5 % de malformação arteriovenosa (MAV) e 87% não relataram nenhuma comorbidade. Nenhum paciente de ambos os grupos apresentou hipercolesterolemia isolada (LDL >160mg/dL) e hiperlipidemia mista. A Tabela 1 descreve os fatores de risco e as características gerais da população estudada.

Tabela 1. Características Gerais da População Avaliada

Variáveis	Grupo Suplementação n= 25	Grupo Controle n= 14	p Valor
Idade (anos)	62,6 ± 6,6	65,1 ± 7,1	0,72
Sexo	H= 13/ M= 12	H= 6/ M= 8	0,99
Tabagismo (%)	41	42	0,83
Etilismo (%)	28	7	0,12
Pressão arterial sistólica (mmHg)	144,5 ± 16,7	137,5 ± 12,5	0,81
Pressão arterial diastólica (mmHg)	75,0 ± 5,7	85,0 ± 5,7	0,92
Hipertensão Arterial (%)	96	92	0,66
Diabetes Mellitus (%)	36	42	0,55
Dislipidemia (%)	76	78	0,85
Hipertrigliceridemia isolada (%)	40	21	0,48
HDL-c baixo (%)	60	42	0,23

A comparação entre os grupos foi feita através do teste T independente e qui quadrado. Considerando-se alteração significativa ($p < 0,05$).

Quanto ao uso de medicamentos, todos os participantes de ambos os grupos faziam uso de algum medicamento com efeito antioxidante. Os medicamentos utilizados no grupo suplementação e controle estão apresentados a seguir na Tabela 2.

Tabela 2. Medicamentos Utilizados Pela População Avaliada

Medicamentos	Grupo Suplementação (n=25)	Grupo Controle (n=14)	p Valor
Bloqueadores B adrenérgicos	60%	42,8%	0,39
Inibidor de angiotensina	20%	21,4%	0,91
Inibidor de angiotensina II tipo 1	56%	50%	1,00
Estatinas	72%	78,5%	1,00
Bloqueadores de canal de cálcio	28%	42%	1,00
Anti-inflamatório não esteroide	40%	35,7%	1,00
Diurético tiazídico	16%	35%	1,00
Vasodilatadores	40%	42,8%	1,00
Antiplaquetário	12%	35,7%	1,00
Diuréticos	20%	14,2%	1,00
Biguanidas	28%	28,5%	1,00
Sulfonilureias	8%	7,1%	1,00
Inibidor de DPP-4	4%	7,1%	1,00
Hipoglicemiante injetável	12%	14,2%	1,00

Inibidor de DPP-4: Inibidor de Dipeptidil Peptidase 4. A comparação entre os grupos foi feita através do teste qui quadrado. Considerando-se alteração significativa ($p < 0,05$).

✓ **Análise dos Polifenóis**

Em relação a análise de polifenóis, os resultados mostraram que em uma castanha-do-Brasil contém em média $177,47 \pm 35,0$ mg equivalentes a ácido gálico (GAE.g^{-1}) em 100g de castanha-do-Brasil.

✓ **Estado Nutricional**

Com relação ao estado nutricional dos pacientes, 78,5% dos indivíduos do grupo controle e 68% dos pacientes suplementados estavam com IMC acima dos valores de normalidade. Entre os 39 pacientes avaliados, apenas 32% ($n=8$) dos indivíduos suplementados e 21,4% ($n=3$) do grupo controle encontravam-se eutróficos.

Quanto ao risco de complicações metabólicas, avaliados pela CC, 92% ($n=23$) dos pacientes do grupo suplementação e 100% do grupo controle apresentaram risco aumentado.

De acordo com a classificação de risco de doenças cardiovasculares, analisada pela CP, 78,5% (n=11) dos indivíduos do grupo controle e 80% (n=20) dos indivíduos suplementados apresentaram risco elevado. Vale ressaltar que todos os parâmetros avaliados não apresentaram diferenças significativas após a suplementação, com exceção para o IMC no grupo suplementação (Tabela 3).

Tabela 3. Características Antropométricas dos pacientes com DAC.

Parâmetros	Grupo Suplementação (n=25)				Grupo Controle (n=14)				P Valor ANOVA
	Pré	Pós	<i>p</i>	Δ Valores	Pré	Pós	<i>p</i>	Δ Valores	
IMC (kg/m ²)	29,7 ± 4,7*	29,9 ± 4,1*	0,01	0,9 (-1,2; 2,7)	33,6 ± 2,0	33,7 ± 2,4	0,27	0,5 (0,1; 1,0)	0,07
CC (cm)									
Homens	105,8 ± 8,6	104,3 ± 6,4	0,58	-1,6 (-3,7; 2,4)	102,1 ± 8,2	105,7 ± 7,4	0,11	1,7 (-0,2; 5,9)	0,78
Mulheres	106,5 ± 6,8	107,1 ± 5,9	0,32	0,6 (-0,1; 21,2)	104,6 ± 7,6	104,7 ± 4,8	0,90	-1,2 (-2,4; 3,0)	0,93
CP (cm)									
Homens	41,2 ± 3,8	41,5 ± 3,8	0,36	0,4 (-0,1; 0,7)	40,5 ± 2,6	40,6 ± 2,8	0,56	0,4 (-0,4; 0,8)	0,32
Mulheres	38,1 ± 2,4	38,3 ± 2,4	0,25	0,2 (-0,5; 9,0)	36,6 ± 1,5	36,1 ± 1,7	0,34	0,0 (-0,9; 0,2)	0,68

IMC: Índice de massa corporal; CC: Circunferência da cintura; CP: Circunferência do pescoço. Os dados foram expressos como média ± DP. A comparação de antes e após os três meses de suplementação em cada grupo foi feita através do teste T independente para os dados paramétricos e teste de wilcoxon para os dados não paramétricos. Δ valor para a análise de variância entre o pré e o pós três meses. P valor ANOVA para análise de variância entre os grupos. Valores em negrito indicam uma alteração significativa ($p < 0,05$).

✓ **Análise da Dieta**

Os resultados da análise de ingestão alimentar estão apresentados na Tabela 4. Observou-se uma diminuição significativa nos valores de fibra total, bem como um aumento significativo no selênio após a suplementação com castanha-do-Brasil. A média de valores de ingestão de fibra total mostrou uma ingestão adequada de fibras para cada 1.000 calorias, com exceção do grupo controle, que após os três meses pode ser observado uma ingestão abaixo do recomendado para cada 1.000 calorias. Ambos os grupos apresentaram alta ingestão de gorduras saturadas que segundo a I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) a ingestão de gorduras saturadas para pacientes com DCV deve ser <7%.¹²⁴ Com relação as demais variáveis avaliadas, não houve alterações significativas em ambos os grupos.

Tabela 4. Avaliação da Ingestão Alimentar dos Pacientes Estudados

Energia/Nutriente	Grupo Suplementação (n=25)				Grupo Controle (n=14)				P Valor ANOVA
	Pré	Pós	p	Δ Valores	Pré	Pós	p	Δ Valores	
Energia (kcal/dia)	1715,7 ± 753,8	1326,4 ± 440,7	0,19	-76,8 (-866,5;122,7)	1692,6 ± 626,4	1800,6 ± 587,2	0,39	168,9 (-550;462,9)	0,80
Energia (kcal/kg/dia)	23,5 ± 11,2	18,2 ± 7,2	0,27	-1,4 (-12,5; 4,2)	21,6 ± 5,5	23,2 ± 7,2	0,39	2,4 (-6,5; 5,3)	0,69
Proteína g/kg	1,23 ± 0,8	0,84 ± 0,3	0,09	-0,1(-0,5; -0,1)	0,96 ± 0,2	1,02 ± 0,4	0,52	-0,05 (-0,1; 0,1)	0,40
Carboidratos (%)	52,1 ± 10,8	53,1 ± 8,8	0,42	-0,2 (-5,3; 7,7)	53,2 ± 7,6	52,8 ± 5,9	0,82	-0,1 (-3,2; 5,3)	0,51
Lipídios (%)	27,5 ± 9,5	27,9 ± 6,7	0,12	-0,3 (-8,0; 5,9)	28,6 ± 6,2	30,0 ± 3,8	0,33	1,1 (-5,2; 5,6)	0,10
Gordura Saturada (%)	10,0 ± 4,8	9,5 ± 2,9	0,31	0,4 (-5,4; 2,6)	9,8 ± 3,7	10,2 ± 3,6	0,58	1,8 (-0,2; 3,0)	0,56
Gordura Poliinsaturada (%)	4,0 ± 1,6	4,5 ± 1,9	0,13	-0,3 (-1,2; 1,1)	4,4 ± 2,4	4,3 ± 1,7	0,92	0,2 (-1,6; 2,0)	0,37
Gordura Monoinsaturada (%)	8,2 ± 4,2	8,5 ± 3,8	0,05	0,2 (-1,2; 3,3)	8,4 ± 3,9	7,2 ± 3,6	0,34	-3,4 (-6,5; -1,8)	0,66
Fibra Total (g)	26,4 ± 16,2*	18,2 ± 6,7*	0,00	-2,8 (-10,7; 2,6)	24,3 ± 15,6	22,6 ± 12,7	0,73	-4,0 (-12,9; 2,2)	0,00
Selênio (µg)	62,7 ± 50,4*	370,4 ± 19,9*	0,00	89,2 (63,8; 110,5)	57,7 ± 43,0	41,4 ± 23,8	0,24	-39,0 (-63,7; -7,8)	0,00
Colina (mg)	318,8 ± 188,1	373,5 ± 331,8	0,90	37,8 (-106,4; 172,1)	325,3 ± 177,7	409,5 ± 275,5	0,22	-1,1 (-29,3; 400,0)	0,17
Betaína (mg)	169,9 ± 70,6	136,8 ± 56,5	0,12	-40,8 (-95,8; 26,5)	117,8 ± 38,5	137,7 ± 56,0	0,17	18,3 (-1,7; 53,8)	0,93
Carnitina (mg)	399,3 ± 234,7	393,4 ± 298,6	0,90	-14,1 (-117,9; 106,8)	364,7 ± 259,3	349,8 ± 292,5	0,68	-24,8(-497,0; 51,0)	0,85

Os dados foram expressos como média ± DP. A comparação de antes e após os três meses de suplementação em cada grupo foi feita através do teste T independente para os dados paramétricos e teste de wilcoxon para os dados não paramétricos. Δ valor para a análise de variância entre o pré e o pós três meses. P valor ANOVA para análise de variância entre os grupos. Valores em negrito indicam uma alteração significativa ($p < 0,05$).

✓ **Parâmetros Bioquímicos**

Quanto à avaliação bioquímica, observou-se uma diminuição significativa no Índice de Castelli I avaliado pela fórmula de CT/HDL, no grupo suplementação, entretanto, não houve alterações significativas observadas nos demais parâmetros bioquímicos avaliados. Vale ressaltar que 12% dos pacientes do grupo suplementação e 14% do grupo controle apresentaram CT acima da normalidade, 48% do grupo suplementação e 21% do grupo controle apresentaram TG elevados e 60% do grupo suplementação e 42% do controle tinham HDL-c abaixo dos valores de referência. Em ambos os grupos todos os pacientes tinham níveis de LDL-c dentro da normalidade (Tabela 5).

Tabela 5. Avaliação Bioquímica dos Pacientes Estudados

Parâmetros	Grupo Suplementação (n=25)				Grupo Controle (n=14)				P Valor ANOVA
	Pré	Pós	<i>p</i>	Δ Valores	Pré	Pós	<i>p</i>	Δ Valores	
Glicose	112,1 ± 30,4	150,8 ± 52,9	0,90	35,0 (16,2; 62,7)	94,5 ± 25,3	107,6 ± 56,3	0,89	-0,5 (-6,5; 25,0)	0,87
Colesterol Total (mg/dL)	174,0 ± 25,6	154,4 ± 30,8	0,09	-8,0 (-72,7; 8,5)	150,5 ± 42,0	142,0 ± 60,0	0,21	-1,5 (-35,9; 9,7)	0,07
HDL-c (mg/dL)	47,2 ± 10,5	45,6 ± 12,5	0,37	1,0 (-1,5; 2,7)	47,2 ± 9,0	47,3 ± 13,5	0,94	-1,5 (-4,0; 0,0)	0,52
LDL-c (mg/dL)	100,5 ± 19,3	85,0 ± 24,0	0,25	-10,1 (-56,6; 3,2)	82,7 ± 38,1	78,5 ± 44,8	0,41	-3,9 (-23,2; 15,6)	0,20
TG (mg/dL)	131,4 ± 64,0	118,5 ± 45,6	0,17	-4,5 (-84,0; 17,2)	117,8 ± 50,2	115,8 ± 49,3	0,97	-11,5 (-32,5; 43,6)	0,20
Índice de Castelli I (mg/dL)	4,3 ± 2,3*	3,6 ± 0,73*	0,03	-0,1 (-1,6; -,2)	3,1 ± 0,7	3,2 ± 0,9	0,84	0,1 (0,0; 0,3)	0,14
Índice de Castelli II (mg/dL)	2,0 ± 0,6	1,8 ± 0,5	0,06	-0,2 (-1,3; -0,0)	1,7 ± 0,6	1,6 ± 0,8	0,72	0,0 (-0,3; 0,2)	0,15
AST (mg/dL)	15,9 ± 6,4	17,1 ± 12,4	0,97	0,0 (-6,0; 14,2)	16,4 ± 6,0	18,7 ± 10,7	0,70	3,5 (-3,5; 12,7)	0,65
ALT (mg/dL)	9,2 ± 3,1	7,2 ± 4,3	0,62	-4,0 (-7,2; -0,2)	7,8 ± 4,3	8,0 ± 7,2	0,38	1,5 (-4,7; 14,7)	0,84

HDL-c: Lipoproteína de alta densidade; LDL-c: Lipoproteína de baixa densidade; TG: Triglicerídeos; AST: Aspartato aminotransferase; ALT: Alanina aminotransferase. As análises foram feitas intra-grupo. A comparação de antes e após os três meses de suplementação em cada grupo foi feita através do teste T independente para os dados paramétricos e teste de wilcoxon para os dados não paramétricos. Os dados foram expressos como média ± DP. Δ valor para a análise de variância entre o pré e o pós três meses. P valor ANOVA para análise de variância entre os grupos. Valores em negrito indicam uma alteração significativa ($p < 0,05$).

✓ **Análise dos níveis plasmáticos de TMAO, colina, betaína e GPx**

Não foram encontradas alterações significativas nos níveis de TMAO, colina e betaína, entretanto, nota-se valores de TMAO dentro da normalidade (2,9 μmol) segundo o EUTox-db¹²³ e além disso, nota-se um aumento nos níveis da atividade da GPx em 48,5% após a suplementação com a castanha-do-Brasil, porém não foi significativamente (Tabela 6).

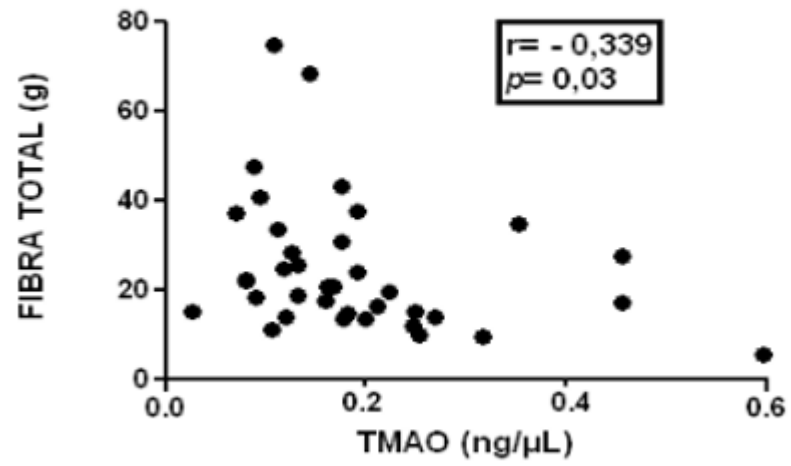
Tabela 6. Análise dos níveis de TMAO, colina, betaína e GPx

Parâmetros	Grupo Suplementação (n=25)				Grupo Controle (n=14)				P Valor ANOVA
	Pré	Pós	<i>p</i>	Δ Valores	Pré	Pós	<i>p</i>	Δ Valores	
GPx (mg/dL)	24,0 ± 12,8	35,0 ± 17,4	0,50	15,2 (-1,2; 21,0)	36,7 ± 16,4	30,8 ± 13,5	0,36	-3,8 (-15,2; 1,2)	0,95
TMAO (ng/μL)	0,15 ± 0,1	0,16 ± 0,08	0,79	0,0 (-0,1; 0,0)	0,16 ± 0,1	0,17 ± 0,08	0,14	-0,0 (-0,0; 0,0)	0,22
Colina (ng/μL)	6,5 ± 1,8	6,5 ± 1,4	0,82	-0,0 (-0,4; 0,7)	7,1 ± 1,1	7,2 ± 1,0	0,56	-0,0 (-0,8; 0,7)	0,57
Betaína (ng/μL)	4,9 ± 2,0	5,8 ± 1,8	0,69	0,3 (-0,0; 2,2)	6,9 ± 2,3	7,1 ± 1,7	0,69	0,4 (-1,0; 1,9)	0,92

GPx: Glutathione peroxidase; TMAO: N-óxido de trimetilamina. As análises foram feitas intra-grupo. Os dados foram expressos como média ± DP. A comparação de antes e após os três meses de suplementação em cada grupo foi feita através do teste T independente para os dados paramétricos e teste de wilcoxon para os dados não paramétricos. Δ valor para a análise de variância entre o pré e o pós três meses. P valor ANOVA para análise de variância entre os grupos. Valores em negrito indicam uma alteração significativa ($p < 0,05$).

✓ **Correlações**

Foi encontrado uma correlação negativa entre a ingestão de fibra total e os níveis de TMAO ($r = -0,339$ e $p = 0,03$) no baseline do estudo.



7.0 DISCUSSÃO

Apesar do grande número de estudos envolvendo nutrientes e compostos bioativos dos alimentos na redução dos níveis de TMAO, este é o primeiro estudo a avaliar os efeitos da suplementação com castanha-do-Brasil nos níveis de TMAO em indivíduos com DAC. Os resultados encontrados mostram que a ingestão de uma castanha-do-Brasil por dia durante três meses reduziu o risco aterogênico através do índice de Castelli I, porém, não causou alterações na atividade da enzima GPx e nos níveis plasmáticos de TMAO, colina e betaína.

Características Gerais

Os fatores de risco para o desenvolvimento da DAC já são bem esclarecidos na literatura e incluem principalmente a idade avançada, hiperlipidemia, diabetes, hipertensão e tabagismo. Dados recentes mostram que em torno de 50% da população brasileira idosa apresenta hipertensão arterial e idosos entre 64 a 75 anos apresentam 19% de prevalência de diabetes.¹²⁵ Os resultados encontrados nesse estudo corroboram com esses dados, onde foi encontrado uma alta prevalência de diabetes e hipertensão arterial.

Neste estudo, foi observado uma grande variedade de medicamentos utilizados pelos pacientes principalmente bloqueadores B adérgicos, estatinas, inibidor de angiotensina II tipo 1, dentre outros. Segundo Lunelli et al., (2009), a terapia medicamentosa estabelecida aos pacientes com DAC inclui principalmente anti-agregantes plaquetários, inibidores da enzima conversora de angiotensina e beta-bloqueadores a fim de reduzir a ocorrência de eventos coronarianos. A prevenção do infarto, redução dos sintomas e ocorrências de isquemias miocárdicas, além da melhora da qualidade vida são um dos principais objetivos no tratamento medicamentoso da DAC.¹²⁶ Segundo a SBC (2014), os anti-agregantes plaquetários, hipolipemiantes, especialmente as estatinas agem reduzindo a incidência de infarto, já os nitratos e antagonistas de canais de cálcio agem reduzindo as incidências de isquemias miocárdicas.¹²⁷

Análise dos Polifenóis

A castanha-do-Brasil apresenta uma grande variedade de compostos bioativos, incluindo diversas classes de polifenóis. Com relação a determinação dos compostos fenólicos presentes na castanha-do-Brasil utilizada nesse estudo vale ressaltar que foi encontrado uma quantidade relevante de compostos fenólicos na mesma. Esses resultados são bem próximos ao encontrado por Gomes et al., (2016), que encontrou valores equivalentes a 181 mg de

GAE/100g em preparações com castanha-do-Brasil.¹²⁸ Da mesma forma, Yang et al., (2009) encontraram valores equivalentes a 169 mg de GAE/100g na castanha-do-Brasil.¹²⁹ Entretanto, valores inferiores aos apresentados anteriormente também são encontrados na literatura. Abe et al., (2010) encontrou valores equivalentes a 106 mg de GAE/100g,¹³⁰ de modo semelhante Kornsteiner et al., (2006) encontrou valores equivalentes a 112 mg de GAE/100g em extratos de castanha-do-Brasil.¹³¹

Considerando a capacidade dos polifenóis em afetar a microbiota intestinal, Yuan et al., (2019) demonstraram que extratos contendo 79,74 mg de GAE/100g foi capaz de modular a composição da microbiota intestinal,¹³² da mesma forma Cires et al., (2019) mostraram que uma suplementação com casca de abacate contendo em média $100 \pm 0,27$ mg de polifenóis totais também causou uma alteração na microbiota intestinal aumentando os filos *Actinobacteria*, *Coriobacteriaceae* e *Ruminococcaceae*, contribuindo para o equilíbrio das bactérias intestinais.¹³³ Entretanto, em homens adultos a suplementação com arônia berry, uma fruta muito consumida no norte da América, contendo em média 116 mg de GAE/100g não alterou significativamente a diversidade da microbiota intestinal, mas promoveu o aumento de Bacteroidetes.¹³⁴ Assim, a quantidade de polifenóis encontradas neste estudo na castanha-do-Brasil pode ser uma quantidade considerável para causar algum impacto na microbiota intestinal, contudo, o fato de não ter sido possível coletar as fezes dos participantes deste estudo, pode limitar uma conclusão mais fidedigna a este respeito.

Estado Nutricional

Ao verificar os dados referentes a avaliação antropométrica, foi constatado uma prevalência de sobrepeso e obesidade em ambos os grupos, além disso, os valores de CC e CP encontravam-se acima da normalidade. Um estudo em pacientes com infarto agudo do miocárdio relatou uma prevalência de 33% de obesidade e 35% de sobrepeso, além do mais, 50% dos pacientes avaliados tinham CC alterada.¹³⁵ Do mesmo modo, Yang et al., (2019) avaliaram a associação entre CP e fatores de risco para DCV em pacientes com diabetes tipo 2 e mostraram uma prevalência de 2,3 vezes a mais de eventos cardiovasculares nos indivíduos que apresentaram CP elevada.¹³⁶ Assim, esses dados mostram que o estado nutricional dos indivíduos avaliados neste estudo estão de acordo com os dados na literatura.

Além disso, a avaliação antropométrica mostrou um aumento significativo do IMC após a suplementação com a castanha-do-Brasil, entretanto, apesar deste fato, Vadivel et al., (2012) em uma revisão de literatura, demonstraram que a ingestão de oleaginosas não está relacionada ao ganho de peso corporal e que a ingestão frequente podem trazer diversos benefícios a

saúde.¹³⁷ Semelhantemente, Souza et al., (2017) demonstraram em uma revisão sistemática que a ingestão de nozes e outras sementes do mesmo grupo não estão relacionadas ao ganho de peso.¹³⁸ Tan SY et al., (2014) mostraram que a ingestão frequente de oleaginosas também não estão associadas ao ganho de peso e esse fato deve-se principalmente a capacidade de saciedade promovida pelas oleaginosas.¹³⁹ Por outro lado, uma revisão de literatura mostrou que em dois estudos quando as oleaginosas foram acrescentadas em uma dieta sem o controle da ingestão de energia total, o peso corporal aumentou, entretanto, os autores mostraram ainda que o mesmo não aconteceu em três estudos que fizeram uma dieta controlada em energia,¹⁴⁰ contudo, neste estudo não houve uma dieta específica para o controle de energia total dos participantes.

Ingestão Alimentar

Quanto à avaliação dietética desses pacientes evidenciou-se uma ingestão calórica abaixo do recomendado, embora tenha sido encontrado um excesso de peso e obesidade nos mesmos, indicando um possível relato subestimado no inquérito alimentar. É importante destacar que o R-24h é um dos métodos mais utilizados para a avaliação da ingestão alimentar e apesar de apresentar várias vantagens como de ser um instrumento rápido, de fácil aplicação e de um custo relativamente barato, este método apresenta diversas limitações como relato subestimado, necessidade de memória do entrevistado, baixa precisão, além de depender da contribuição do entrevistado que é influenciado por vários fatores como idade, sexo e nível de escolaridade.¹⁴¹⁻¹⁴²

Mesmo que estes dados possam ser subestimados, ao observar a distribuição lipídica nota-se uma baixa ingestão de gorduras poli-insaturadas e monoinsaturadas e em contrapartida uma ingestão acima dos valores recomendados de gorduras saturadas. Atualmente já é bem elucidado na literatura que os padrões dietéticos podem influenciar na formação da placa aterosclerótica, onde a ingestão elevada de gordura saturada está diretamente ligada ao aumento da LDL-c e conseqüentemente aumentando o risco de desenvolvimento de DCV. Em contraposição, a ingestão frequente de gorduras poli-insaturadas e monoinsaturadas ajudam no controle da hiperlipidemia e podem reduzir eventos clínicos coronarianos.¹⁴³

Apesar da Castanha-do-Brasil ser fonte de fibras, gorduras poli-insaturadas e monoinsaturadas e baixa em gorduras saturadas⁹⁹⁻¹⁰² neste estudo foi observado uma redução na ingestão de fibras totais após a suplementação e uma alta ingestão de gorduras saturadas. Esse resultado porém, pode não estar associado a suplementação com a castanha-do-Brasil e sim devido ao atual padrão alimentar da população brasileira com alta ingestão de alimentos processados e baixa ingestão de frutas e vegetais.¹⁴⁴ Além disso, um estudo conduzido por Neil

et al., (2010) mostrou que a ingestão de oleaginosas maior que 7g/dia pode influenciar na ingestão de gorduras totais e fibras,¹⁴⁵ entretanto, neste estudo foi usada uma dose de 5g/dia.

Ademais, ainda com relação a análise de ingestão alimentar, os hábitos alimentares são um dos principais fatores que podem influenciar o perfil microbiano intestinal e dessa forma poderia então influenciar também geração de toxinas. No presente estudo, não foi encontrada associação entre a ingestão de colina, carnitina e betaína com os níveis plasmáticos dos mesmos ou com os níveis de TMAO, demonstrando dessa forma que a ingestão desses precursores não foi relevante para a geração de TMAO. O mesmo foi encontrado por Malinowska et al., (2016) que avaliou a ingestão dos participantes do estudo e demonstrou que a ingestão de colina e betaína não afetou os níveis de TMA e nem de TMAO, bem como também não afetou os níveis de colina plasmático, além disso, a ingestão média de colina e betaína foi de 392mg e 115mg respectivamente, valores próximos também ao que foi encontrado neste presente estudo.¹⁴⁶

Neste estudo, pode ser encontrado também uma correlação negativa entre a ingestão de fibra total e os níveis plasmáticos de TMAO. Resultado similar também foi encontrado por leal-Witt et al., (2018), onde observou que os níveis plasmáticos de TMAO eram inversamente associados a ingestão de fibra total em crianças.¹⁴⁷ É importante ressaltar que as fibras podem ter um efeito benéfico na microbiota intestinal, contribuindo principalmente para o equilíbrio dos filos bacterianos, desta forma, a ingestão de fibras está associado a um menor risco de disbiose intestinal¹⁴⁸ o que pode explicar também a sua relação inversa com os níveis de TMAO.

Análise Bioquímica

Quanto aos principais resultados bioquímicos analisados neste estudo diante a intervenção de três meses com castanha-do-Brasil, destaca-se uma redução significativa no índice de Castelli I. Resultado equivalente foi demonstrado por Cominetti et al., (2012) que mostraram que a ingestão de uma castanha-do-Brasil por dia durante oito semanas em mulheres obesas foi efetiva em reduzir o risco aterogênico através do índice de Castelli I.¹⁴⁹ Além disso, Stockler-Pinto et al., (2014) também demonstraram que a suplementação com uma castanha-do-Brasil por dia foi capaz de reduzir o índice de Castelli I em pacientes em hemodiálise.¹⁵⁰

Embora neste presente estudo tenha sido encontrado uma redução significativa do índice de Castelli I, não foi encontrado alterações significativas nos demais parâmetros bioquímicos avaliados. Apesar de alguns estudos mostrarem uma diminuição nos parâmetros do perfil lipídico como CT, triglicerídeos e LDL-c após a suplementação com a castanha-do-Brasil¹⁴⁹⁻¹⁵¹ outros estudos, porém também mostram não haver alterações com a suplementação de oleaginosas, ressaltando que os efeitos da ingestão das mesmas no perfil lipídico não estão

completamente elucidados. Liu et al., (2019) mostraram em uma meta-análise com ensaios clínicos randomizados que uma dieta com nozes e pistache pode ser alternativa para a redução de parâmetros lipídicos quando comparados a outras oleaginosas como as castanhas do caju, amêndoas e avelãs.¹⁵² Nesse sentido, Cominetti et al., (2012) após suplementarem uma castanha-do-Brasil por dia durante oito semanas em 37 mulheres obesas também não encontraram alterações significativas no perfil lipídico como o LDL-c, CT e TG e também não encontraram alterações na glicemia.¹⁴⁹ Corroborando ainda mais com os achados deste estudo, outra meta-análise analisou os efeitos da suplementação de selênio no perfil lipídico e mostrou que a suplementação com selênio não é eficaz em melhorar o perfil lipídico como LDL, TG e HDL.¹⁵³ Entretanto, uma meta-análise mostrou que o fator determinante na redução do perfil lipídico está na dose da oleaginosa e não no tipo de oleaginosa, mostrando que resultados significativos foram observados com doses de 60g/dia,¹⁵¹ contudo, neste estudo como mencionado anteriormente foi utilizado uma dose de 5g, equivalente a uma castanha-do-Brasil por dia.

Além disso, não foi encontrado neste estudo alterações significativas na atividade da enzima GPx, entretanto, esses resultados não corroboram com outros estudos, onde, o aumento da atividade da enzima têm sido encontrado em diversos estudos envolvendo a suplementação com a castanha-do-Brasil.¹⁴⁹⁻¹⁵¹ Todavia, um estudo recente conduzido por Duarte et al., (2019) mostrou que a suplementação com castanha-do-Brasil por dois meses em mulheres obesas não aumentou a expressão gênica da GPx, contudo, aumentou as concentrações plasmáticas de selenoproteínas, sugerindo que o selênio tenha sido usado para a síntese de outras selenoproteínas como a selenoproteína P e não para a GPx.¹⁵⁴ De modo equivalente Maranhão et al., (2011) também não encontraram valores significativos nos níveis plasmáticos da atividade da enzima GPx após a suplementação com castanha-do-Brasil em adolescentes obesos.¹⁵⁵ Ainda assim, considerando que a GPx é uma importante enzima antioxidante, algumas intervenções tem mostrado resultados inconsistentes quanto à eficácia das oleaginosas em aumentarem a capacidade antioxidante. Mackay et al., (2010) observaram que a ingestão de oleaginosas não alterou significativamente a capacidade antioxidante no plasma, paralelamente Haddad et al., (2014) demonstraram que 90g de oleaginosas após 24h também não alterou a capacidade antioxidante no plasma em relação ao início do estudo.¹⁵⁶⁻¹⁵⁷ Dessa maneira, esses dados propõe que os benefícios antioxidantes conduzidos pela ingestão de oleaginosas ainda é controverso.

Quanto aos dados referentes a função hepática também não foram encontrados resultados significativos. Esses dados estão em conformidade com Colpo et al., (2014) que demonstraram não haver alterações significativas nas enzimas hepáticas após a suplementação com castanha-do-Brasil em indivíduos saudáveis, indicando que apesar de uma castanha-do-Brasil ultrapassar as recomendações diárias de selênio, a ingestão diária da mesma não é o suficiente para causar toxicidade ou dano hepático.¹⁵⁸

Por fim, ao analisar os dados referentes aos níveis de TMAO, colina e betaína plasmáticos pode-se observar também resultados não expressivos. Uma abordagem coerente para reduzir os níveis de TMAO e TMA seria limitar fontes alimentares de colina, carnitina e betaína, nesse contexto, a produção de TMAO é menor em indivíduos veganos quando comparados com indivíduos onívoros,⁴⁻⁹ entretanto, alguns estudos são controversos quanto a este fato.¹⁵⁹⁻¹⁶⁰ Apesar disto é importante destacar que a colina é um nutriente essencial para a saúde humana e desempenha diversas funções no organismo e a deficiência da mesma está relacionada à esteatose hepática e alterações cognitivas,¹⁶¹ bem como a carnitina e a betaína exercem também funções importantes como regulação do metabolismo lipídico e regulação no metabolismo da homocisteína, respectivamente.¹⁶²⁻¹⁶³

A castanha-do-Brasil como citada anteriormente, além de conter diversos nutrientes como fibras, ácidos graxos monoinsaturados, poli-insaturados e selênio, também contém uma ampla variedade polifenóis como flavonoides e compostos fenólicos.⁹⁹⁻¹⁰² Tenore et al., (2019) avaliou a suplementação com purê de maçã rica em flavonoides em 90 indivíduos e mostrou que houve uma redução significativa nos níveis de TMAO após 16 semanas de suplementação e tal fato pode ser atribuído devido ao aumento de bactérias benéficas como os *Lactobacillus*.¹⁶⁴ Da mesma forma, outro estudo mostrou que a suplementação de uva com pectina (rico em resveratrol e fibras) durante oito semanas em 90 indivíduos obesos foi capaz de modular a microbiota intestinal e reduzir significativamente os níveis de TMAO.¹⁶⁵

Ainda que diversos estudos tenham mostrado efeitos expressivos dos polifenóis e nutrientes na redução dos níveis de TMAO e seus precursores,⁹²⁻⁹³⁻¹⁶⁴⁻¹⁶⁵ resultados similares aos apresentados neste estudo também foram encontrados na literatura. Angietta et al., (2018) ao avaliar os efeitos do consumo de bebidas ricas em polifenóis como chá verde e cacau nos níveis de TMAO, colina, betaína e carnitina em indivíduos obesos também não encontraram alterações significativas,¹⁶⁶ do mesmo modo, outro estudo avaliou uma intervenção com dieta paleolítica durante 4 semanas em 39 mulheres e também não encontraram alterações nos níveis de TMAO e seus precursores.¹⁶⁷ Além desses, Griffin et al., (2019) após uma intervenção de seis meses com dieta mediterrânea em 115 indivíduos também não observaram alterações

significativas nos níveis de TMAO, entretanto, os autores destacam que os indivíduos desse estudo apresentaram uma alta ingestão de peixes (Precursor de TMA) devido ao padrão da dieta mediterrânea.¹⁶⁸ Baugh et al., (2018) também não encontraram resultados expressivos na redução dos níveis de TMAO, colina, carnitina, betaína e γ -butirobetaína após seis semanas de suplementação com inulina em pacientes diabéticos.¹⁶⁹ Os autores desses estudos ressaltam alguns fatores que podem estar relacionados a não diminuição dos níveis de TMAO como o baixo tempo de intervenção de alguns estudos, além do baixo consumo de alguns tipos de fibras como o amido resistente o que pode então impactar a microbiota intestinal, além do alto consumo de alimentos fontes de TMA.¹⁶⁶⁻¹⁶⁹

Além disso, alguns autores destacam também a necessidade de além de suplementar compostos bioativos ou nutrientes, seja necessário também ter um controle da ingestão total da dieta para não influenciar nos níveis de TMAO, uma vez que, dietas ricas em gorduras podem interferir nos níveis de TMAO principalmente devido aos seus efeitos na microbiota intestinal.¹⁷⁰⁻¹⁷¹ Contudo, neste estudo não foi possível fazer um controle dietético dos pacientes avaliados, além do que, foi encontrado uma alta ingestão de gordura saturada nos mesmos e tal fato pode ter interferido na não redução dos níveis de TMAO, visto que, o alto consumo de gordura saturada está relacionado a uma diminuição de bactérias benéficas.⁸⁵⁻⁸⁷

Entretanto, apesar do alto consumo de gorduras saturadas, nota-se valores de TMAO dentro da normalidade que é de até 2,9 μmol segundo a EUTox-db nestes indivíduos antes e após a suplementação e a este respeito é importante ressaltar que pelo fato do TMAO não está alto nesses pacientes não seja portanto um alvo alterável.¹²³⁻¹⁶⁶ Além disso, não se pode excluir a possibilidade de que seja necessária uma dose maior de 5g de castanha-do-Brasil por dia ou um tempo maior de suplementação para causar um impacto na microbiota intestinal e reduzir os níveis de TMAO e seus precursores. Assim, a ligação entre os alimentos, TMAO e a microbiota intestinal ainda não está bem esclarecida e são necessárias mais pesquisas a longo prazo para compreender melhor estes mecanismos.

Dentre as principais limitações deste trabalho, é importante destacar que não foi possível coletar as fezes dos participantes para analisar os efeitos da suplementação com a castanha-do-Brasil na composição da microbiota intestinal e sua possível relação com os níveis de TMAO, colina e betaína, bem como, não foi possível realizar uma análise da expressão gênica de FMO no fígado devido ao desenho do estudo. E também não houve uma dieta específica para os participantes como forma de padronização e com isso o R24h mostrou-se uma técnica pouco eficaz para análise da dieta, uma vez que, grande parte dos participantes apresentaram resultados contraditórios em relação a baixa ingestão de energia e diagnóstico de sobrepeso.

Além disso, não foi possível fazer a análise de selênio plasmático como forma de verificar a adesão a suplementação.

8.0 CONCLUSÃO

- A suplementação com uma castanha-do-Brasil por dia durante três meses foi eficaz na redução do índice de Castelli I.
- A suplementação com uma castanha-do-Brasil por dia durante três meses não alterou os níveis plasmáticos de TMAO, colina, betaína e atividade da GPx.
- A suplementação com uma castanha-do-Brasil não alterou o estado nutricional geral.
- Na avaliação de ingestão alimentar foi observado uma ingestão energética abaixo dos valores recomendados bem como uma ingestão de gorduras saturadas acima do recomendado, além disso, a ingestão de colina, carnitina e betaína não influenciou nos níveis de TMAO e seus precursores neste estudo.

9.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. HANSON MA, FAREED MT, ARGENIO SL, AGUNWAMBA AO, HANSON TR. Coronary Artery Disease. *Prim Care*. 2013;40(1):1-16.
2. TORRES N, GUEVARA-CRUZ M, VELÁZQUEZ-VILLEGAS LA, TOVAR AR. Nutrition and atherosclerosis. *Arch Med Res*.2015;46(5):408-426.
3. GOMES F, TELO DF, SOUZA HP NICOLAU, JC HALPERN A, SERRANO JR, et al. Obesidade e doença arterial coronariana: papel da inflamação vascular. *Arq Bras Cardiol*.2010;94(2):273-279.
4. ZHU W, WANG Z, TANG WW, HAZEN SL. Gut microbe-generated trimethylamine N-oxide from dietary choline is prothrombotic in subjects. *Circulation*. 2017;135(17):1671–3.
5. PLUZNICK JL, PROTZKO RJ, GEVORGYAN H, PETERLINZ, SIPOS A, HAN J, et al. Olfactory receptor responding to gut microbiota derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. *Proc NATL Acad Sci*. 2013;110(11): 4410-4415.
6. TREMAROLI V, BÄCKHED F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*. 2012; 489:242–9.
7. GAO X, LIU X, XU J XUE, C XUE, Y WANG Y. Dietary trimethylamine N-oxide exacerbates impaired glucose tolerance in mice fed a high fat diet. *J Biosci Bioeng*. 2014;118(4):476-481.
8. WANG Z, KLIPFELL E, BENNETT BJ, KOETH R, LEVISON BS, DUGAR B, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*.2011;472(7341):57.
9. KOETH RA, WANG Z, LEVISON BS, BUFFA JA, ORG E, SHEEHY BT, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nature*.2013;19(5):576.
10. ZHU W, , ORG E, BUFFA JA, GUPTA N, WANG Z, et al. Gut microbial metabolite TMAO enhances platelet hyperreactivity and thrombosis risk. *Cell*. 2016;165(1):111-124.
11. BIBBINS-DOMINGO K, CHERTOW GM, COXSON PG, MORAN A, LIGHTWOOD JM, PLETCHER MJ, et al. Projected effect of dietary salt reductions on future cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 2010;362(7):590-599.
12. MICHA R, WALLACE SK, MOZAFFARIAN D. Red and processed meat consumption and risk of incidente coronary heart disease, stroke, and diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Circulation*. 2010;121(21):2271–2283.

13. BERNSTEIN AM, SUN Q, HU FB, STAMPFER MJ, MANSON JE, WILLETT WC. Major dietary protein sources and risk of coronary heart disease in women. *Circulation*. 2010;122(9):876–883.
14. KOETH RA., WANGZ, LEVISON BS, BUFFA JA, ORG E, SHEEHY BT et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat med*. 2013;19(5), 576.
15. RAJILIĆ-STOJANOVIĆ M, HEILIG HG, TIMS S, ZOETENDAL EG, DE VOS WM. Long-term monitoring of the human intestinal microbiota composition. *Lancet*. 2010;376(9750):1393–400.
16. HENNING SM, YANG J, SHAO P, LEE RP, HUANG J, LY A, et al. Health benefit of vegetable/fruit juice-based diet: Role of microbiome. *Sci Rep* . 2017;7(1): 2167.
17. ANHÊ FF, VARIN TV, LE BARZ M, DESJARDINS Y, LEVY E, ROY D, et al . Gut microbiota dysbiosis in obesity-linked metabolic diseases and prebiotic potential of polyphenol-rich extracts. *Curr Obes Rep*. 2015; 4(4):389-400.
18. ESPLEY RV, BUTTS CA, LAING WA, MARTELL S, SMITH H, MCGHIE TK, et al. Dietary flavonoids from modified apple reduce inflammation markers and modulate gut microbiota in mice. *J Nutr*. 2013;144(2):146-154.
19. CHEN ML, YI L, ZHANG Y, ZHOU X, RAN L, YANG J, et al . Resveratrol attenuates trimethylamine-N-oxide (TMAO)-induced atherosclerosis by regulating TMAO synthesis and bile acid metabolism via remodeling of the gut microbiota. *MBio*. 2016;7(2):e02210-15.
20. ABE LT, LAJOLO FM, GENOVESE MI. Comparison of phenol content and antioxidant capacity of nuts. *Food Science and Technology*. 2010;30: 254-259.
21. PÉREZ-JIMÉNEZ J, NEVEU V, VOS F et al. Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *Eur J Clin Nutr* . 2010;64:S3- S112.
22. LAMUEL-RAVENTOS RM, ONGE MPS. Prebiotic nut compounds and human microbiota. *Crit Rev Food Sci Nutr* . 2017;57(14):3154-3163.
23. COSTA T, JORGE N. Beneficial Bioactive Compounds Present in Nuts and Walnuts. UNOPAR. *Cienc Biol Saude*. 2011;13:195-203.
24. SUGIZAKI, Clara SA; NAVES, Maria Margareth V. Potential prebiotic properties of nuts and edible seeds and their relationship to obesity. *Nutrients*, 2018, 10.11: 1645.
25. GOMES, SUELLEN, ALEXANDRE G. TORRES. "Optimized extraction of polyphenolic antioxidant compounds from Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) cake and evaluation of the polyphenol profile by HPLC." *J Sci Food Agric*.2016;96(8): 2805-2814.
26. GROSSO G, YANG J, MARVENTANO S, MICEK A, GALVANO F, KALES SN . Nut consumption on all-cause, cardiovascular, and cancer mortality risk: a systematic review and meta-analysis of epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr*. 2015;101(4):783-793.

27. COLPO E, DALTON D A, VILANOVA C, REETZ LG, DUARTE MM, FARIAS IL, MEINERZ DF, et al. Brazilian nut consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters. *Nutrition*. 2014;30(4): 459-65
28. BAESMAN SM, BULLEN TD, DEWALD J, ZHANG D, CURRAN S, ISLAM FS, et al. Formation of tellurium nanocrystals during anaerobic growth of bacteria that use e oxyanions as respiratory electron acceptors. 2007;73(7):2135-2143.
29. STOLZ JF, BASU P, SANTINI JM, OREMLAND RS. Arsenic and selenium in microbial metabolism. *Annu Rev Microbiol*. 2006;60:107-130.
30. KASAIKINA MV, KRAVTSOVA MA, LEE BC, SERAVALLI J, PETERSON DA, WALTER J, et al. Dietary selenium affects host selenoproteome expression by influencing the gut microbiota. *FASEB J*. 2011;25(7):2492-2499.
31. Organização Pan-Americana de Saúde. Organização Mundial da Saúde divulga novas estatísticas mundiais de saúde. Brasil: OPAS; 2018 [acesso em 21 de fevereiro 2019].
32. ERDMANN J, KESSLER T, MUNOZ VENEGAS L, SCHUNKERT H. A decade of genome-wide association studies for coronary artery disease: the challenges ahead. *Cardiovasc Res*. 2018;114(9):1241-1257.
33. PINHO RA, ARAÚJO MC, MELO GL, BENETTI M. Doença arterial coronariana, exercício físico e estresse oxidativo. *Arq Bras Cardiol*. 2010;94(4):549-5.
34. HACKAM DG, ANAND, SS. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. *Jama*. 2003;290(7):932-940.
35. LIBBY P, RIDKER PM, MASERI A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105(9):1135-1143.
36. GOTTLIEB MG., BONARDI G, MORIGUCHI EH. Fisiopatologia e aspectos inflamatórios da aterosclerose. *Sci Med*. 2005;15(3):203-207.
37. MANSUR ADP, ARMAGANIJAN D, AMINO JG, SOUSA AC, SIMÃO AF, BRITO AXD. Diretrizes de doença coronariana crônica angina estável. *Arq Bras Cardiol*. 2004;83:2-43.
38. BADIMON L, VILAHUR G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med*. 2014;276(6):618-632.
39. CASAS R, CASTRO-BARQUERO S, ESTRUCH R, SACANELLA E. Nutrition and Cardiovascular Health. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12): 1-31.
40. STANCU CS, TOMA L, SIMA AV. Dual role of lipoproteins in endothelial cell dysfunction in atherosclerosis. *Cell Tissue Res*. 2012;349(2):433-446.

41. KRATZER A, GIRAL H, LANDMESSER U. High-density lipoproteins as modulators of endothelial cell functions: alterations in patients with coronary artery disease. *Cardiovasc Res.* 2014;103(3):350-361.
42. PANTH N, PAUDEL KR, PARAJULI K. Reactive oxygen species: a key hallmark of cardiovascular disease. *Adv Med.* 2016; 1-12.
43. JI S, J GAO, K Q, & ZHAO M. (2017). Epigenetic regulation in monocyte/macrophage: A key player during atherosclerosis. *Cardiovasc Ther.* 2017; 35(3): 12262.
44. KOLLURU GK, BIR SC, YUAN S, SHEN X, PARDUE S, WANG R, KEVIL CG. Cystathionine γ -lyase regulates arteriogenesis through NO-dependent monocyte recruitment. *Cardiovasc Res.* 2015;107(4):590-600.
45. LEPAGE P, LECLERC MC, JOOSSENS M, MONDOT S, BLOTTIÈRE HM, RAES J, et al. A metagenomic insight into our gut's microbiome. *Gut.* 2013;62(1):146-158.
46. ARUMUGAM M, RAES J, PELLETIER E, LE PASLIER D, YAMADA T, MENDE DR et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* 2011;473(7346):174.
47. VOREADES N, KOZIL A, WEIR TL. Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Front Microbiol.* 2014;5:494.
48. QUIGLEY EM. Gut bacteria in health and disease. *J Gastroenterol hepatol.* 2013;9(9):560-9.
49. PARKAR SG, KALSBECK A, CHEESEMAN JF. Potential Role for the Gut Microbiota in Modulating Host Circadian Rhythms and Metabolic Health. *Microorganisms.* 2019;7(2):41.
50. TOJO R, SUÁREZ A, CLEMENTE MG, DE LOS REYES-GAVILÁN CG, MARGOLLES A, GUEIMONDE M, et al. Intestinal microbiota in health and disease: role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World J Gastroenterol .* 2014;20(41):15163.
51. DIETERICH W, SCHINK M, ZOPF Y. Microbiota in the Gastrointestinal Tract. *Med Sci (Basel).* 2018;6(4): 116
52. SZYCHLINSKA MA, DI ROSA M, CASTORINA A, MOBASHERI A, MUSUMECI G . A correlation between intestinal microbiota dysbiosis and osteoarthritis. *Heliyon.* 2019;5(1): e01134.
53. TANG WW, HAZEN SL. The gut microbiome and its role in cardiovascular diseases. *Circulation.* 2017;135(11):1008-1010.
54. TANG WW, KITAI T, HAZEN SL. Gut microbiota in cardiovascular health and disease. *Circulation.* 2017;120(7):1183-1196.
55. KELLY CR, KAHN S, KASHYAP P, LAINE L, RUBIN D, ATREJA A et al. Update on fecal microbiota transplantation 2015: indications, methodologies, mechanisms, and outlook. *Gastroenterology.* 2015;149(1):223-237.

56. CHOW J, TANG H, MAZMANIAN SK. Pathobionts of the gastrointestinal microbiota and inflammatory disease. *Curr Opin Immunol.* 2011; 23(4):473–480
57. BERVOETS L, VAN HOORENBEECK K, KORTLEVEN I, VAN NOTEN C, HENS N, VAEL C, GOOSSENS H, DESAGER KN, VANKERCKHOVEN V. Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: a cross-sectional study. *Gut pathogens.* 2013 Dec;5(1):10.
58. LEY RE, BÄCKHED F, TURNBAUGH P, LOZUPONE CA, KNIGHT RD, GORDON JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2005;102(31):11070-5.
59. WEISS GA, HENNET T. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2017; 1;74(16):2959-77.
60. CHEVALIER C, STOJANOVIĆ O, COLIN DJ, SUAREZ-ZAMORANO N, TARALLO V, VEYRAT-DUREBEX C, RIGO D et al. Gut microbiota orchestrates energy homeostasis during cold. *Cell.* 2015;163(6):1360-74.
61. LI L, ZHAO X. Comparative analyses of fecal microbiota in Tibetan and Chinese Han living at low or high altitude by barcoded 454 pyrosequencing. *Scientific reports.* 2015; 7;5:14682.
62. EMOTO T, YAMASHITA T, SASAKI N, HIROTA Y, HAYASHI T, SO A, KASAHARA K et al. Analysis of gut microbiota in coronary artery disease patients: a possible link between gut microbiota and coronary artery disease. *AtherosclerThromb.*2016;23:908–921.
63. WONG JMW. Gut microbiota and cardiometabolic outcomes: Influence of dietary patterns and their associated components. *Am. J. Clin. Nutr.* 2014;100 (1): 369S–377S.
64. LAU K, SRIVATSAV, V RIZWAN, A NASHED, A LIU, R SHEN, R AKHTAR et al. Bridging the gap between gut microbial dysbiosis and cardiovascular diseases. *Nutrients.* 2017;9(8):859.
65. WANDERSMAN C, DELEPELAIRE P. Bacterial iron sources: From siderophores to hemophores. *Annu.Rev.Microbiol.*2004;58:611–647.
66. JERNBERG C, LOFMARK S, EDLUND C, JANSSON JK. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology* 2010; 156 (11):3216–3223.
67. STORINO G.F., MORAES C, SALDANHA J, MAFRA D. Mortalidade Cardiovascular em Pacientes Renais Crônicos: o Papel das Toxinas Urêmicas. *Int J Cardiovasc Sci.* 2015;28(4), 327-334.
68. MAFRA D, BORGES N, ALVARENGA L, ESGALHADO M, CARDOZO L, LINDHOLM B et al. Dietary components that may influence the disturbed gut microbiota in chronic kidney disease. *Nutrients.* 2019;11(3): 496.

69. WW TANG, Z WANG, Y FAN, B LEVISON, JE HAZEN, LM DONAHUE, et al. Prognostic value of elevated levels of intestinal microbe-generated metabolite trimethylamine-N-oxide in patients with heart failure: refining the gut hypothesis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2014; 64 (18): 1908–1914.
70. E RANDRIANARISOA, A LEHN-STEFAN, X WANG, M HOENE, A PETER, SS HEINZMANN, et al. Relationship of serum trimethylamine N-oxide (TMAO) levels with early atherosclerosis in humans. *Sci. Rep.* 2016;6:26745.
71. YONEMORI KM, LIM U, KOGA KR, WILKENS LR, AU D, BOUSHEY CJ et al. Dietary choline and betaine intakes vary in an adult multiethnic population. *J Nutr.* 2013;143(6):894-899.
72. CHO CE, TAESUWAN S, MALYSHEVA OV, BENDER E, TULCHINSKY NF, YAN J, SUTTER JL et al. Trimethylamine-N-oxide (TMAO) response to animal source foods varies among healthy young men and is influenced by their gut microbiota composition: A randomized controlled trial. *Mol. Nutr. Food Res.* 2017;61: 1600324.
73. ZEISEL SH, WARRIER M. Trimethylamine N-Oxide, the Microbiome, and Heart and Kidney Disease. *Annu. Rev. Nutr.* 2017;37:157–181.
74. TANG WW, WANG Z, LEVISON BS, KOETH RA, BRITT EB, FU X et al. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N. Engl.* 2013;368(17):1575-1584.
75. ZHU Y, JAMESON E, CROSATTI M, SCHÄFER H, RAJAKUMAR K, BUGG TD, et al. Carnitine metabolism to trimethylamine by an unusual Rieske-type oxygenase from human microbiota. *Proc Natl Acad Sci* . 2014;(11):4268-4273.
76. ROMANO KA, VIVAS EI, AMADOR-NOGUEZ D, REY FE.. Intestinal microbiota composition modulates choline bioavailability from diet and accumulation of the proatherogenic metabolite trimethylamine-N-oxide. *MBio.* 2015;1;6(2):e02481-14.
77. HOWLETT AC. The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid.* 2002;68:619-631.
78. PORTA, GILDA. Transporte dos Ácidos Biliares. *GM Bahia.* 2008; 76(2): 13-15
79. MA G, PAN B, CHEN Y, GUO C, ZHAO M, ZHENG L, CHEN B. Trimethylamine N-oxide in atherogenesis: impairing endothelial self-repair capacity and enhancing monocyte adhesion. *Bio reports.* 2017;30;37(2):BSR20160244.
80. SELDIN MM, MENG Y, QI H, ZHU W, WANG Z, HAZEN SL, et al. Trimethylamine N-oxide promotes vascular inflammation through signaling of mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- κ B. *J American Heart Association.* 2016;22;5(2):e002767.

81. MA G, PAN B, CHEN Y, GUO C, ZHAO M, ZHENG L, et al. Trimethylamine N-oxide in atherogenesis: Impairing endothelial self-repair capacity and enhancing monocyte adhesion. *Biosci Rep*. 2017;37(2): 1-12.
82. SELDIN MM, MENG Y, QI H, ZHU W, WANG Z, HAZEN SL, et al. Trimethylamine N-Oxide Promotes Vascular Inflammation Through Signaling of Mitogen-Activated Protein Kinase and Nuclear Factor- κ B. *J. Am Heart Assoc*. 2016;5(2): 1-12.
83. GENG J, YANG C, WANG B, ZHANG X, HU T, GU Y, et al. Trimethylamine N-oxide promotes atherosclerosis via CD36-dependent MAPK/JNK pathway. *Biomed Pharmacother* . 2018; 97:941-947.
84. IU L , TAO X , XIONG H , YU J , WEI H .. Lactobacillus plantarum ZDY04 exhibits a strain-specific property of lowering TMAO via the modulation of gut microbiota in mice. *Food Funct*. 2018;9(8):4299-4309.
85. SMITH AH, ZOETENDAL E, MACKIE RI. Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microb Ecol*. 2005;50:197–205.
86. LAU K, SRIVATSAV V, RIZWAN A, NASHED A, LIU R, SHEN R, AKHTAR M BRIDGING. the gap between gut microbial dysbiosis and cardiovascular diseases. *Nutrients*.2017 Aug;9(8):859.
87. CIANCIOSI D, FORBES-HERNÁNDEZ T, AFRIN S, GASPARRINI M, REBOREDO-RODRIGUEZ P, MANNA P et al. Phenolic compounds in honey and their associated health benefits: A review. *Molecules*. 2018;23(9):2322.
88. BARBOSA T, NIELSEN RM, FERNANDES D. Compostos Bioativos e Doenças Cardiovasculares: revisando as evidências científicas. *Revista EVS*. 2014; 41(2): 181-192.
89. SIRÓ I, KÁPOLNA E, KÁPOLNA B, LUGASI A. . Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance: A review. *Appetite*. 2008;51(3): 456-467.
90. RAMIREZ AVG. A importância da microbiota no organismo humano e sua relação com a obesidade. *International J Of Nutr*. 2017;10(4):153-160.
91. GUIMARÃES LM, DE OLIVEIRA DS. Influência de uma alimentação saudável para longevidade e prevenção de doenças. *Interciência & sociedade*. 2014;3(2).
92. WEI-KAI WU, SURAPHAN PANYOD, CHI-TANG HO, CHING-HUA KUO MING-SHIANG WU, LEE-YAN SHEEN. Dietary allicin reduces transformation of L-carnitine to TMAO through impact on gut microbiota. *J Funct Foods*. 2015;15:408-417.
93. ANNUNZIATA G, MAISTO M, SCHISANO C, CIAMPAGLIA R, NARCISO V, TENORE GC, et al. Effects of Grape Pomace Polyphenolic Extract (Taurisolo) in Reducing TMAO Serum Levels in Humans: Preliminary Results

- from a Randomized, Placebo-Controlled, Cross-Over Study. *Nutrients*. 2019;11(1):139.
94. LI Q, WU T, LIU R, ZHANG M, WANG R. Soluble dietary fiber reduces trimethylamine metabolism via gut microbiota and co-regulates host AMPK pathways. *Mol Nutr food Res*. 2017;61(12):1700473.
 95. REEVES MA, HOFFMANN PR. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(15):2457-2478.
 96. FREITAS SC, GONÇALVES EB, ANTONIASSI R, FELBERG I, OLIVEIRA SP. Meta-análise do teor de selênio em castanha-do-brasil. *Braz J Food Technol*. 2008;11: 54-62.
 97. LEMIRE M, PHILIBERT A, FILLION M, PASSOS CJ, GUIMARÃES JR, BARBOSA JR et al, No evidence of selenosis from a selenium-rich diet in the Brazilian Amazon. *Environ Int*. 2012;40:128-36.
 98. FORDYCE FM. Selenium deficiency and toxicity in the environment: essentials of medical geology. Netherlands: Springer, 2013: 812.
 99. ADRIANA D, BARLETA VCN. Alimento funcional: uma nova abordagem terapêutica das dislipidemias como prevenção da doença aterosclerótica. *Cad unifo*. 2017;2(3):100-120.
 100. CARVALHO IMM, QUEIROZ, JH, BRITO LF, TOLEDO RCL, SOUZA AL. O consumo de castanhas pode reduzir o risco de processos inflamatórios e doenças crônicas. *Encicl Biosfera*. 2012;8(15):1977-1996.
 101. DUMONT E, DE PAUW L, VANHAECKE F, CORNELIS R. et al. Speciation of Se in *Bertholletia excelsa* (Brazil nut): A hard nut to crack? *Food Chem*. 2006; 95(4): 684-692.
 102. SEGURA R, JAVIERRE C, LIZARRAGA MA, ROS E. . Other relevant components of nuts, phytosterols, folate and minerals. *Br J Nutr*. 2006;96(2): 36-44.
 103. CABA PI, CABELLO MA, OYA MB JF, GARCÍA AJ, et al. Evaluación e nutrición parenteral estandarizada en niños. *Nutr Hosp*. 2010;25(3):449-55.
 104. USLU N, SALTIK-TEMIZEL IN, DEMIR H, GÜRAKAN F, OZEN H, YÜCE A. . Serum selenium concentrations in cirrhotic children. *Turk J Gastroenterol*. 2010;21(2):153-5.
 105. RAYMAN MP. Selenium and human health. *Lancet*. 2012;379(9822): 1256-1268.
 106. LEMIRE M, MERGLER D, HUEL G, PASSOS CJ, FILLION M, PHILIBERT A, et al. Biomarkers of selenium status in the Amazonian context: blood, urine and sequential hair segments. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2009;19(2):213.

107. CARDOSO BR, DUARTE GB, REIS BZ, COZZOLINO SM. Brazil nuts: Nutritional composition, health benefits and safety aspects. *Food Res Int.* 2017;1;100:9-18.
108. CASAS-AGUSTENCH P, BULLÓ M, SALAS-SALVADÓ J. Nuts, inflammation and insulin resistance. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2010; 19(1): 124-130.
109. FERRARI CK. Anti-atherosclerotic and cardiovascular protective benefits of Brazilian nuts. *Frontiers bio (Scholar edition).* 2020;12:38-56.
110. SUGIZAKI C, NAVES M. Potential Prebiotic Properties of Nuts and Edible Seeds and Their Relationship to Obesity. *Nutrients.* 2018;10(11):1645.
111. STOCKLER-PINTO MB, MAFRA D, FARAGE NE, BOAVENTURA GT, COZZOLINO SM. Effect of Brazil nut supplementation on the blood levels of selenium and glutathione peroxidase in hemodialysis patients. *Nutrition.* 2010; 26(11-12): 1065-69.
112. BURATTO AP, CARPES ST, DALLA VECCHIA P, LOSS EM, APPELT P. L. Determinação da atividade antioxidante e antimicrobiana em castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa*). *Rev Bras Pes Aliment.* 2011;2(1):60-65.
113. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: preventing and managing the global epidemic. WHO Technical Report Series, Geneva, n. 894, 1995.
114. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: preventing and managing the global epidemic. WHO Technical Report Series, Geneva, n. 894, 1997.
115. ABESO. Diretrizes Brasileiras de Obesidade 2009/2010. Itapevi, SP: AC Farmacêutica: p. 1-85. 2009.
116. INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary Reference Intakes: Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids. Washington, D.C., National Academies Press. 2005.
117. REBOUCHE CJ, ENGEL AG. Kinetic compartmental analysis of carnitine metabolism in the human carnitine deficiency syndromes. Evidence for alterations in tissue carnitine transport. *The Journal of clinical investigation.* 1984;73(3):857-867.
118. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Atualização da V Diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose. *Arq Bras Cardiol.* 2017 (in press).
119. CASTELLI WP, ABBOTT RD, MCNAMARA PM. Summary estimates of cholesterol used to predict coronary heart disease. *Circulation.* 1983; 63:730-34.
120. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz Brasileira de Prevenção Cardiovascular. *Arq Bras Cardiol.* 2011 (in press).

121. SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018. Diretrizes SBD (2017).
122. BORGES NA, STENVINKEL P, BERGMAN P, QURESHI AR, LINDHOLM B, MORAES C, STOCKLER-PINTO MB et al. Effects of probiotic supplementation on trimethylamine-N-oxide plasma levels in hemodialysis patients: a pilot study. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2019;15;11(2):648-54.
123. EUROPEAN UREMIC SOLUTES DATABASE (EUTOX-DB). Available at: <http://www.uremictoxins.org/DataBase.html>. Acessado Janeiro 16, 2019.
124. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz sobre o consumo de gordura e saúde cardiovascular. *Arq Bras Cardiol*. 2013 (in press).
125. FRANCISCO PMSB, SEGRI NJ, BORIM FSA, MALTA DC. Prevalência simultânea de hipertensão e diabetes em idosos brasileiros: desigualdades individuais e contextuais. *Ciênc Saúde Colet*. 2018;23, 3829-3840.
126. LUNELLI RP, PORTAL VL, ESMÉRIO FG, MORAES MA, SOUZA END. Adesão medicamentosa e não medicamentosa de pacientes com doença arterial coronariana. *Acta Paul Enferm*. 2009;22(4), 367-73.
127. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz Brasileira de Prevenção Cardiovascular. *Arq Bras Cardiol*. 2014 (in press).
128. GOMES S, TORRES AG. Optimized extraction of polyphenolic antioxidant compounds from Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) cake and evaluation of the polyphenol profile by HPLC. *J Sci Food Agric*. 2016;96(8):2805-14.
129. YANG J, LIU RH, HALIM L. Antioxidant and antiproliferative activities of common edible nut seeds. *LWT-Food Science and Technology*. 2009; 42(1):1-8.
130. ABE LT, LAJOLO FM, GENOVESE MI. Comparison idant capacity of nuts. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2010; 1(30):254-259.
131. KORNSTEINER M, WAGNER K, ELMADFA I. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chem*. 2006; 98: 381–387.
132. YUAN Y, ZHENG Y, ZHOU J, GENG Y, ZOU P, LI Y ET AL. Polyphenol-Rich Extracts from Brown Macroalgae *Lessonia trabeculate* Attenuate Hyperglycemia and Modulate Gut Microbiota in High-Fat Diet and Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Agric Food Chem*. 2019;67(45):12472-12480.
133. CIRES MJ, NAVARRETE P, PASTENE E, CARRASCO-POZO C, VALENZUELA R, MEDINA DA et al. Protective Effect of an Avocado Peel

- Polyphenolic Extract Rich in Proanthocyanidins on the Alterations of Colonic Homeostasis Induced by a High-Protein Diet. *J Agric Food Chem.* 2019;67(42):11616-11626.
134. ISTAS G, WOOD E, LE SAYEC M, RAWLINGS C, YOON J, DANDAVATE V, RODRIGUEZ-MATEOS A. Effects of aronia berry (poly) phenols on vascular function and gut microbiota: a double-blind randomized controlled trial in adult men. *Am J Clin Nutr.* 2019;110(2):316-329.
135. MATHIONI MERTINS, S BERNAT KOLANKIEWICZ, AC, ROSANELLI, SP DE LOURDES, CLORO MM, POLI, G ET AL. Prevalência de fatores de risco em pacientes com infarto agudo do miocárdio. *Avances en Enferm.* 2016;34(1), 30-38.
136. YANG GR, YUAN MX, WAN G, ZHANG XL, FU HJ, YUAN SY et al. Association between Neck Circumference and the Occurrence of Cardiovascular Events in Type 2 Diabetes: Beijing Community Diabetes Study 20 (BCDS-20). *BioMed Res Int.* 2019:4242304
137. VADIVEL V, KUNYANGA CN, BIESALSKI HK. Health benefits of nut consumption with special reference to body weight control. *Nutrition.* 2012; 28(11): 1089-1097.
138. DE SOUZA R, SCHINCAGLIA R, PIMENTEL G, MOTA J. Nuts and human health outcomes: A systematic review. *Nutrients,* 2017;9(12):1311.
139. TAN SZE YEN, DHILLON JAAPNA, MATTES RICHARD D. A review of the effects of nuts on appetite, food intake, metabolism, and body weight. *Am J Clin Nutr.* **2014**;100(1):412S-422S.
140. NATOLI SHARON, MCCOY PENELOPE. A review of the evidence: nuts and body weight. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2007;16(4).
141. BUENO AL, CZEPIELEWSKI MA. O recordatório de 24 horas como instrumento na avaliação do consumo alimentar de cálcio, fósforo e vitamina D em crianças e adolescentes de baixa estatura. *J Nutr.* 2010;23(1):65-73.
142. PIERRILAD, ZAGO JN, MENDES RDCD. Eficácia dos inquéritos alimentares na avaliação do consumo alimentar. *Rev. bras. ciênc. Saúde.* 2015;19(2):91-100.
143. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. *Arq Bras Cardiol.* 2013 (in press).
144. BRANDÃO JM, FERNANDES CDS, BARROSO SG, ROCHA GDS. Associação do consumo de fibras e risco cardiovascular em pacientes idosos. *Int J Cardiovasc Sci.* 2015;28(6):464-71.
145. O'NEIL CE, KEAST DR, FULGONI VL, NICKLAS TA. 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 Pac J Clin Nutr.* 2010;19(1):142.

146. MALINOWSKA AM, SZWENGIEL A, CHMURZYNSKA A. Dietary, anthropometric, and biochemical factors influencing plasma choline, carnitine, trimethylamine, and trimethylamine-N-oxide concentrations. *Int J Food Sci Nutr*. 2017;68(4):488-495.
147. LEAL-WITT MJ, LLOBET M, SAMINO S, CASTELLANO P, CUADRAS D, JIMENEZ-CHILLARON JC et al. Lifestyle Intervention Decreases Urine Trimethylamine N-Oxide Levels in Prepubertal Children with Obesity. *Obesity*. 2018; 10(26): 1603-1610.
148. LAU K, SRIVATSAV V, RIZWAN A, NASHED A, LIU R, SHEN R et al. The gap between gut microbial dysbiosis and cardiovascular diseases. *Nutrients*. 2017; 9(8):859.
149. COMINETTI C, BORTOLI MC, GARRIDO JR, AB COZZOLINO SM. Brazilian nut consumption improves selenium status and glutathione peroxidase activity and reduces atherogenic risk in obese women. *Nutr Res*. 2012;32(6):403-407.
150. STOCKLER-PINTO MB, MAFRA D, MORAES C, LOBO J, BOAVENTURA GT, FARAGE NE, MALM O. Brazil nut (*Bertholletia excelsa*, HBK) improves oxidative stress and inflammation biomarkers in hemodialysis patients. *Biol Trace Elem Res*. 2014;158(1):105-112.
151. DEL GOBBO LC, FALK MC, FELDMAN R, LEWIS K, MOZAFFARIAN D. Effects of tree nuts on blood lipids, apolipoproteins, and blood pressure: systematic review, meta-analysis, and dose-response of 61 controlled intervention trials. *Am J Clin Nutr*, 2015;102(6):1347-1356.
152. LIU K, HUI S, WANG B, KALIANNAN K, GUO X, LIANG, L. Comparative effects of different types of tree nut consumption on blood lipids: a network meta-analysis of clinical trials. *Am J Clin Nutr* . 2019;111(1):219-27.
153. HASANI M, DJALALINIA S, SHARIFI F, VARMAGHANI M, ZAREI M, ABDAR ME, QORBANI M. Effect of selenium supplementation on lipid profile: a systematic review and meta-analysis. *Horm Metab Res*. 2018;50(10), 715-727.
154. DUARTE GB, S REIS, BZ ROGERO, MM VARGAS-MENDEZ, JÚNIOR FB, CERCATO C, COZZOLINO SMF. Consumption of Brazil nuts with high selenium levels increased inflammation biomarkers in obese women: A randomized controlled trial. *Nutrition*. 2019;63, 162-168.
155. MARANHÃO PA, KRAEMER-AGUIAR LG, DE OLIVEIRA CL, KUSCHNIR MC, VIEIRA YR, SOUZA MG, KOURY JC, BOUSKELA E. Brazil nuts intake improves lipid profile, oxidative stress and microvascular

- function in obese adolescents: a randomized controlled trial. *Nutr metabol.* 201;8(1):32.
156. MCKAY DL, CHEN CO, YEUM KJ, MATTHAN NR, LICHTENSTEIN AH, BLUMBERG JB. Chronic and acute effects of walnuts on antioxidant capacity and nutritional status in humans: a randomized, cross-over pilot study. *Nutr J.* 2010;9(1):21.
 157. HADDAD EH, GABAN-CHONG N, ODA K, SABATÉ J. Effect of walnut meal on postprandial oxidative stress and antioxidant levels in healthy individuals. *Nutr J.* 2014;13(4):1-9.
 158. COLPO E, VILANOVA CDD, REETZ L GB, DUARTE MM, FARIAS ILG, MEINERZ DF, WAGNER R. Brazilian nut consumption by healthy volunteers improves inflammatory parameters. *Nutrition*, 2014;30(4):459-465.
 159. SMITS LP, KOOTTE RS, LEVIN E, PRODAN A, FUENTES S, ZOETENDAL EG et al. Effect of vegan fecal microbiota transplantation on carnitine- and choline-derived trimethylamine-*n*-oxide production and vascular inflammation in patients with metabolic syndrome. *J. Am. Heart Assoc.* 2018;7:e008342
 160. BAUGH, MARY ANGIETTA C, MITCHELL C, NEILSON A, DAVY B, HULVER M, DAVY KE. Inulin supplementation does not reduce plasma trimethylamine *n*-oxide concentrations in individuals at risk for type 2 diabetes. *Nutrients*, 2018;10(6):793, 2018.
 161. ZEISEL SH, KLATT KC, CAUDILL MA. Choline. *Adv. Nutr.* 2018;9:58–60.
 162. MENDES EL, BRITO CJ. Carnitina, colina e fosfatidilcolina como nutrientes reguladores do metabolismo de lipídios e determinantes do desempenho esportivo *Rev Digital Buen Aires.* 2009;12.
 163. LOPES RVC, BALTAR VT, MARCHIONI DM, FISBERG RM. Betaína e Colina dietéticas relacionadas à homocisteína plasmática: estudo de base populacional, São Paulo, Brasil. *Int J Cardiovasc Sci.* 2015; 28(1):61-69.
 164. TENORE GIAN CARLO, CARUSO D, BUONOMO G, D'AVINO M, CIAMPAGLIA R, MAISTO M, SCHISANO C, et al. Lactofermented Annurca Apple Puree as a Functional Food Indicated for the Control of Plasma Lipid and Oxidative Amine Levels: Results from a Randomised Clinical Trial. *Nutrients.* 2019; 11(1):122,
 165. ANNUNZIATA G, MAISTO M, SCHISANO C, CIAMPAGLIA R, NARCISO V, HASSAN ST et al. Effect of grape pomace polyphenols with or without pectin on TMAO serum levels assessed by LC/MS-based assay: A preliminary clinical study on overweight/obese subjects. *Front Pharmacol.* 2019;10:575.

166. ANGILETTA CJ, GRIFFIN LE, STEELE CN, BAER DJ, NOVOTNY JA, DAVY KP et al. Impact of short-term flavanol supplementation on fasting plasma trimethylamine N-oxide concentrations in obese adults. *Food Funct.* 2018;9(10):5350-61.
167. GENONI ANGELA, LYONS-WALL P, BOYCE MC, CHRISTOPHERSEN CT, BIRD A, DEVINE A. A Paleolithic diet lowers resistant starch intake but does not affect serum trimethylamine-N-oxide concentrations in healthy women. *Br J Nutr.* 2019;21(3):322-329.
168. GRIFFIN LE, DJURIC Z, ANGILETTA CJ, MITCHELL CM, BAUGH ME, DAVY KP et al. A Mediterranean diet does not alter plasma trimethylamine N-oxide concentrations in healthy adults at risk for colon cancer. *Food Funct.* 2019;10(4):2138-47.
169. BAUGH M, STEELE C, ANGILETTA C, MITCHELL C, NEILSON A, DAVY B et al. Inulin supplementation does not reduce plasma trimethylamine n-oxide concentrations in individuals at risk for type 2 diabetes. *Nutrients.* 2018;10(6):793.
170. BOUTAGY NE, NEILSON AP, OSTERBERG KL, SMITHSON AT, ENGLUND TR, DAVY BM et al. Short-term high-fat diet increases postprandial trimethylamine-*n*-oxide in humans. *Nutr. Res.* 2015;35:858–864.
171. BERGERON N, WILLIAMS PT, LAMENDELLA R, FAGHIHNIA N, GRUBE A, LI X et al. Diets high in resistant starch increase plasma levels of trimethylamine-*n*-oxide, a gut microbiome metabolite associated with CVD risk. *Br. J. Nutr.* 2016;116: 2020–2029.

10.0 ANEXOS

Certificado de aprovação Comitê de Ética

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL

FLUMINENSE/ FM/ UFF/ HU

PARECER CONSUBSTANCIADO DO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM CASTANHA-DO-BRASIL (Bertholletia excelsa H.B.K.) NA EXPRESSÃO DE NRF2 E NF-kB EM PACIENTES COM DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

Pesquisador: Ludmila Ferreira Medeiros de França Cardozo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 35035414.8.0000.5243

Instituição Proponente: Programa de Pós-Graduação em Ciências Cardiovasculares

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 826.041

Data da Relatoria: 03/10/2014

Apresentação do Projeto:

O grupo tem estudado os efeitos da suplementação da castanha-do-brasil (um dos alimentos mais ricos em selênio (Se)) e observado uma melhora significativa na concentração plasmática e eritrocitária de Se e, além disso, aumento da atividade da glutathione peroxidase, diminuição no dano do DNA visto pela redução dos níveis de 8-hydroxy-2-deoxyguanosine e redução dos níveis plasmáticos de citocinas em pacientes com Doença Renal Crônica que apresentam aterosclerose. Assim, o presente trabalho pretende analisar os efeitos benéficos provenientes da suplementação de castanha-do-brasil tem relação com a expressão desses fatores de transcrição Nrf2 e NF-kB. Este estudo será do tipo longitudinal, onde serão selecionados de forma



randomizada 30 pacientes com doença arterial coronariana do HUAP, para o grupo suplementação ou o grupo controle. Os dados bioquímicos serão analisados antes e após a suplementação, e, além disso, esses pacientes serão comparados com 30 pacientes que não receberão a suplementação. Os pacientes participantes da pesquisa receberão 1 unidade de castanha-do-brasil por dia durante 3 meses, e serão orientados sobre o horário e refeição que deverão comer a castanha para melhor absorção do Selênio. Durante esse período serão coletados os dados antropométricos, de ingestão alimentar e durante o período de intervenção será feito o acompanhamento dos exames bioquímicos de rotina. Antes e após a suplementação serão feitas as análises de: 1-Avaliação do estado nutricional e da Ingestão alimentar; 2-Mensuração de parâmetros antropométricos: massa corporal, estatura, circunferência do braço (CB), dobras cutâneas de quatro pontos padrão (bíceps, tríceps, subescapular e suprailíaca); 3-Análises bioquímicas: Parâmetros bioquímicos de rotina (hemoglobina, hematócrito e perfil lipídico) retirados dos prontuários; Dosagens Sanguíneas Determinação das enzimas antioxidantes (glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), citocinas inflamatórias (PCR, IL-6 e TNF) e moléculas de adesão (ICAM e VCAM); 4-Teste Ergométrico.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar os efeitos da suplementação com castanha-do-brasil na expressão de Nrf2 e NFkB de pacientes com doença arterial coronariana.

Objetivo Secundário: Avaliar marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo antes e após suplementação.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: A suplementação com castanha-do-brasil não irá causar desconfortos ou malefício ao seu estado de saúde. Benefícios: A Doença Cardiovascular é a principal causa de morte no Brasil. O aumentado estresse oxidativo e o processo inflamatório são importantes fatores de risco cardiovasculares já bem estabelecidos na literatura. Nesse sentido, intervenções realizadas com o objetivo de retardar ou mesmo inibir a ativação desses fatores de risco são importantes para estes pacientes. Assim, com o presente projeto, espera-se (a) conhecer a expressão de ativadores ou inibidores nucleares da síntese de citocinas como o NF-B e NRF2 e;

(b) verificar se a suplementação com castanha-do-brasil altera os níveis desses fatores nos pacientes com DAC.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente projeto objetivo verificar o efeito da suplementação nutricional com castanha-do-brasil para aumento dos níveis séricos de SE, como um antioxidante, para a expressão de fatores nucleares NRF2 e NF-kB. O estudo comparará dois grupos de pacientes cardiovasculares, um controle e outro com suplementação nutricional. O projeto está bem redigido e apresenta as informações necessárias para a apreciação deste parecer. Todas as pendências identificadas no parecer anterior foram atendidas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos foram apresentados e o TCLE está adequadamente redigido.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Como as pendências do parecer anterior foram plenamente atendidas, este parecer é favorável à aprovação deste projeto de pesquisa.

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP:

NITEROI, 09 de outubro de 2014

Assinado por:

ROSANGELA ARRABAL THOMAZ (Coordenador)

Endereço: Rua Marquês de Paraná, 303 4º
Andar

24.030-

Bairro: Centro

CEP: 210

UF: RJ

Município: NITEROI

Telefone (21)2629-
: 9189

Fax: (21)2629-
9189

E-mail: etica@vm.uff.br

