



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

FERNANDA MARTINS

ATIVIDADE MODULADORA DA ALGA *CHLORELLA* EM PACIENTES COM
INTOLERÂNCIA À GLICOSE E DIABETES TIPO 2

CAMPINAS
2018

FERNANDA MARTINS

ATIVIDADE MODULADORA DA ALGA *CHLORELLA* EM PACIENTES COM
INTOLERÂNCIA À GLICOSE E DIABETES TIPO 2

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

ORIENTADORA: MARY LUCI DE SOUZA QUEIROZ

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA FERNANDA MARTINS, E ORIENTADA PELA PROF.^a. DR.^a. MARY LUCI DE SOUZA QUEIROZ

CAMPINAS
2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 01-P-3371/2017; FAPESP, 2014/10634-0

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

M366a Martins, Fernanda, 1985-
Atividade moduladora da alga *Chlorella* em pacientes com intolerância à glicose e diabetes tipo 2 / Fernanda Martins. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Mary Luci de Souza Queiroz.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Chlorella. 2. Diabetes Mellitus tipo 2. 3. Intolerância à glicose. 4. Qualidade de vida. 5. Inflamação. I. Queiroz, Mary Luci de Souza, 1948--. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Modulating activity of the alga Chlorella in patients with impaired glucose tolerance and type-2 diabetic

Palavras-chave em inglês:

Chlorella

Diabetes Mellitus, Type 2

Glucose intolerance

Quality of life

Inflammation

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Doutora em Farmacologia

Banca examinadora:

Mary Luci de Souza Queiroz [Orientador]

Claudia Bincoletto Trindade

João Agostinho Machado Neto

Maria Candida Ribeiro Parisi

Sara Teresinha Olalla Saad

Data de defesa: 27-02-2018

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

**BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO
FERNANDA MARTINS**

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. MARY LUCI DE SOUZA QUEIROZ

MEMBROS:

1. PROFA. DRA. MARY LUCI DE SOUZA QUEIROZ

2. PROFA. DRA. CLAUDIA BINCOLETTO TRINDADE

3. PROF. DR. JOÃO AGOSTINHO MACHADO NETO

4. PROFA. DRA. MARIA CÂNDIDA RIBEIRO PARISI

5. PROFA. DRA. SARA TERESINHA OLALLA SAAD

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora
encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 27/02/2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

Ao meu querido Marcelo,
por todo amor
e paciência dedicados a mim,
pelo companheirismo e incentivo
à realização deste trabalho
e em todos os momentos
da minha vida.

Aos meus queridos pais,
Clodomir-RNA e Rosiris,
pelo amor incondicional,
por todo incentivo ao estudo e crescimento profissional,
e por estarem presentes
em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos,
Fabio, Kátia e Fernanda (cunhada),
por todo companheirismo e
apoio durante todos estes anos.

Aos meus queridos sobrinhos,
Benício e Betina,
Por me ensinarem o que é ser tia,
E por me lembrar que a inocência de criança
Deveria durar a vida toda

A vocês todos o meu amor e gratidão....

PÁGINA DE AGRADECIMENTOS

Ao Mestre Jesus, por estar comigo em todos os momentos da minha vida, pelo amor e confiança. Aos amigos espirituais, que me auxiliam diariamente e incentivam a prosseguir na senda do bem, na busca de crescimento espiritual.

À minha orientadora, Professora Dra. Mary Luci de Souza Queiroz, orientadora deste trabalho, pela oportunidade e por todo incentivo ao meu crescimento científico, intelectual e pessoal.

À querida Cristiane Okuda Torello, por acreditar em mim em todos os momentos, pelo incentivo, amizade, carinho e companheirismo que nasceu do nosso convívio diário.

À querida Tamara Lopes de Castro por todos os momentos que compartilhamos nessa jornada, pela ajuda, pelas risadas, pelo ombro amigo e por ser tão minha irmã.

A toda equipe do CECOM, que possibilitou essa pesquisa, auxiliou e não mediu esforços para que tudo corresse bem.

Aos queridos voluntários que participaram da pesquisa, por todos os momentos em que pudemos compartilhar juntos, todo apoio e confiança que nos uniram durante a pesquisa e para sempre.

Aos meus familiares, por me incentivarem em todos os momentos, e por me fortalecerem nos momentos difíceis.

À querida Mari, pela amizade, auxílio diário, risadas e incentivo.

Aos queridos Sueli, Rodrigo e Fer-Bel, sobretudo pela amizade, contribuição e apoio.

A Universidade São Francisco, por todo aprendizado durante a graduação, possibilitando o início deste trabalho.

À Dra Patricia de Oliveira Carvalho, por me dar a primeira oportunidade de Iniciação científica e por abrir o mundo da pesquisa científica para mim.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO: A alga *Chlorella* é um alimento completo, contendo todos os ingredientes necessários para promover a saúde. É considerada um modificador da resposta biológica (adaptógeno), como demonstrado pela sua atividade moduladora frente a diferentes tipos de estresse, tanto em seres humanos como em animais de experimentação. Estudos pioneiros do nosso laboratório demonstraram que a capacidade da alga de prevenir a resistência à insulina em animais obesos é em parte devido à melhoria na via de sinalização da insulina no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, produzida através do aumento na fosforilação de proteínas, como IR, IRS-1 e AKT e redução na fosforilação do IRS-1^{ser307}. Além disso, o tratamento com a alga dos animais obesos restaurou para os valores normais os níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias e os níveis reduzidos de citocinas anti-inflamatórias, assim como os níveis aumentados de triglicerídeos, colesterol total e frações, e ácidos graxos livres. Resistência à insulina é um importante mecanismo fisiopatológico que antecede a progressão para diabetes tipo 2 (DM2). Embora o tratamento farmacológico do DM2 tenha alguma eficácia em melhorar alguns parâmetros metabólicos, ele apresenta vários efeitos colaterais, que, em muitos casos, podem piorar as condições de saúde e a qualidade de vida. Nesse contexto, produtos de origem natural vêm sendo considerados de importância estratégica na pesquisa de novas substâncias seguras e eficazes no tratamento de doenças relacionadas à resistência à insulina. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do uso da *Chlorella* em pacientes com intolerância à glicose (IG) e DM2. Nossos resultados mostraram que o uso da alga melhorou significativamente a qualidade de vida relacionada à saúde (QVRS) dos grupos IG, DM2, assim como dos controles. Ao mesmo tempo, os níveis aumentados das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6, MCP-1, IL-1 β , IL-8 foram reduzidos e níveis reduzidos da citocina anti-inflamatória IL-10 foram aumentados nos grupos IG e DM2. Um aspecto importante foi a correlação entre a melhora na QVRS e a modulação pela alga nos níveis de citocinas pró- e anti-inflamatórias observados no grupo DM2. Redução nos níveis de leptina, resistina e glucagon, e aumento de adiponectina, GLP-1 e GIP também foram observados em ambos os grupos. Na microbiota intestinal, o uso da alga produziu redução significativa do filo *Bacteroidetes*, aumentado no DM2. Outro aspecto relevante avaliado neste trabalho diz respeito à falta de consenso quanto à dose clínica mínima adequada de *Chlorella* capaz de produzir os seus efeitos adaptogênicos, uma questão ainda aberta na literatura. Esta falta de consenso está em grande parte relacionada à quase ausência de efeitos colaterais observados com o uso da alga. Para isso, escolhemos as doses de 1,6g/dia e 3g/dia, as quais estão no patamar das doses mínimas utilizadas nos estudos clínicos da literatura. Quanto ao período de tratamento, considerando que a duração no uso da alga deve ser de médio e longo prazo, escolhemos o período de 12 meses para os nossos estudos, em contraste aos períodos relativamente curtos observados na maioria dos estudos clínicos da literatura. Os resultados descritos acima indicam que as doses utilizadas são suficientes para produzir a resposta adaptogênica, sendo que não houve diferença entre as respostas das duas doses. Estes achados corroboram estudos experimentais do nosso grupo nos quais, uma vez atingidos os níveis de resposta equivalentes aos do grupo controle (homeostase), doses mais elevadas não levam a respostas mais ou menos pronunciadas, manifestando-se na forma de *plateaux*. Em conjunto, nossos resultados apontam a alga *Chlorella* como alternativa terapêutica e/ou complementar promissora no tratamento da DM2 e suas complicações. Além disso, o fato bem reconhecido de que o papel do processo inflamatório é crucial não apenas nas doenças infecciosas, mas também em ampla gama de doenças crônicas não infecciosas, talvez até em todas elas, reforça o uso da *Chlorella* no tratamento de outras condições patológicas, incluindo cânceres, doenças autoimunes e infecciosas.

Palavras Chaves: *Chlorella*, Diabetes tipo 2, Intolerância à glicose, Qualidade de vida, Inflamação de baixo grau

ABSTRACT: The alga *Chlorella* is a complete food, containing all the ingredients necessary to promote health. It is considered a biological response modifier (adaptogen), as demonstrated by its modulating activity against different types of stress, both in humans and in experimental animals. Pioneer studies from our laboratory demonstrated that the ability of the algae to prevent insulin resistance in obese animals is partly due to the improvement in the insulin signaling pathway in the liver, skeletal muscle and adipose tissue, produced by increased phosphorylation of proteins, such as IR, IRS-1 and Akt and reduction in the phosphorylation of IRS-1ser307. In addition, treatment with the algae in obese animals restored to normal the increased levels of pro-inflammatory cytokines and the reduced levels of anti-inflammatory cytokines, as well as the increased levels of triglycerides, total cholesterol and fractions, and free fatty acids. Insulin resistance is an important pathophysiological mechanism that precedes the progression to type 2 diabetes (T2D). Although the pharmacological treatment of T2D has some efficacy in improving some metabolic parameters, it has several side effects, which, in many cases, can worsen health conditions and quality of life. In this context, products of natural origin have been considered of strategic importance in the research of new safe and effective substances in the treatment of diseases related to insulin resistance. Thus, the aim of this study was to investigate the effects of the use of *Chlorella* in patients with glucose intolerance (GI) and T2D. Our results showed that the use of the algae significantly improved the health-related quality of life (HRQoL) of the IG, T2D groups, as well as the controls. At the same time, increased levels of the proinflammatory cytokines TNF- α , IL-6, MCP-1, IL-1 β , IL-8 were reduced and reduced levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 were increased in IG and T2D. Important aspect was the correlation between the improvement in HRQoL and the modulation in the levels of pro- and anti-inflammatory cytokines observed in the T2D group. Reduced levels of leptin, resistin and glucagon, and increased levels of adiponectin, GLP-1 and GIP were also observed in both groups. In the intestinal microbiota, the use of the alga produced a significant reduction of the phylum *Bacterioidetes*, increased in T2D. Another relevant aspect evaluated in this work was the lack of consensus regarding the adequate minimum clinical dose of *Chlorella* capable of producing its adaptogenic effects, an issue still open in the literature. This lack of consensus is largely related to the almost absence of side effects observed with the use of algae. For this, we have chosen the doses of 1.6 g/day and 3 g/day, which are at the level of the minimum doses used in clinical studies in the literature. Regarding the treatment period, considering that the duration of the use of the algae is of medium to long term, we selected the 12-months period for our studies, in contrast to the relatively short periods observed in most clinical studies in the literature. The results described above indicate that the doses used are sufficient to produce the adaptogenic response, and there was no difference between the responses of the two doses. These findings corroborate experimental studies from our group in which, once a response level equivalent to that of the control group (homeostasis) is reached, higher doses do not lead to more or less pronounced responses, and a *plateau* in the response is established. Together, our results indicate the algae *Chlorella* as a promising therapeutic and / or complementary alternative in the treatment of T2D and its complications. Moreover, the well-recognized fact that the role of inflammatory processes is crucial not only in infectious diseases but also in a wide range of chronic non-infectious diseases, perhaps even all of them, reinforces the use of *Chlorella* in the treatment of other pathological conditions, including cancers, autoimmune diseases and infectious diseases.

Key words: *Chlorella*, Type-2 diabetes, Glucose intolerance, Quality of life, Low-grade chronic inflammation

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Perfil da população dos grupos DM2, IG e CT	28
Tabela 2: Desenho da placa de PCR- <i>array</i> para a pesquisa de mi-RNA-126 e mi-RNA-375	35
Tabela 3: Média e desvio padrão dos escores em cada domínio do SF-36 do grupo DM2, IG e CT em T0, T6 e T12 de uso da <i>Chlorella</i>	41
Tabela 4: Parâmetros bioquímicos avaliados durante o período de estudo	47

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema de procedimento de extração de RNA total. Adaptado do *handbook* do kit 34
- Figura 2:** Médias dos escores de cada domínio do SF-36 do grupo DM2 em T0, T6 e T12 38
- Figura 3:** Médias dos escores de cada domínio do SF-36 do grupo IG em T0, T6 e T12 39
- Figura 4:** Médias dos escores de cada domínio do SF-36 do grupo CT em T0, T6 e T12 39
- Figure 5:** Níveis séricos das citocinas TNF- α , IL-6, IL-1 β , MCP-1, IL-8 e IL-10 do grupo DM2 e IG em T0, T6 e T12 40
- Figure 6:** Níveis séricos de adiponectina, leptina e resistina do grupo DM2 e IG em T0, T6 e T12 41
- Figure 7:** Níveis séricos de GLP-1, GIP e glucagon dos grupos DM2 e IG em T0, T6 e T12 42
- Figura 8:** Correlação entre os domínios do SF-36 e níveis de citocinas/adipocinas alterados significativamente no grupo DM2 em T6 46
- Figura 9:** Correlação entre os domínios do SF-36 e níveis de citocinas alterados significativamente no grupo DM2 em T12 44
- Figura 10:** Expressão relativa do mi-RNA-126 e mi-RNA-375 antes e depois da utilização da alga *Chlorella* do grupo DM2 e IG 45
- Figure 11:** Porcentagens dos principais filos de bactérias presentes em amostras de fezes do grupo DM2, antes e depois da utilização de *Chlorella* 46
- Figura 12:** Porcentagem de *Bacteroidetes* e *Firmicutes* em amostras de fezes do grupo DM2, em T0 e T1 após o uso de *Chlorella* 46
- Figura 13:** (A) Na resistência à insulina ocorre ativação das vias inflamatórias JNK e NF-kB, as quais são serinas quinases que levam à fosforilação em serina do Ir β e IRS e consequente diminuição da translocação do GLUT-4 para a membrana com redução de captação de glicose e consequente hiperglicemia. (B) Em presença da *Chlorella*, com a redução na ativação pró-inflamatória são reduzidas a ativação de JNK e NF-kB e a transcrição de fatores solúveis pró-inflamatórios, além de restaurar o processo normal de fosforilação do IRS1 em resíduos de tirosina no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo. 51
- Figura 14:** Papel fisiológico das incretinas: após refeições os nutrientes passam pelo intestino e estimulam as células K e L para a produção de GIP e GLP-1. Ambos atuam nas células beta para aumentar a secreção de insulina, e ainda o

GLP-1 diminuí a secreção de glucagon. No DM2, ocorre a desregulação da secreção de glucagon, estimulando a produção de glicose através da gliconeogênese, agravando o quadro de hiperglicemia. A utilização da *Chlorella* levou a diminuição das concentrações séricas de glucagon e aumentou os níveis séricos de GLP-1 e GIP. 53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGLs	Ácidos graxos livres
AKT	Proteína quinase B
ALA	Ácido aminolevulínico
CCR2	Receptor de quimiocina tipo 2
CCR5	Receptor de quimiocina tipo 5
CE	Colesterol esterase
CECOM	Centro de Saúde da Comunidade da UNICAMP
CFU-GM	Precusores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CO	Colesterol oxidase
CT	Grupo controle
DPP-4	<i>Dipeptidil peptidase-4</i>
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Método imunoenzimático
GIP	Polipeptídeo inibidor gástrico
GLP-1	Peptídeo 1 tipo glucagon
GLUT-4	Transportador de glicose tipo 4
GOD	Glicose oxidase
HbA1c	Hemoglobina glicada
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HEM	Hematopoese extramedular
HOMA-IR	<i>Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance</i>
IFN γ	Interferon gama
IG	Intolerância à glicose
iKK β	Inibidor do fator nuclear kappa B
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IMC	Índice de massa corpórea
IR	Receptor de insulina
IRS-1	Substrato de receptor de insulina
JNK	c-Jun-N-terminal quinase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MAPK	Proteína-quinases ativadas por mitógenos
MCP-1	Proteína quimioatraente para monócitos-1
Mi-RNA	Micro-RNA
MIF	Fator inibitório da migração de macrófagos
NF κ B	Fator nuclear kappa B
OMS	Organização Mundial da Saúde

PCR	Reação em cadeia polimerase
PDK-1	Quinase 1 dependente de fosfatidilinositol
POD	Peroxidase
PPAR	Receptores ativados pelo proliferador de peroxissomo
QV	Qualidade de vida
QVRS	Qualidade de vida relacionada à saúde
RANTES	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 5</i>
SF-36	Questionário genérico de qualidade de vida - <i>Short-Form Health Survey</i>
T0	Tempo 0 (Baseline)
T12	12 meses de uso de <i>Chlorella</i>
T6	6 meses de uso de <i>Chlorella</i>
T1	1 mês de uso de <i>Chlorella</i>
TA	Temperatura ambiente
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
VEGF	Fator vascular endotelial
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
ω -3	ômega-3
ω -6	ômega-6

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1- Atividade adaptógena da alga <i>Chlorella</i>	16
1.2- Modulação da alga em mecanismos envolvidos na resistência à insulina	19
1.3- Qualidade de vida.....	22
1.4- Microbiota Intestinal	24
1.5- Glucagon e incretinas intestinais	25
1.6- Micro(mi)-RNAs circulantes.....	25
2. OBJETIVOS	26
3. METODOLOGIA	27
3.1. Perfil da população.....	26
3.2. Critérios de inclusão.....	29
3.3. Critérios de exclusão.....	29
3.4. Protocolo utilização da alga	29
3.5. Coleta de sangue periférico e fezes	30
3.6. Avaliação da qualidade de vida relacionada à saúde (QVRS)	30
3.7. Citocinas.....	31
3.8. Adipocinas	31
3.9. Dosagem de incretinas e glucagon	31
3.10. Microbiota intestinal	32
3.11. mi-RNA.....	33
3.11.1. Extração de mi-RNA de soro	33
3.11.2. Transcrição reversa do cDNA	34
3.11.3. PCR-Array.....	35
3.12. Parâmetros bioquímicos	35
3.12.1. Colesterol e frações, e níveis de triglicerídeos	35
3.12.2. Glicemia de jejum	36
3.12.3. Hemoglobina glicada (HbA1c)	36
3.12.4. Concentração de insulina	36
3.12.5. Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance	36
3.12.6. Quantificação de ácidos graxos livres	37
3.12.7. Quantificação de corpos cetônicos	37
3.13. Análise estatística.....	37
4. RESULTADOS	38
4.1. Avaliação da qualidade de vida relacionada à saúde (QVRS)	38
4.2. Níveis séricos de citocinas	40
4.3. Níveis séricos de adipocinas	41

4.4.	Níveis séricos de glucagon e incretinas intestinais	42
4.5.	Correlação entre SF-36 e níveis citocinas e adipocinas	43
4.6.	mi-RNA.....	45
4.7.	Microbiota Intestinal	45
4.8.	Parâmetros Bioquímicos	47
5.	DISCUSSÃO.....	48
6.	CONCLUSÃO.....	58
7.	REFERÊNCIAS	60
	ANEXOS	72
	Anexo 1.....	72
	Anexo 2.....	76
	Anexo 3.....	77
	Anexo 4.....	80

1. INTRODUÇÃO

As consequências humanas, sociais e econômicas relacionadas ao diabetes são devastadoras. A Sociedade Brasileira de Diabetes estima que uma epidemia de Diabetes esteja em curso, destacando a magnitude do problema. Em 1985, estimava-se haver 30 milhões de adultos com diabetes no mundo; esse número cresceu para 135 milhões em 1995, atingindo 173 milhões em 2002, com projeção de atingir 300 milhões em 2030 (1). A Organização Mundial da Saúde (OMS) (2) mostra números ainda mais alarmantes e estima que 347 milhões de pessoas sejam diabéticas em 2030 e esta será a sétima doença responsável por mortes. A Federação Internacional de Diabetes (3) estima que esse número já esteja perto dos 380 milhões de pessoas, além de nos trazer uma estatística sobre as pessoas intolerantes à glicose: 316 milhões de pessoas podendo aumentar para 471 milhões em 2035.

Um agravante neste quadro é o fato de que o tratamento farmacológico do diabetes tipo 2 (DM2), apesar de alguma eficácia em melhorar alguns parâmetros metabólicos, apresenta vários efeitos colaterais, que, em muitos casos, podem piorar as condições de saúde e qualidade de vida (4). Dentro desse contexto, produtos de origem natural vêm sendo considerados de importância estratégica na pesquisa de novas substâncias seguras e eficazes no tratamento de doenças relacionadas à resistência à insulina (5,6).

Resultados experimentais do nosso grupo (7–9) e da literatura (10–13), demonstram a capacidade da alga *Chlorella* de restabelecer a reposta normal do próprio hospedeiro capaz de inibir os mecanismos responsáveis pela indução de resistência à insulina, importante mecanismo fisiopatológico responsável pelo desenvolvimento da DM2, assim como pelo estabelecimento de todas as outras complicações adicionais produzidas pela doença (14–17). Ressaltamos ainda a ausência de toxicidade da alga, conforme relatado em estudo clínico após o uso de doses superiores a 20 gramas diárias por mais de dois anos (18,19).

1.1- Atividade adaptógena da alga *Chlorella*

A alga *Chlorella* é considerada um alimento completo, contendo todos os ingredientes necessários para promover a saúde. Os nutrientes estão presentes em forma equilibrada e incluem hidratos de carbono, proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, ácidos graxos essenciais [ômega-3 (ω -3) e ômega-6 (ω -6)], vitaminas, fibras dietéticas, fatores de crescimento e antioxidantes (luteína, α - e β -caroteno, ácido ascórbico e tocoferol) (7,20–22). É uma alga adaptógena, ou modificadora da resposta biológica, por sua habilidade de aumentar a resistência do hospedeiro frente a uma variedade de estresses físicos, ambientais e

psicogênicos, sem alterar as funções normais do organismo, além de restaurar a resposta imunológica e promover resistência não específica (23–25).

Resultados do nosso laboratório corroboram a capacidade adaptógena da *Chlorella* através da sua utilização em diferentes modelos experimentais *in vivo*, nos quais a hematopoese tem um papel fundamental na evolução da doença. Nestes estudos, observamos a capacidade da alga de restabelecer as defesas do próprio hospedeiro capazes de inibir processos malignos e infecciosos. Neste contexto, em enfoque pioneiro na literatura (26), estudamos os efeitos moduladores da alga nas seguintes condições experimentais: estresse agudo físico e psicogênico (26,27), exposição ao chumbo (28–30), infecção (26,31,32) e tumor (33,34). Um aspecto revelador desses resultados foi o fato da modulação hematopoética produzida pela alga na condição de estresse agudo (27,35) ter sido reproduzida nos outros modelos experimentais mais agressivos, apresentando peculiaridades de acordo com o sistema do organismo envolvido e o grau de estresse inerente de cada modelo (28,31,33). Outro aspecto importante dos nossos resultados, o que corrobora os efeitos adaptogênicos atribuídos à alga, consiste na sua capacidade de modular a resposta deficiente do organismo frente a diferentes tipos de estresse, sem alterar as funções do hospedeiro normal. Estes estudos demonstram de forma consistente que a estimulação do *pool* de células-tronco hematopoéticas da medula óssea e a modulação da resposta de leucócitos maduros consistem em aspectos importantes dos efeitos moduladores da alga no sistema imunoematopoético. Recuperação significativa do número reduzido de precursores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM), em consequência da liberação de citocinas biologicamente ativas, foi observada em todas as condições estudadas. Estes resultados indicam que a *Chlorella* regula a produção de fatores estimuladores de colônias, do mesmo modo que restaura CFU-GM, levando, assim, à produção adequada e mobilização eficaz de células hematopoéticas primitivas, cruciais para o desenvolvimento da vigilância e das funções efetoras do sistema imunológico (27,28,31,33,35).

Outro resultado pioneiro e relevante do nosso estudo foi a capacidade da alga de prevenir o aparecimento de hematopoese extramedular (HEM) esplênica no animal obeso (8), assim como em modelos de infecção (28) e tumor (33). Sabe-se que a migração, estabelecimento e proliferação de células hematopoéticas em tecidos extramedulares no animal adulto envolve alterações fisiopatológicas nas células tronco-hematopoéticas, matriz extracelular, células estromais, citocinas locais e sistêmicas, sendo que as principais causas destas alterações no comportamento da célula-tronco hematopoética e no seu microambiente

consistem em: falência severa da medula óssea, mieloestimulação, inflamação e injúria tecidual, e produção anormal de citocinas (36). Um aspecto importante da prevenção produzida pela alga na HEM esplênica é que este efeito modulador ocorre concomitantemente à recuperação para **valores normais** do número de CFU-GM na medula óssea, os quais estão reduzidos nos animais obesos, portadores de infecção ou de tumor (8,26,28,33). Um achado relevante é que a capacidade de alga de produzir cura, prolongar a sobrevivência ou normalizar as condições bioquímicas e metabólicas foi proporcional ao grau de reversão da HEM, o que indica que este efeito modulador da alga é importante para a sua atividade terapêutica (8,28,33).

Achados reveladores sobre a capacidade adaptogênica da *Chlorella* foram também obtidos em nossos estudos sobre os efeitos moduladores sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias: IFN- γ , IL-1, IL-6, fator de necrose tumoral (TNF)- α e anti-inflamatória (IL-10). Nos modelos representativos de **imunossupressão** [estresse agudo (27), infecção (37), tumor (34) e exposição ao chumbo (30)], o tratamento com a alga produziu ativação adicional nos níveis já aumentados das citocinas pró-inflamatórias, ao mesmo tempo em que restaurou para valores normais os níveis aumentados de IL-10. Nesse contexto de imunossupressão, a seleção pela *Chlorella* do padrão de resposta adaptativa Th1 é importante, uma vez que este é o principal mecanismo que rege a recuperação do hospedeiro imunossuprimido (38). Por outro lado, no modelo de obesidade, representativo de um quadro de **inflamação crônica**, o tratamento com a alga reduziu para valores normais os níveis aumentados das citocinas pró-inflamatórias e restaurou para os níveis do controle normal a produção reduzida da citocina imunossupressora IL-10 (9).

Corroboram ainda a atividade adaptógena da alga os nossos estudos sobre a sua capacidade quelante observada em animais expostos ao chumbo. Além da modulação na atividade imunoematopoiética observada em todos os modelos experimentais estudados em nosso laboratório (8, 25-37), o tratamento com a alga de animais expostos ao chumbo reduziu também os níveis do metal no sangue, ossos, rins e fígado, restaurou os níveis hepáticos de 5-ácido aminolevulínico (ALA), reduziu de forma significativa os níveis elevados de ALA no plasma e recuperou parcialmente a capacidade do fígado para produzir porfirinas (29).

Em conjunto, esses resultados mostram que a capacidade da *Chlorella* de reverter os efeitos deletérios produzidos por diferentes tipos de estresse sobre o *pool* de células da medula óssea e do estroma medular é dependente da sua ação moduladora sobre a produção de citocinas hematopoiéticas e citocinas pró- e anti- inflamatórias, assim como da sua

capacidade de prevenir a migração de progenitores hematopoéticos da medula óssea para o baço (HEM), mecanismos fundamentais para a produção do seu efeito terapêutico. Coletivamente, nossos resultados sugerem que a desregulação imunohematopoética induzida por diferentes tipos de estresse pode ser um mecanismo central subjacente a um conjunto diversificado e abrangente de doenças.

1.2- Modulação da alga em mecanismos envolvidos na resistência à insulina

A resistência à insulina é um importante mecanismo fisiopatológico que predispõe a progressão da obesidade para DM2, assim como todas as outras complicações adicionais produzidas pela doença (14–17). A insulina é essencial no processo metabólico, principalmente através do aumento da absorção de glicose no músculo e tecido adiposo e da inibição da saída de glicose hepática. Além disso, em condições fisiológicas, a insulina estimula a lipogênese, a síntese proteica e de glicogênio, e inibe a lipólise, glicogenólise e degradação de proteínas (39,40). Em consequência, a resistência à insulina promove profunda desregulação nestes processos, o que por sua vez resulta em níveis mais elevados de glicose e lipídeos na circulação (39).

Os possíveis benefícios da *Chlorella* no DM2 estão relacionados a estudos experimentais e clínicos da literatura e do nosso laboratório que demonstram a capacidade da alga de modular importantes mecanismos subjacentes ao processo de indução de resistência à insulina. Nesse contexto, estudos pioneiros do nosso laboratório (7) demonstraram que a capacidade da alga de prevenir a resistência à insulina em animais obesos, como demonstrado pelo aumento da sensibilidade à glicose e à insulina, é em parte devido à melhoria da via de sinalização da insulina no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, através do aumento dos níveis de fosforilação de proteínas, tais como IR, IRS-1 e Akt e redução dos níveis de fosforilação do IRS-1^{ser307}. Nossos resultados corroboram estudo da literatura (10) que relatam a capacidade da *Chlorella* de induzir o aumento nos níveis do transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4) em animais obesos. Sabe-se que a ativação das vias de sinalização da insulina induz ao aumento na translocação de GLUT-4 para a membrana, com consequente aumento no influxo de glicose para o fígado e músculos. Neste contexto, na busca de marcadores de resistência à insulina, estudos recomendam a utilização de níveis de fosforilação de IRS-1 no resíduo de serina 307 (IRS-1^{ser307}) em roedores, e no resíduo de serina 312 (IRS-1^{ser312}) em humanos (15,16,41).

A resistência à insulina é frequentemente relacionada com dislipidemia (40), que é caracterizada pelo aumento de triglicérides e nos níveis de colesterol (42). A este respeito, modulação importante observada em nossos estudos foi a capacidade da *Chlorella* de restaurar aos níveis normais as concentrações aumentadas de triglicérides, colesterol total, frações de colesterol e de ácidos graxos livres, observadas nos animais obesos (7). Em estudo recente, Noguchi et al (13) observaram que, no animal obeso, um dos mecanismos envolvidos nos efeitos hipoinsulinêmicos da *Chlorella* está relacionado à sua capacidade de reduzir a hipertrofia do tecido adiposo e modular a secreção de adipocina. Estes achados são consistentes com estudos anteriores que mostram que a administração de *Chlorella* diminui a absorção de gordura, promove a sua excreção intestinal e reduz a síntese de ácidos graxos livres (11,43–46). Portanto, um possível mecanismo subjacente à restauração da via de sinalização da insulina e consequente redução de tolerância à glicose, observada em nosso estudo, pode estar relacionado à redução na absorção e aumento na taxa de excreção de lipídios, e consequente redução da concentração de lipídios no músculo e no fígado. A diminuição potencial de lipídios no fígado e no músculo é corroborada pela diminuição da fosforilação do IRS-1^{ser307}. Além disso, a *Chlorella* contém ácidos graxos poli-insaturados, como ω -3, os quais exercem efeitos anti-inflamatórios e melhoram a sensibilidade à insulina, promovendo a regulação de genes implicados no transporte de glicose e de sinalização da insulina no tecido adiposo e fígado (47). Outro aspecto importante na composição da *Chlorella* é a presença na proporção ideal de ácidos graxos poli-insaturados, ou seja, a proporção de ω -6 e ω -3 é de 1,34:1, importante para reduzir o risco de doenças crônicas (48). Em conjunto, estes dados sugerem que a *Chlorella* age aumentando a sensibilidade à insulina nos principais tecidos alvo e, assim, impede os efeitos deletérios sobre as suas vias de sinalização. Outro efeito relevante observado em nossos estudos (7) foi a capacidade da *Chlorella* de prevenir a hiperglicemia desenvolvida em animais obesos. Nossos achados corroboram estudos da literatura que relatam a atividade estimuladora da alga sobre os receptores ativados pelo proliferador de peroxissomo α/γ (PPAR), conhecido por regular os níveis de glicose e de insulina e reduzir a hiperlipidemia. Além disso, o aumento pela alga da expressão de GLUT-4 (10) também permite o influxo de glicose no fígado e músculo.

Atualmente sabe-se que a gênese da resistência à insulina é inflamatória, sendo o sistema imunológico um elo importante entre obesidade e DM2 (16). Pacientes com DM2 apresentam aumento nos níveis circulatórios de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8, proteína quimioatrativa de macrófagos (MCP)-1, RANTES (*Chemokine (C-C motif) ligand 5*),

resistina e leptina, que estão diretamente relacionados ao menor influxo de glicose para os tecidos (15,49). Com a elevação das quimiocinas MCP-1 e RANTES no diabetes, há o aumento na expressão de seus receptores CCR2 e CCR5, respectivamente, relacionados com a quimiotaxia de leucócitos (50,51). Além disso, o aumento de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas levam a ativação das vias reguladoras da inflamação, incluindo JNK e NF- κ B (52). A situação de perda da homeostase é agravada pela redução nos níveis séricos de IL-10, adiponectina e a visfatina, fatores que trabalhariam em prol do metabolismo glicêmico adequado, pois possuem a capacidade de sensibilizar o organismo frente à ação da insulina (53).

Conforme mencionado anteriormente (pg. 16, § 1), um dos mecanismos de ação relevantes relacionado com os efeitos terapêuticos da alga diz respeito à sua capacidade de modular a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias, de acordo com as necessidades do organismo. Neste sentido, resultados dos nossos estudos demonstram de forma pioneira que em quadros de imunossupressão a alga potencializa o aumento na produção das citocinas pró-inflamatórias e restaura à normalidade os níveis aumentados de IL-10, permitindo assim a seleção do padrão de resposta adaptativa Th1 *versus* Th2, o qual consiste no principal mecanismo que rege a resolução de processos patogênicos no quadro de imunossupressão (32,34). Por outro lado, em quadros de inflamação crônica, como é o caso da obesidade (53,54), o tratamento com a alga restaurou para valores normais os níveis aumentados das citocinas pró-inflamatórias, assim como os níveis reduzidos da citocina anti-inflamatória IL-10, restaurando a homeostase (9).

Estudo pioneiro recente (55) utilizando o modelo murino db/db para DM2, demonstrou um recrutamento pronunciado de macrófagos pró-inflamatórios nas ilhotas pancreáticas dos animais diabéticos, os quais produzem níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, a imunidade inata evolui paralelamente ao DM2, passando de um estágio pró-inflamatório inicial para um fenótipo pró-fibrótico, dando suporte ao conceito de que a DM2 é uma doença inflamatória. Níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de populações de leucócitos foram também observados em pacientes com DM2 (16). O mecanismo de recrutamento e acúmulo de macrófagos pró-inflamatórios é uma característica comum na obesidade humana e experimental, sendo um fator responsável por grande parte das complicações produzidas pela doença (56–58). Neste contexto, de grande relevância são os nossos resultados mencionados anteriormente, que demonstram a migração

de progenitores de granulócitos e macrófagos da medula óssea para o baço (HEM) em animais obesos, e a inibição deste processo pela administração da alga *Chlorella* (8).

1.3- Qualidade de Vida

A DM2 está relacionada com a alta mortalidade, morbidades, mau estado geral e perda na qualidade de vida dos pacientes (59). Há muito tempo suspeita-se que o estresse emocional tem efeitos importantes sobre o desenvolvimento do DM2. Mais de 400 anos atrás, o famoso médico inglês Thomas Willis (1621-1675) observou que o diabetes geralmente surge entre pessoas que tenham experimentado estresses significativos em suas vidas (60). Um dos primeiros estudos sistemáticos que testaram a hipótese de Willis foi descrito em 1935, pelo psiquiatra americano Dr. W. Menninger, que postulou a existência de diabetes psicogênica e descreveu uma "personalidade de diabético" (61). Quase trinta anos depois, P.F. Slawson et al, descreveram no "*Journal of the American Medical Association*" que 80% de um grupo de 25 pacientes adultos com diabetes apresentaram história de estresse, principalmente em termos de perdas, 1-48 meses antes do aparecimento da diabetes (62). Pacientes com DM2 também apresentam um nível de risco dobrado para a depressão comórbida em comparação com controles saudáveis, prejudicando a qualidade de vida dos pacientes (63,64). Além disso, um número considerável de pacientes deprimidos sofre com altos níveis de estresse emocional específico para o diabetes (65,66). Mais recentemente, um grande número de estudos foram realizados, elucidando o papel do estresse emocional como importante fator de risco para o desenvolvimento de DM2. A maioria desses estudos foca na depressão. No entanto, um número crescente de evidências indicam que outras formas de estresse emocional contribuem para o desenvolvimento de DM2 (67).

O termo qualidade de vida é de difícil conceituação, uma vez que tem caráter subjetivo, complexo e com várias dimensões, que pode ter diferentes significados dependendo da época, do indivíduo e como este está inserido na sociedade. Após longos encontros com especialistas, a OMS define qualidade de vida como "*a percepção do indivíduo de sua posição na vida no contexto da cultura e sistema de valores nos quais ele vive e em relação aos seus objetivos, expectativas, padrões e preocupações*" (68). Com o aumento da expectativa de vida da população, a preocupação relacionada à qualidade de vida vem aumentando, no sentido de valorizar parâmetros mais amplos que o controle de sintomas e diminuição da mortalidade (69).

Importante notar que algumas das doenças apresentam manejo mais complexo que outras. No caso do diabetes, a doença afeta a vida profissional, as relações interpessoais, as atividades sociais dos pacientes, de tal maneira que o estado físico e mental pode ser comprometido com as necessidades de seguir os protocolos de tratamento e a preocupação com complicações decorrentes da doença (70). Os pacientes devem se adequar à doença, promovendo alterações nos hábitos, na alimentação e na atividade física. A necessidade de mudança de estilo de vida pode impactar negativamente da qualidade de vida e na motivação do paciente em prosseguir com o tratamento de longo prazo (71).

Já foi demonstrado pela literatura que pacientes DM2 apresentam risco dobrado para a depressão comórbida em comparação com controles saudáveis (64,72), levando a perda da qualidade de vida (72). Esses quadros exigem acompanhamento psicológico, tanto em pacientes idosos quanto em mais jovens (73). Muitos pacientes associam isso às restrições alimentares, necessidade de mudança de estilo de vida e compromissos com os cuidados à saúde (74). Nos pacientes diabéticos, sabe-se também que a qualidade de vida é determinada por vários fatores, como tipo de diabetes, uso de insulina, idade, complicações, nível social, fatores psicológicos, etnias, educação, conhecimento sobre a doença, tipo de assistência, entre outros (75).

Os métodos que avaliam a qualidade de vida relacionada à saúde (QVRS) tem sido muito utilizados, pois abordam questões que vão além de intervenções tradicionais que se concentraram nos marcadores sintomáticos e fisiológicos da doença, mas tentam compreender como os tratamentos podem melhorar o estado funcional e o bem-estar do paciente (76). Existem escalas de avaliação de qualidade de vida (QV) genéricas e específicas. As escalas genéricas de avaliação de QV são multidimensionais e foram desenvolvidas para avaliar o impacto causado por uma doença, sob diferentes aspectos (capacidade funcional, aspectos físicos, dor, estado geral de saúde, vitalidade, aspectos sociais, aspectos emocionais e saúde mental) (75). As escalas específicas, também são multidimensionais e avaliam a percepção geral da QV, mas buscam coletar informações mais específicas de uma dada doença, seja sobre sintomas, incapacidades ou limitações relacionadas a determinada enfermidade.

Melhorar a qualidade de vida tem sido uns dos principais objetivos no tratamento da diabetes por muitos anos. A qualidade de vida no curso da doença em pacientes diabéticos é considerada como um indicador importante e mostra o bem-estar do paciente (70). Alguns

estudos da literatura apontam para os efeitos da *Chlorella* na qualidade de vida em diferentes casos clínicos (77–79), mas nenhum foi realizado com pacientes DM2 e IG.

1.4- Microbiota Intestinal

Estudos na literatura demonstram a presença de alterações na microbiota intestinal em pacientes com DM2, o que pode estar relacionado com o processo de inflamação crônica presente na doença (80–82) e com o desenvolvimento de resistência à insulina e comorbidades relacionadas (81,83). Em mamíferos, as principais bactérias existentes na microbiota intestinal fazem parte dos grupos de *Firmicutes*, *Actinobacteria* (gram-positivas) e *Bacteroidetes* (gram-negativas) (83). No hospedeiro normal, estas bactérias vivem em uma relação de simbiose, degradando alimentos não digeríveis pelos mamíferos, favorecendo a homeostase intestinal, a resposta imunológica e a regulação energética (83–85). Estudos recentes demonstram que desequilíbrio na microbiota (disbiose) pode ser significativo no DM2 (82,86,87) e apontam para uma redução nas proporções de Firmicutes e aumento na de Bacteroides. Estes resultados abrem caminho para a utilização da microbiota intestinal para o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico, terapia e profilaxia para o diabetes e outras doenças metabólicas (83,88,89).

Outro fato relevante é que alterações negativas na microbiota podem estar associadas ao quadro de estresse crônico observado no DM2, podendo ser este um fator que desencadeie a alteração do comportamento alimentar (90). Epel e colaboradores (91) realizaram um estudo em mulheres e observaram que a procura por alimentos mais calóricos estava relacionada positivamente com o grau de estresse e com o aumento nas taxas de cortisol dosadas a partir da saliva e, conseqüentemente com alterações na microbiota. É importante lembrar que o DM2 está relacionado com estilo de vida e hábito alimentar.

Neste contexto, um dos efeitos relatados de forma consistente para a *Chlorella* é a sua capacidade de melhorar a função intestinal, absorver substâncias tóxicas e promover o peristaltismo normal (92–95). Estes efeitos moduladores da alga devem estar relacionados, em grande parte, à sua rica composição em fibras solúveis em água, proteínas e antioxidantes (96,97). Além disso, os efeitos anti-inflamatórios da alga (7,98–100) contribuem para o desenvolvimento da flora amigável do intestino (101).

1.5- Glucagon e incretinas intestinais

O glucagon é um hormônio com efeitos contrários ao da insulina, secretado pelo pâncreas de acordo com as necessidades do organismo, cujos níveis estão aumentados no DM2 (102,103). Evidências indicam que o glucagon desempenha papel importante na anormalidade de produção e homeostase glicêmica. Fisiologicamente, o controle glicêmico ocorre pela interação entre a insulina, liberada em situação pós-prandial, e o glucagon, necessário para que a glicemia seja mantida a partir de reservas energéticas no jejum. No DM2, a presença constante do glucagon na circulação estimula o fígado a manter a gliconeogênese, liberando glicose na circulação a partir de glicogênio e, por conseguinte, agravando o quadro de hiperglicemia do paciente diabético (102,103). Enquanto que nenhum tratamento para DM2 utiliza a sinalização do glucagon como alvo específico, os novos agentes terapêuticos para o DM2 promovem a redução da concentração plasmática de glucagon (103). Estes agentes – os agonistas das incretinas intestinais: peptídeo 1 tipo glucagon (GLP-1) e polipeptídeo inibidor gástrico (GIP), e os inibidores de dipeptidil peptidase-4 (DPP-4) – têm como alvo específico o GLP-1, GIP e a DPP-4. O GLP-1 e GIP são incretinas intestinais com a capacidade de suprimi-RNA a secreção de glucagon, enquanto que o DPP-4 é uma enzima que rapidamente inativa as incretinas intestinais. A inibição da DPP-4 leva ao aumento da concentração de GLP-1, com consequente redução das concentrações de glucagon, contribuindo assim para o controle glicêmico adequado (102–105). Além deste efeito, as incretinas intestinais estão associadas com a estimulação da secreção de insulina, melhoria na sensibilidade à insulina e proteção de células β pancreáticas contra apoptose (106). Neste contexto, o efeito modulador da *Chlorella* nos níveis de glucagon foi demonstrado em animais diabéticos que tiveram sua dieta suplementada com 3% ou 5% de *Chlorella*. Os resultados mostraram que a alga foi capaz de reduzir os níveis de glucagon no jejum de forma semelhante ao exendin-4, um agonista de receptores de GLP-1 resistente a enzima DPP-4 (107). Esses resultados apoiam a ideia de que a ingestão de *Chlorella* traz benefícios à saúde de pacientes com DM2 pela diminuição da concentração de glucagon.

1.6- Micro(mi)-RNAs circulantes

Os mi-RNAs são pequenas moléculas de RNA não-codificantes que funcionam como reguladores em nível transcricional e pós-transcricional da expressão de genes envolvidos em grande número de processos biológicos, incluindo o metabolismo lipídico (108). Níveis

plasmáticos aumentados de mi-RNA 375 e níveis plasmáticos reduzidos de mi-RNA 126 estão relacionados com o desenvolvimento do DM2 e seu agravamento (108–110). Mi-RNA 375 é um importante mi-RNA não codificante que é especificamente expresso pelas células pancreáticas (111). Este mi-RNA é necessário para a gênese normal das células β e α pancreáticas. A superexpressão de mi-RNA 375 reduz a secreção de insulina por inibir a expressão da miotrofina (uma proteína citoplasmática que induz a exocitose de grânulos de insulina), suprime o PDK-1 (proteína que participa da ativação do Akt, via ativação do IR) e também por atenuar genes da transcrição de insulina. A elevação do nível plasmático do mi-RNA 375 poderia ser um reflexo do nível mais alto nas ilhotas (112,113). Já o mi-RNA 126 é expresso por células endoteliais, nas quais contribui para a manutenção e integridade vascular, angiogênese e reparação de feridas através da regulação de diversos componentes da VEGF (fator vascular endotelial). Já foi demonstrado que redução dos níveis plasmáticos de mi-RNA 126 está fortemente relacionado com doença coronariana associado ao diabetes, sugerindo que a concentração plasmática poderia ser um bom biomarcador para o início de complicações vasculares do diabetes. Diversos autores verificaram que pacientes DM2 e IG tem níveis reduzidos desse mi-RNA (114,115). Recentemente, estratégias para reduzir mi-RNA 375 e aumentar mi-RNA 126 têm sido sugeridas como alvos terapêuticos no DM2 (109).

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar atividade moduladora da alga *Chlorella* nos seguintes parâmetros de pacientes com intolerância à glicose e diabetes tipo 2:

- Qualidade de vida Relacionada à Saúde (QVRS)
- Citocinas, adipocinas e outros mediadores
- Microbiota intestinal
- mi-RNA 375 e mi-RNA 126
- Parâmetros metabólicos

3. METODOLOGIA

3.1. Perfil da população

Os indivíduos do grupo de diabetes do Centro de Saúde da Comunidade (CECOM) da UNICAMP foram convidados a participar do estudo após a realização de palestra, onde foram abordados os objetivos do estudo, modo de uso da *Chlorella*, possíveis benefícios e efeitos colaterais. Após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1) e preenchimento do Questionário Informativo dos Participantes, foram agendadas as coletas de sangue, fezes e urina. Esse procedimento foi realizado pela equipe multidisciplinar do CECOM, de acordo com os protocolos já estabelecidos (Aprovação do Comitê de ética - CAAE 30981114.4.0000.5404 – Anexo 2).

Conforme demonstrado na Tabela 1, o grupo DM2 consistiu em 25 indivíduos (5 do sexo masculino e 20 do sexo feminino), com idade entre 36-71 anos (58 ± 9). Com relação ao IMC, 4 (16%) indivíduos estão com Índice De Massa Corpórea (IMC) abaixo de 25 indicando peso normal, e 21 (84%) indivíduos encontram-se com IMC acima de 25, indicando sobrepeso ou obesidade. Quatorze (56%) são funcionários regulares da UNICAMP e 11 (44%) são aposentados. Dezesesseis (64%) relataram a prática de exercícios físicos pelo menos 2 vezes por semana e 9 (36%) são sedentários. Destes, 5 são fumantes (20%), 13 não fumantes (52%) e 7 são ex-fumantes (28%). Para o tratamento do diabetes, 10 (40%) indivíduos utilizam apenas metformina no esquema terapêutico; 8 (32%) indivíduos utilizam metformina associado outra droga hipoglicemiante, como gliclazida, ou glibenclamida, ou sitagliptina; e 7 (28%) indivíduos utilizam insulina regular associada a metformina. Hipertensos controlados representam 68% (17 indivíduos) do grupo DM2 e 11 indivíduos (44%) utilizam estatinas para o controle de colesterol.

O grupo IG consistiu em 20 indivíduos (12 homens e 8 mulheres), com idade entre 33 e 73 anos (53 ± 10). Com relação ao IMC, 2 (10%) indivíduos estão com IMC abaixo de 25 indicando peso normal, e 18 (90%) indivíduos encontram-se com IMC acima de 25, indicando sobrepeso ou obesidade. Dezesete (85%) são funcionários regulares da UNICAMP e 3 (15%) são aposentados. Dez (50%) relataram a prática do exercício físico pelo menos duas vezes por semana e 10 (50%) são sedentárias. Seis (30%) são fumantes, 8 (40%) não fumantes e 6 são ex-fumantes (30%). Para o controle da glicemia, 4 (20%) indivíduos mudaram o estilo de vida, com maior prática de exercícios físicos e dieta, sem a utilização de nenhum medicamento para controlar a doença; 14 (70%) indivíduos utilizam apenas metformina; e outros 2 (10%) indivíduos utilizam metformina associado a glibenclamida para o controle da

glicemia. Hipertensos controlados representam 45% (9 indivíduos) do grupo IG e 4 indivíduos (20%) utilizam estatinas para o controle de colesterol.

O grupo de CT é composto por 23 indivíduos (3 do sexo masculino e 20 do sexo feminino), com idade entre 21 e 58 anos (41 ± 12). Com relação ao IMC, 6 (26%) indivíduos estão com IMC abaixo de 25 indicando peso normal, e 17 (74%) indivíduos encontram-se com IMC acima de 25, indicando sobrepeso ou obesidade. Todos os voluntários do grupo CT são funcionários regulares da UNICAMP. Quinze (75%) relataram a prática do exercício físico pelo menos duas vezes por semana e 5 (25%) são sedentários. Quatro (17%) são fumantes, 15 (66%) não fumantes e 4 (17%) é um ex-fumante. Nenhum indivíduo utiliza medicamentos hipoglicemiantes; ninguém apresenta hipertensão e apenas 1 (4%) utiliza estatina para o controle de colesterol.

Tabela 1: Perfil da população dos grupos DM2, IG e CT.

		DM2 n=25		IG n=20		CT n=23	
		Frequência	%	Frequência	%	Frequência	%
Gênero	Masculino	5	20	12	60	3	13
	Feminino	20	80	8	40	20	87
Idade	≤ 60 anos	13	52	16	80	100	100
	< 60 anos	12	48	4	20	0	9
IMC (Kg/m ²)	≤ 25	4	16	2	10	6	26
	< 25	21	84	18	90	17	74
Ocupação	Funcionário regular	14	56	17	85	23	100
	Aposentado	11	44	3	15	0	0
Atividade física	Ativos	16	64	10	50	15	65
	Sedentários	9	36	10	50	7	35
Tabagismo	Fumantes	5	20	6	30	4	17
	Não fumantes	13	52	8	40	15	66
	Ex-fumantes	7	28	6	30	4	17
Tipo de tratamento	Nenhum	0	0	4	20	23	100
	Metformina	10	40	14	70	0	0
	Metformina+ outro	8	32	2	10	0	0
	Insulina + metformina	7	28	0	0	0	0
Hipertensão	Sim	17	68	9	45	0	0
	Não	8	32	12	60	0	0
Dislipidemia	Sim	11	44	4	20	1	4
	Não	14	56	17	85	22	96

No grupo controle foram realizados apenas testes bioquímicos e realizado QVRS.

3.2. *Critérios de inclusão*

Indivíduos com IG e DM2. A classificação diagnóstica de pacientes IG e DM2 foi realizada previamente pelos médicos do CECOM, segundo as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes e Endocrinologia (1), conforme a seguir.

Critérios de diagnóstico para definição de DM2:

- a. Sintomas de poliúria, polidipsia e perda ponderal de peso acrescidos de glicemia casual (a qualquer hora do dia) <200 mg/dl;
- b. Glicemia de jejum alterada ≥ 126 mg/dl;
- c. Teste oral de tolerância à glicose (TOTG), realizado 2 horas após a sobrecarga com 75g de glicose ≥ 200 mg/dl.

Critérios para definição de intolerância à glicose:

- a. Glicemia de jejum alterada inferiores ao critério diagnóstico para diabetes, porém mais elevadas que o valor de referência normal (<100 a <126 mg/dl);
- b. TOTG ≥ 140 a < 200 mg/dl.

Conforme recomendação do Comitê de Ética, durante o período de estudo, os participantes foram concomitantemente tratados de suas condições clínicas de acordo com as diretrizes-padrão, sobretudo no que diz respeito DM2 e IG, e não houve qualquer modificação da conduta clínica decorrente da participação no estudo. Também vale salientar que os indivíduos que participaram do estudo estavam tomando a medicação recomendada pelo clínico do CECOM há mais de 12 meses.

3.3. *Critérios de exclusão*

Apresentar doenças psiquiátricas severas, câncer, nefropatia, cardiopatias e/ou doenças pulmonares avançadas, histórico de abuso de drogas e/ou álcool, pressão arterial descompensada (sistólica ≥ 160 mmHg), diagnóstico de diabetes do tipo 1.

3.4. *Protocolo utilização da alga*

A alga *Chlorella* (*Parachlorella beyerinckii* CK-5), foi gentilmente cedida pelo *Research Laboratories, Chlorella Industry Co. Ltd.*, Fukuoka, Japão. Duas doses de *Chlorella* foram utilizadas neste estudo. Nos 6 primeiros meses, 8 comprimidos (1,6g) e nos 6 meses finais, 15 comprimidos (3g) de *Chlorella* foram ingeridos com água diariamente por cada voluntário durante o café da manhã. As avaliações clínicas foram realizadas no início do estudo (T0) e 6 (T6) e 12 (T12) meses após a ingestão da alga. Para a avaliação da microbiota

intestinal, as coletas de fezes foram realizadas antes do início do estudo (T0) e 1 mês (T1) após o início da ingestão de 3g de *Chlorella*/ dia.

3.5. *Coleta de sangue periférico e fezes*

O sangue periférico foi coletado em tubo seco para obtenção do soro, tubo com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para realização de hemograma, tubo com citrato para quantificação de glicemia de jejum. O soro foi congelado em -20°C para realização posterior dos parâmetros bioquímicos, metabólicos e inflamatórios. A coleta de fezes para o estudo da microbiota intestinal foi realizada contando com a facilidade de um protetor de assento estéril (Coloff® cat. nº 1001-CO) e frasco contendo líquido estabilizador de DNA de fezes (Stratec Biomedical cat. nº 1038111300). O propósito de coleta diferenciada é obtenção de DNA bacteriano íntegro de alta qualidade e evitar contaminação. Os pacientes foram orientados a urinar imediatamente antes da coleta das fezes para minimizar a contaminação, encaixar o protetor de assento estéril no assento do vaso sanitário, sentar-se no assento sanitário e, após evacuação (as fezes ficam retidas no protetor), transferir uma pequena quantidade de fezes para o frasco contendo o líquido estabilizador de DNA. Ao final, foram orientados a tampar bem, proteger com folha de papel alumínio, manter em temperatura ambiente (TA) e entregar a amostra no dia seguinte no CECOM.

3.6. *Avaliação da qualidade de vida relacionada à saúde (QVRS)*

A avaliação da qualidade de vida foi realizada com a utilização do questionário *Short-Form Health Survey* (SF-36) (Anexo 3). Formado por 36 questões, que abrangem 8 domínios, cada domínio avalia: (93; 162-163).

- **Capacidade Funcional:** limitação devido a saúde física em todas as atividades diárias, desde as mais rigorosas às mais simples;
- **Aspectos físicos:** problemas no trabalho e outras atividades devido a saúde física;
- **Dor:** presença ou ausência de dor incapacitante;
- **Estado geral de saúde:** percepção do indivíduo quanto à sua saúde;
- **Vitalidade:** presença ou ausência de fadiga;
- **Aspectos sociais:** interferência da saúde física e emocional nas atividades sociais;
- **Aspectos emocionais:** problemas no trabalho e outras atividades devido a aspectos emocionais;
- **Saúde mental:** frequência de sentimentos como nervosismo, tristeza, paz e felicidade.

Cada dimensão é avaliada de modo independente e apresenta um escore que varia de 0 a 100, sendo 0 a representação do pior estado de saúde e 100, do melhor. Esse questionário enfatiza a percepção do indivíduo sobre sua saúde no período de 4 semanas anteriores ao momento da coleta de dados (163). O tempo aproximado para o que os pacientes preenchem o formulário é de 15 minutos, e foram realizados no T0, T6 e T12. O cálculo de cada escore segue procedimento padrão (Anexo 4).

3.7. Citocinas

Os níveis de IL-6 (BD - 555220), IL-1 β (R&D – DY201), IL-8 (R&D – DY208), MCP-1 (R&D – DY279), TNF- α (BD - 555212) e IL-10 (BD - 555157) foram determinados no soro dos voluntários pelo método de ELISA, utilizando-se kits comerciais. Resumidamente, placas de microtitulação foram revestidas com o anticorpo monoclonal de captura. Após 12 horas à TA as placas foram lavadas e incubadas por 1 hora, TA com solução de bloqueio contendo PBS e albumina sérica bovina. Após lavagem, as amostras (soro dos pacientes) e os padrões foram adicionados e a placa foi incubada por 2 horas, TA. O anticorpo monoclonal de detecção foi adicionado aos poços e deixado por 2 horas TA. Após incubação com avidina peroxidase durante 30 minutos, o substrato (H₂O₂ e TMB – tetrametilbenzidina) foi adicionado e uma coloração azul se desenvolveu dentro de um período de 20 minutos. A reação de coloração foi interrompida adicionando-se H₂SO₄ 2N e a leitura foi realizada em leitor de microplacas a 450nm. Os níveis dos fatores estudados foram calculados a partir dos valores de referência obtidos com uma curva padrão construída com concentrações conhecidas dos padrões, de acordo com instruções do fabricante.

3.8. Adipocinas

Os níveis de leptina (R&D – DY398), resistina (R&D – DY1359) e adiponectina (R&D – DY1065) foram determinados no soro dos voluntários pelo método de ELISA (conforme descrito no item 3.7), utilizando-se kits comerciais.

3.9. Dosagem de incretinas e glucagon

Para a quantificação de GLP-1 e GIP foram utilizados os kits comerciais EIA-GLP-1 e EIA-GIP da marca RayBiotech, respectivamente. Para glucagon, foi utilizado kit DY1249 da R&D. Todos os kits utilizam de método de ELISA, e dosam os parâmetros a partir do soro dos voluntários, conforme descrito no item 3.7.

3.10. *Microbiota intestinal*

Nesta avaliação fezes de 15 indivíduos do grupo DM2 foram estudadas. As amostras fecais foram coletadas na residência dos participantes. Após a entrega, foram mantidas sob refrigeração (7°C) por no máximo 24 horas antes da extração do DNA bacteriano. Para a extração do DNA bacteriano das fezes, utilizamos o kit PSP Spin Stool DNA plus (Strattec Biomedical cat. nº 1038110300), o qual garante maior aproveitamento e estabilidade da amostra. As sequências de *primers* utilizadas foram V3-341 (*TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG*) e V4-785(*GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACVGGGTATCTAATC* C), considerando que a região *Barcode, varia para cada amostra composta em uma corrida de sequenciamento. A sequência em itálico corresponde ao adaptador Nextera® transposase sequences A e B e a sequência em negrito correspondem aos iniciadores de ampla utilização 341F e 785F respectivamente.

A composição taxonômica das comunidades bacterianas foi obtida pela análise da região V3 E V4 do gene 16S rRNA usando a plataforma Illumina® MiSeq. As construções das bibliotecas de sequenciamento do DNA foram realizadas segundo instruções do fabricante (Illumina, San Diego, CA, USA) e seguiram o mesmo fluxo descrito por Caporaso et al. (2012). Usando leituras pareadas de 300 bp e reagentes MiSeq v3, as extremidades de cada leitura são sobrepostas para gerar leituras completas de alta qualidade da região V3 e V4. São geradas mais que 100.000 leituras por amostra, comumente reconhecidas como suficientes para pesquisas metagenômicas. O sequenciamento foi realizado antes e depois da utilização da alga.

Para a análise de bioinformática, as seguintes ferramentas foram utilizadas na análise:

- Avaliação de qualidade: FastQC
- Análise de microbioma: QIIME
- Identificação OTU (*pick_open_reference_otus*), com OTUs de referência Greengenes (versão 13.8)
 - Gráficos de diversidade: gráficos de barras de taxonomia, gráficos de PCoA, curvas de rarefação (*core_diversity_analyses*)
 - Gráficos Adicionais: RStudio
 - Heatmaps (*gplots*, *Heatplus*, *vegan*, *RColorBrewer*)
 - Dendrogramas (*lyr*, *ape*, *ggplots2*, *hclust*)

- Diagramas de Venn (spearcl, VennDiagram)

As seguintes métricas foram utilizadas para a diversidade alfa:

- chao1

Estima a riqueza da contagem de dados

- observado_otus

Calcula o número de OTUs distintas entre os grupos

- PD_whole_tree

Métrica quantitativa para estimar a diversidade filogenética entre os grupos

As seguintes métricas foram utilizadas para a diversidade beta:

- weighted_unifrac

Métrica quantitativa que avalia as diferenças entre as comunidades devido à abundância taxonômica

- unweighted_unifrac

Métrica qualitativa avaliando as diferenças entre as comunidades devido a fatores diferentes da abundância taxonômica. Com base na presença / ausência de táxons em amostras

3.11. *mi-RNA*

Nesta avaliação, 20 amostras do grupo DM2 e 20 amostras do grupo IG foram estudados.

3.11.1. Extração de mi-RNA de soro

Após a coleta de sangue dos pacientes e separação do soro, as amostras foram congeladas em -20° C até o momento da extração do mi-RNA. A extração foi realizada utilizando-se o kit mi-RNA easy Serum/Plasma (Qiagen, cat nº 217184) para soro ou plasma. Este kit combina a lise a base de fenol/guanidina das amostras e purificação à base de sílica de RNA total. O reagente, incluído no kit, é uma solução monofásica de fenol e guanidina tiocianato, concebido para facilitar a lise, desnaturar complexos de proteínas e RNases, e também para remover a maioria do DNA residual e proteínas da lisado por extração orgânica. As instruções do fabricante foram seguidas, conforme figura 1. Para controle de qualidade da etapa de extração, o *Spike-in-control* (mi-RNA-39) foi adicionado. A concentração e a pureza serão avaliadas utilizando-se o espectrofotômetro Nanodrop®.

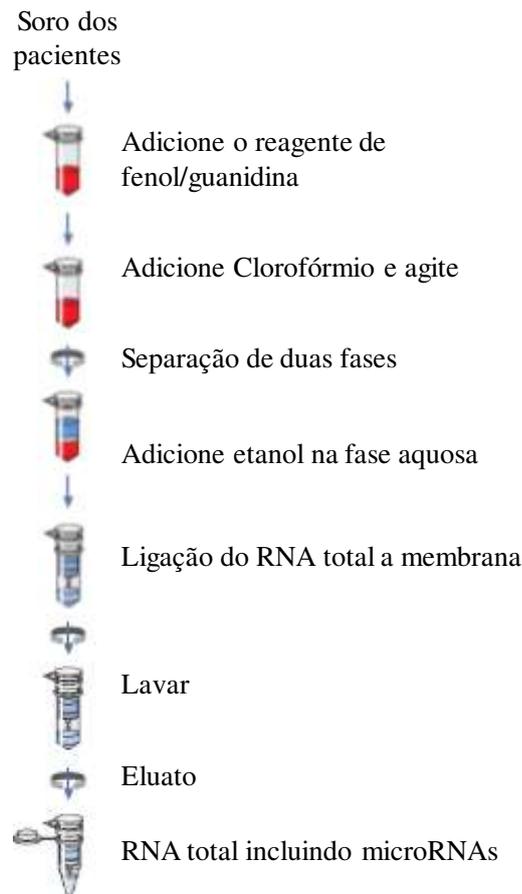


Figura 1: Esquema de procedimento de extração de RNA total. Adaptado do *handbook* do kit.

3.11.2. Transcrição reversa do cDNA

Para a transcrição reversa do RNA extraído na etapa anterior, utilizamos o kit miScript® II RT (Qiagen, cat nº 218161). Para a transcrição reversa utilizamos 100ng de RNA. Resumidamente, foi adicionado o volume correspondente de 100ng por amostra à eppendorf RNA-DNA *free*, em seguida foi adicionado 4 µL de 5x miScript HiSpec Buffer, 4 µL de mix de nucleotídeos, 2 µL miScript® mix de transcriptase reversa e água RNA-*free* volume suficiente para completar o volume de 20 µL de reação. Cada amostra foi incubada por 60 minutos a 37°C em banho seco, e em seguida a temperatura foi aumentada a 95°C para inativar o miScript® mix de transcriptase reversa. Em seguida as amostras foram mantidas em gelo até a utilização no PCR-array. A etapa de transcrição reversa sempre foi realizada no mesmo dia que em a placa de PCR-array era preparada para leitura.

3.11.3. PCR-Array

O mi-RNA-375 e mi-RNA-126 foram avaliados através do kit miScript® mi-RNA PCR Array (Qiagen, Valencia, CA, USA). Foi utilizado placa customizada com os mi-RNAs de interesse, com os controles de reação (extração, transcrição e da corrida de PCR) e mi-RNA endógenos. Conforme tabela 3.

Tabela 2: Desenho da placa de PCR-array para a pesquisa de mi-RNA 126 e mi-RNA 375.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	mir-126	mir-375	RNU6-P	SNORD61	SNORD68	SNORD72	SNORD95	SNORD96A	miRTC	mir-39	mir-39	PPC
B	mir-126	mir-375	RNU6-P	SNORD61	SNORD68	SNORD72	SNORD95	SNORD96A	miRTC	mir-39	mir-39	PPC
C	mir-126	mir-375	RNU6-P	SNORD61	SNORD68	SNORD72	SNORD95	SNORD96A	miRTC	mir-39	mir-39	PPC
D	mir-126	mir-375	RNU6-P	SNORD61	SNORD68	SNORD72	SNORD95	SNORD96A	miRTC	mir-39	mir-39	PPC
E	mir-126	mir-375	RNU6-P	SNORD61	SNORD68	SNORD72	SNORD95	SNORD96A	miRTC	mir-39	mir-39	PPC
F	mir-126	mir-375	RNU6-P	SNORD61	SNORD68	SNORD72	SNORD95	SNORD96A	miRTC	mir-39	mir-39	PPC
G	mir-126	mir-375	RNU6-P	SNORD61	SNORD68	SNORD72	SNORD95	SNORD96A	miRTC	mir-39	mir-39	PPC
H	mir-126	mir-375	RNU6-P	SNORD61	SNORD68	SNORD72	SNORD95	SNORD96A	miRTC	mir-39	mir-39	PPC

Ao cDNA obtido na etapa anterior foram adicionados 200 µL de água RNA-free para diluição adequada, conforme instruções do fabricante. Para cada amostra foi utilizado 1375 µL de 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 275 µL 10x miScript Universal, 1000 µL de água RNA-Free e 100 µL de amostra para compor a reação. As condições para a ciclagem foram 15 minutos a 95°C, 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 30 segundos a 70°C, durante 40 ciclos, em termociclador Applied Biosystems. Os dados foram analisados com *software* específico.

3.12. Parâmetros bioquímicos

3.12.1. Colesterol e frações, e níveis de triglicerídeos

As análises foram realizadas com kits colorimétricos comerciais (Labtest Diagnóstica, Minas Gerais). Todas são reações de ponto final com leitura da absorbância em comprimento de onda de 500 a 510 nm, exceto a determinação de LDL, a qual é caracterizada por duas fases. Na primeira, um surfactante específico presente no Reagente 1 solubiliza os quilomícrons, as HDL e as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). O colesterol solubilizado é consumido pela ação da colesterol esterase (CE) e colesterol oxidase (CO) resultando numa reação não formadora de cor. Na fase seguinte, um surfactante presente no Reagente 2 solubiliza o colesterol da LDL, o qual é hidrolisado pela CE a colesterol livre e

ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela CO. Em seguida, ocorre uma reação de acoplamento entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e disulfobutilmetatoluidina sódica (DSBmT), catalisada pela peroxidase, produzindo uma quinoneimina que tem máximo de absorvância em 546 nm. A intensidade da cor formada é diretamente proporcional à concentração do determinante na amostra.

3.12.2. Glicemia de jejum

Brevemente, a glicose oxidase (GOD) catalisa a oxidação da glicose para ácido glicônico e peróxido de hidrogenio. Através de uma reação oxidativa de acoplamento catalisada pela peroxidase (POD), o peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, formando um complexo de cor vermelha (quinoneimina), cuja absorvância medida em 500 nm, é diretamente proporcional à concentração de glicose na amostra.

3.12.3. Hemoglobina glicada (HbA1c)

A determinação da HbA1c foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A CLAE é uma metodologia de ponta padronizada para determinação de HbA1c e baseia-se na separação cromatográfica de alta eficiência da HbA1c utilizando como fase estacionária uma coluna de troca iônica onde o equipamento proporciona à coluna gradiente programado de tampão de força iônica crescente, sendo as Hbs separadas com base nas respectivas interações iônicas com o material da coluna (116,117).

3.12.4. Concentração de insulina

Foi realizada com kit comercial pelo método imunoenzimático (ELISA), conforme orientações do fabricante (descrito no item 3.7).

3.12.5. Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance

O *Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance* (HOMA- IR) é um modelo matemático que se baseia na interação da glicose com a insulina. Este índice indica o grau de combinação de uma dada hiperglicemia com concentrações basais de insulina baixa, normal e elevada (118). O HOMA- IR tem sido proposto como um método para avaliar a sensibilidade ou resistência à insulina e a função das células β , a partir das concentrações de insulina e glicose de jejum, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{insulina } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glicose (mmol/L)}}{22,5}$$

Os valores de HOMA-IR determinam a eficácia das concentrações de insulina de jejum em equilíbrio para regular a glicose sanguínea. Valores acima de 2,71 indicam um quadro de resistência à insulina (118).

3.12.6. Quantificação de ácidos graxos livres

Os níveis séricos de ácidos graxos livres (AGLs) foram analisados utilizando NEFA-kit-U (Wako químicos, Neuss, Alemanha) com ácido oleico como padrão, por método colorimétrico, seguindo as especificações do fabricante.

3.12.7. Quantificação de corpos cetônicos

A determinação de corpos cetônicos foi realizada utilizando o ensaio colorimétrico (Cayman Chemical Company, N°700190, Ann Arbor, MI, Estados Unidos) com β -hidroxibutirato como padrão, seguindo as especificações dos fabricantes.

3.13. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se GraphPad InStat5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Utilizou-se o *test t* pareado, não paramétrico, Wilcoxon, para as análises entre T0 e T1 (microbiota), T0 e T6, e T0 e T12. Para as análises de correlação foi utilizado Spearman. Todos os testes com significância de 95% ($P < 0,05$) foram considerados.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da qualidade de vida relacionada à saúde (QVRS)

No grupo DM2, em T6 e T12, foi observado melhora significativa ($P < 0.05$; t test) nos domínios **limitação por aspectos físicos, dor, estado geral da saúde, vitalidade, aspectos sociais e saúde mental** (Figura 2). Os escores para os domínios (média e desvio padrão) em T0, T6 e T12 estão na tabela 3.

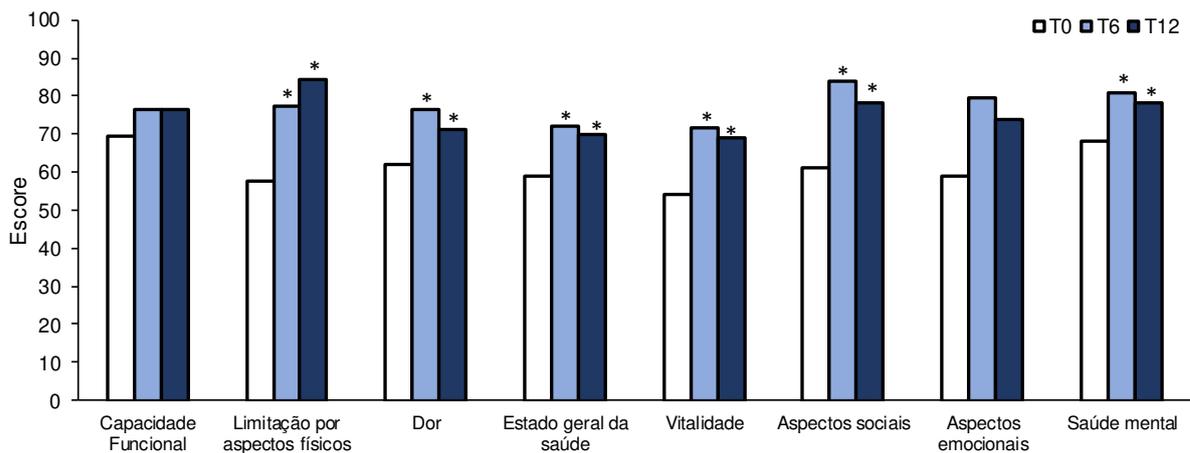


Figura 2: Médias dos escores de cada domínio do SF-36 do grupo DM2 em T0, T6 e T12. * $P < 0,05$.

Tabela 3: Média e desvio padrão dos escores em cada domínio do SF-36 do grupo DM2, IG e CT em T0, T6 e T12 de uso da *Chlorella*.

Domínios	DM2			IG			CT		
	T0	T6	T12	T0	T6	T12	T0	T6	T12
Capacidade Funcional	69±28	76±22	77±24	85±16	88±19	87±23	92±12	95±10	89±12
Limitação por aspectos físicos	58±44	77±36	84±30	75±33	82±28	92±25	90±17	90±21	87±27
Dor	59±32	76±21	69±25	64±23	78±21	84±19	73±21	82±17	74±24
Estado geral da saúde	59±24	72±16	70±17	70±17	74±16	78±19	90±11	82±15	90±12
Vitalidade	51±24	72±19	69±21	67±21	73±16	81±14	57±22	67±23	70±14
Aspectos sociais	58±30	84±19	78±23	76±23	77±24	88±16	76±22	82±14	83±14
Limitação aspectos emocionais	59±45	79±29	74±42	72±37	80±35	92±26	77±31	82±35	82±31
Saúde mental	65±27	81±15	76±19	67±20	80±16	83±14	72±18	78±15	82±10

No grupo IG em **T6 e T12**, foi observado melhora significativa ($P < 0.05$; t test) no domínio **saúde mental**. Em **T12**, além da melhora no domínio **saúde mental**, foi observado

melhora significativa ($P < 0.05$; t test) em outros 3 domínios: **dor, estado geral da saúde e vitalidade** (Figura 3). Como esperado para o grupo IG, a QVRS em T0 era maior quando comparado com o grupo DM2. Os escores para os domínios (média e desvio padrão) em T0, T6 e T12 estão na tabela 3.

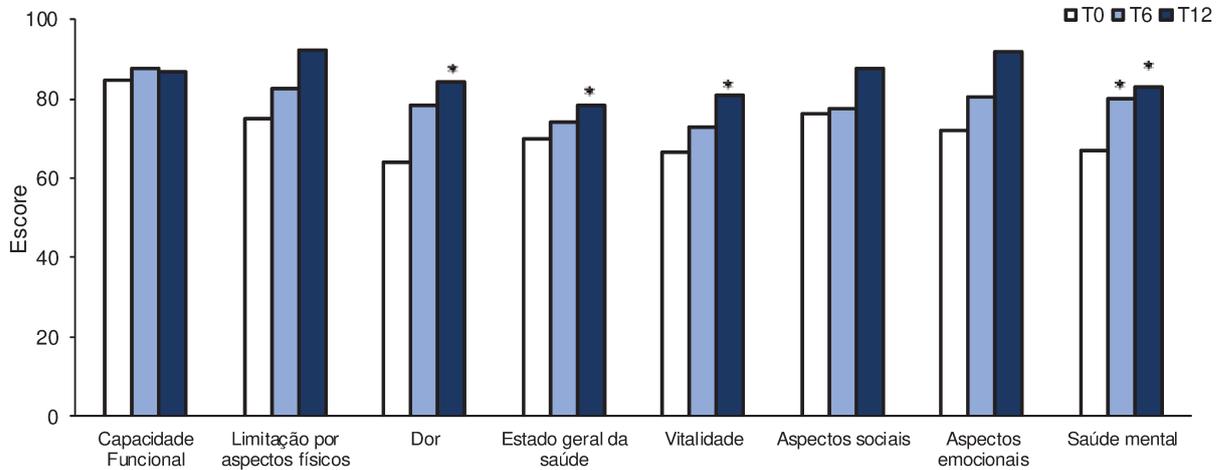


Figura 3: Médias dos escores de cada domínio do SF-36 do grupo IG em T0, T6 e T12. * $P < 0,05$.

No grupo CT, **vitalidade, saúde mental e aspectos sociais** foram significativamente ($P < 0.05$; t test) melhores, sendo os dois primeiros já detectados em T6 (Figura 4). Os escores para os domínios (média e desvio padrão) em T0, T6 e T12 estão na tabela 3. Como esperado, demonstrações de baixa QVRS foram consideravelmente menores no grupo CT quando comparado com os grupos DM2 e IG.

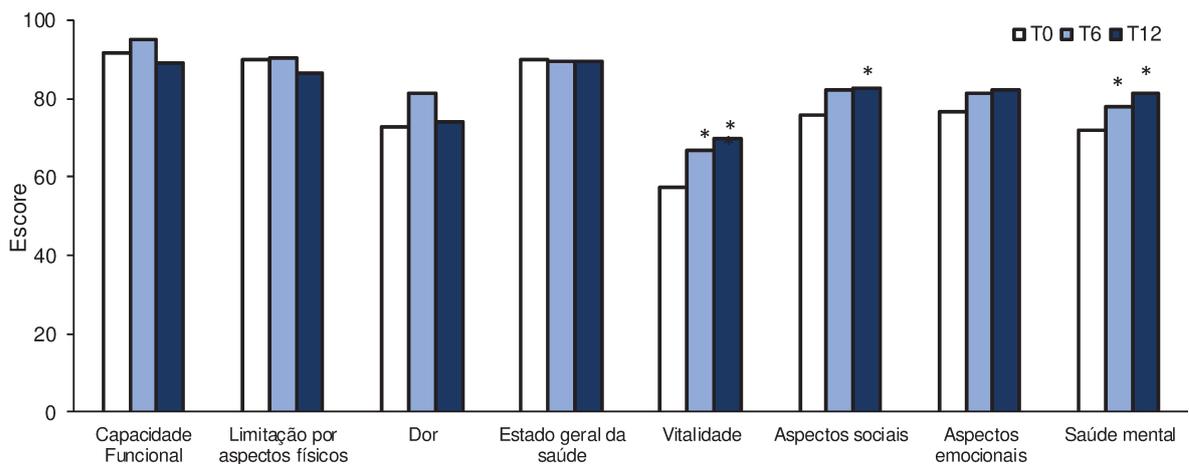


Figura 4: Médias dos escores de cada domínio do SF-36 do grupo CT em T0, T6 e T12. * $P < 0,05$.

4.2. Níveis séricos de citocinas

Em T6, os níveis séricos de **TNF- α** , **IL-6**, **MCP-1** e **IL-1 β** foram significativamente ($P < 0,05$) menores para os grupos DM2 e IG. Os níveis de **IL-8** foram reduzidos significativamente ($P < 0,05$) no grupo IG em T6/ T12. Em T12, os níveis reduzidos de **TNF- α** , **IL-6** e **MCP-1** foram mantidos em ambos grupos, enquanto que **IL-1 β** observou-se redução apenas para o grupo IG. Quanto aos níveis de IL-10, o uso da alga promoveu aumento significativo ($P < 0,05$) apenas em T6 nos grupos DM2 e IG (Figura 5).

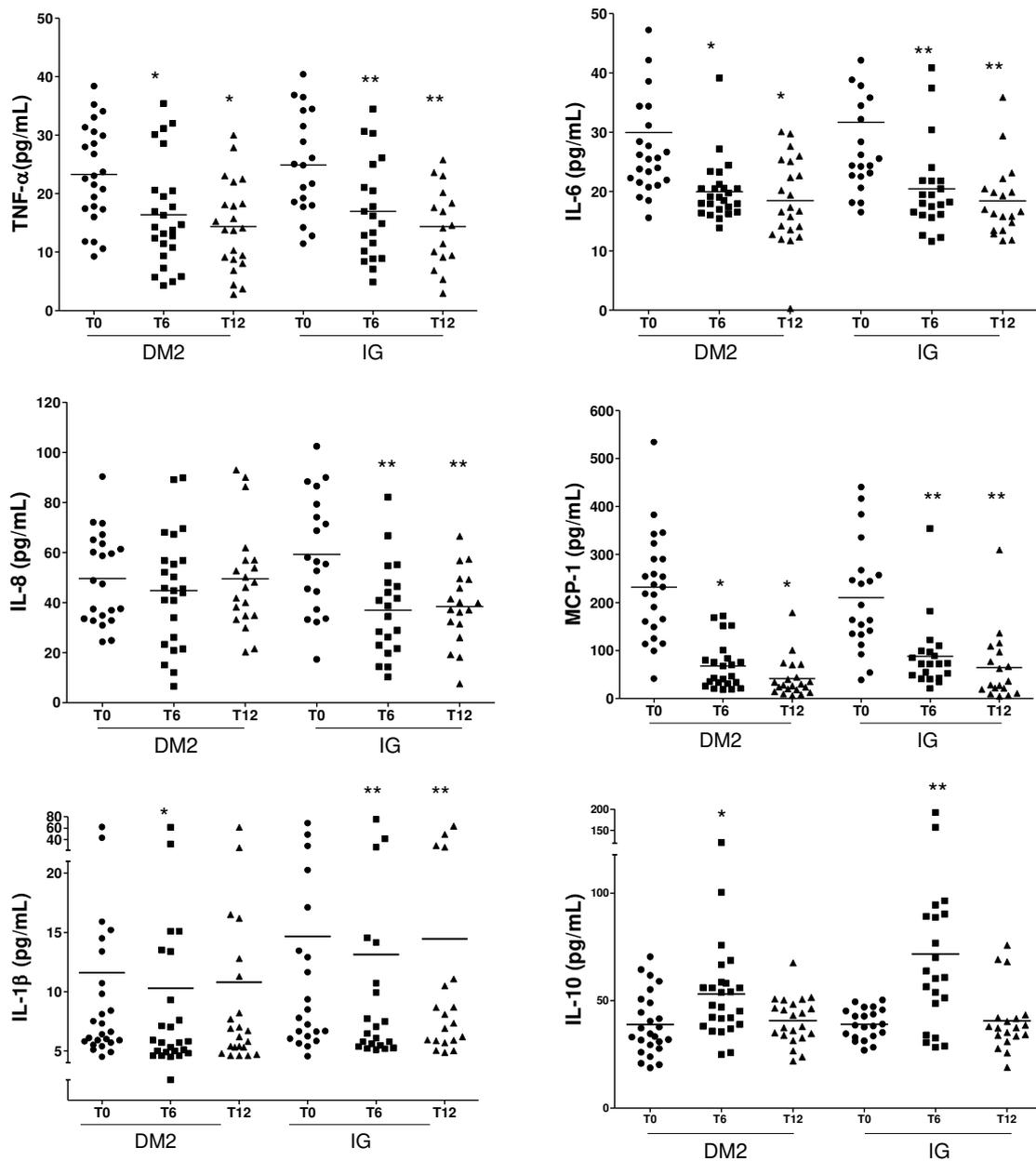


Figura 5: Níveis séricos das citocinas TNF- α , IL-6, IL-1 β , MCP-1, IL-8 e IL-10 do grupo DM2 e IG em T0, T6 e T12 (*t* test, Wilcoxon). *P<0,05 em relação ao T0 Do grupo DM2; ** P<0,05 em relação ao T0 do grupo IG.

4.3. Níveis séricos de adipocinas

Em T6, o uso da *Chlorella* promoveu aumento significativo (P<0,05) de **adiponectina** nos grupos **DM2** e **IG**, e reduziu significativamente (P<0,05) os níveis de **leptina** apenas no grupo **DM2**. Em **T12**, os níveis de **leptina e resistina** foram significativamente menores em ambos grupos (Figura 6).

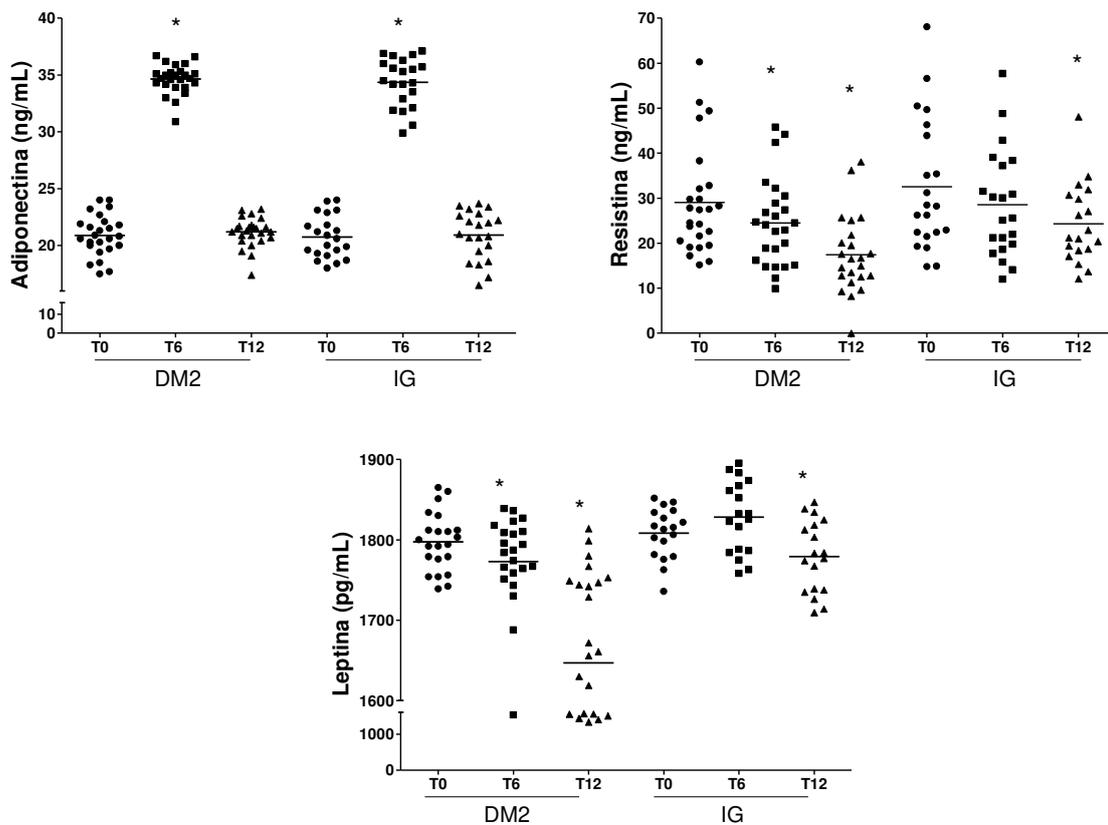


Figura 6: Níveis séricos de adiponectina, leptina e resistina do grupo DM2 e IG em T0, T6 e T12 (*t* test, Wilcoxon). *P<0,05 em relação ao T0 Do grupo DM2; ** P<0,05 em relação ao T0 do grupo IG.

4.4. Níveis séricos de glucagon e incretinas intestinais

Em T6, os níveis de GLP-1 foram significativamente (P<0,05) maiores e os níveis de glucagon foram significativamente (P<0,05) menores tanto no grupo DM2 quanto no IG, enquanto que os níveis de GIP foram significativamente (P<0,05) maiores apenas no grupo

IG. Em T12, em ambos grupos, GLP-1 e GIP apresentaram aumento significativo ($P < 0,05$) enquanto que glucagon apresentou diminuição significativa ($P < 0,05$) (Figura 7).

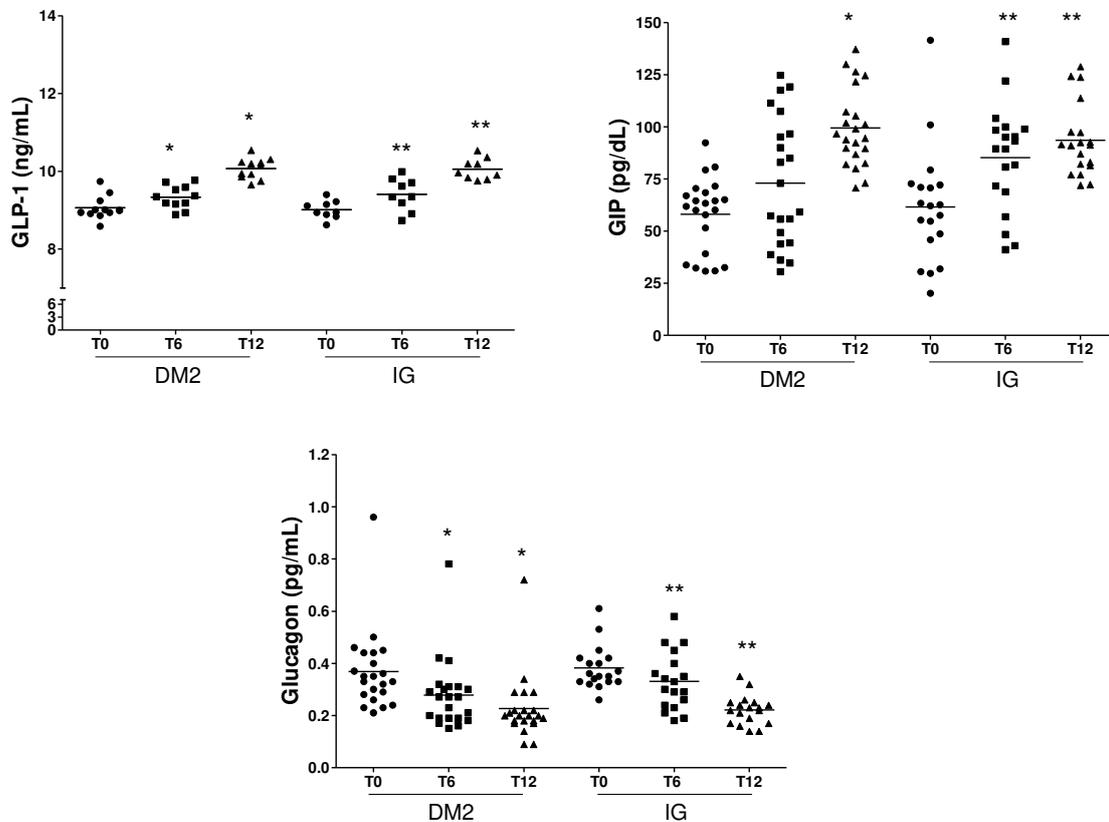


Figura 7: Níveis séricos de GLP-1, GIP e Glucagon dos grupos DM2 e IG em T0, T6 e T12 (t test, Wilcoxon). * $P < 0,05$ em relação ao T0 Do grupo DM2; ** $P < 0,05$ em relação ao T0 do grupo IG.

4.5. Correlação entre SF-36 e níveis citocinas e adipocinas

Correlação entre a habilidade da alga em promover melhora na QVRS e reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias e adipocinas está apresentada na figura 8 e 9. Nossos resultados demonstraram que quanto menor os níveis de citocinas pró-inflamatórias, maiores os escores obtidos nos domínios avaliados pelo SF-36 no grupo DM2. Em T6, menores níveis de **MCP-1**, **IL-1 β** e **IL-8** (todos apresentaram correlação negativa moderada) correlacionaram-se com melhores escores no domínio **capacidade funcional**; menores níveis de leptina correlacionaram-se com melhores escores de **dor**, **vitalidade e saúde mental** (todos apresentaram correlação negativa moderada); e quanto menores os níveis de IL-6

melhores os escores obtidos no domínio **limitação por aspectos físicos** (correlação negativa moderada) (Figura 8).

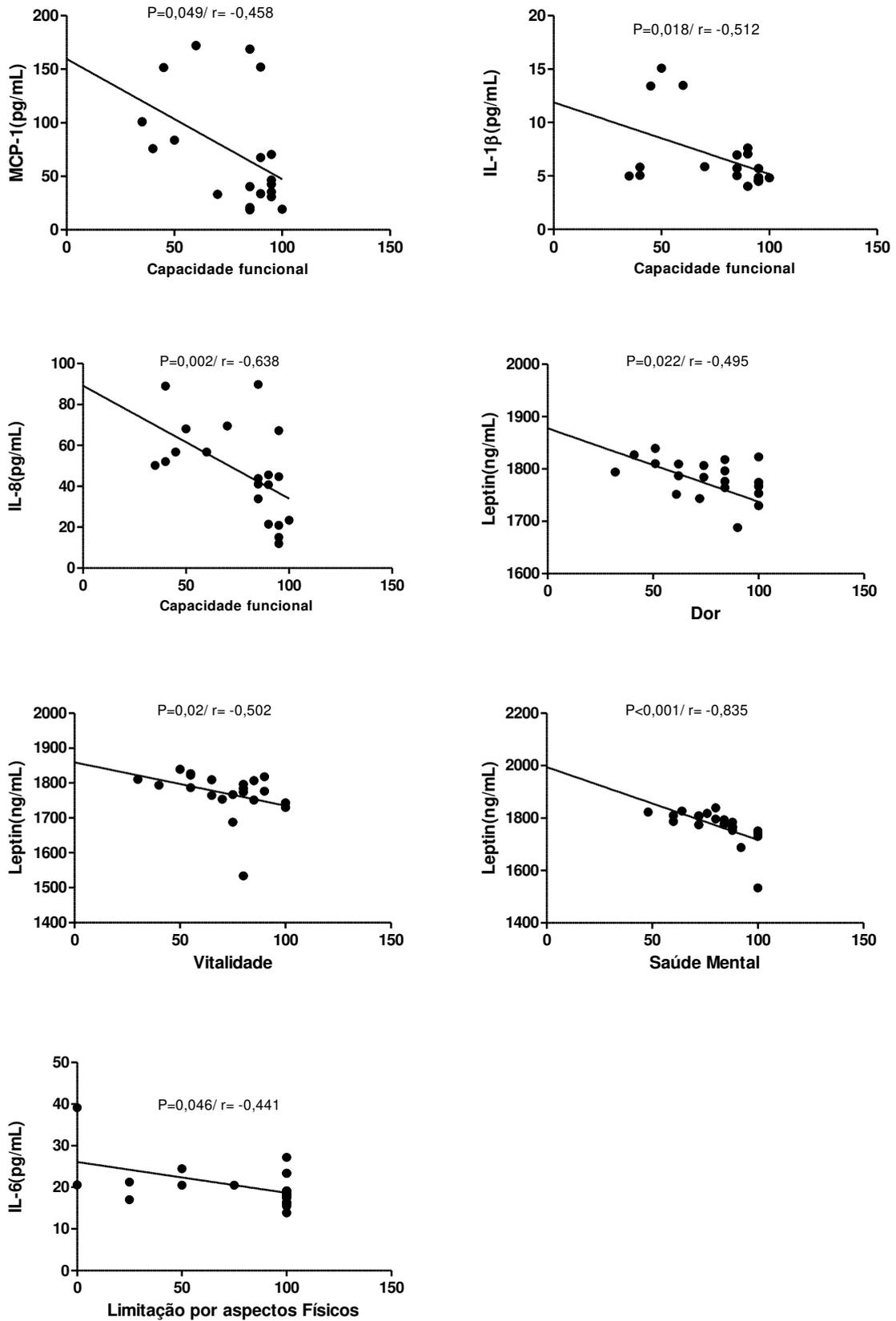


Figura 8: Correlação entre os domínios do SF-36 e níveis de citocinas/adipocinas alterados significativamente no grupo DM2 em T6 (Correlação de Spearman).

Em T12, níveis maiores de **IL-10** (correlação positiva moderada) em associação com níveis reduzidos de **TNF- α** (correlação negativa moderada) levam a escores maiores no domínio **estado geral da saúde**. Além disso, níveis menores de MCP-1 correlacionam-se com melhores escores nos domínios **capacidade funcional** e **limitação por aspectos físicos** (correlação negativa moderada em ambos) (Figura 9).

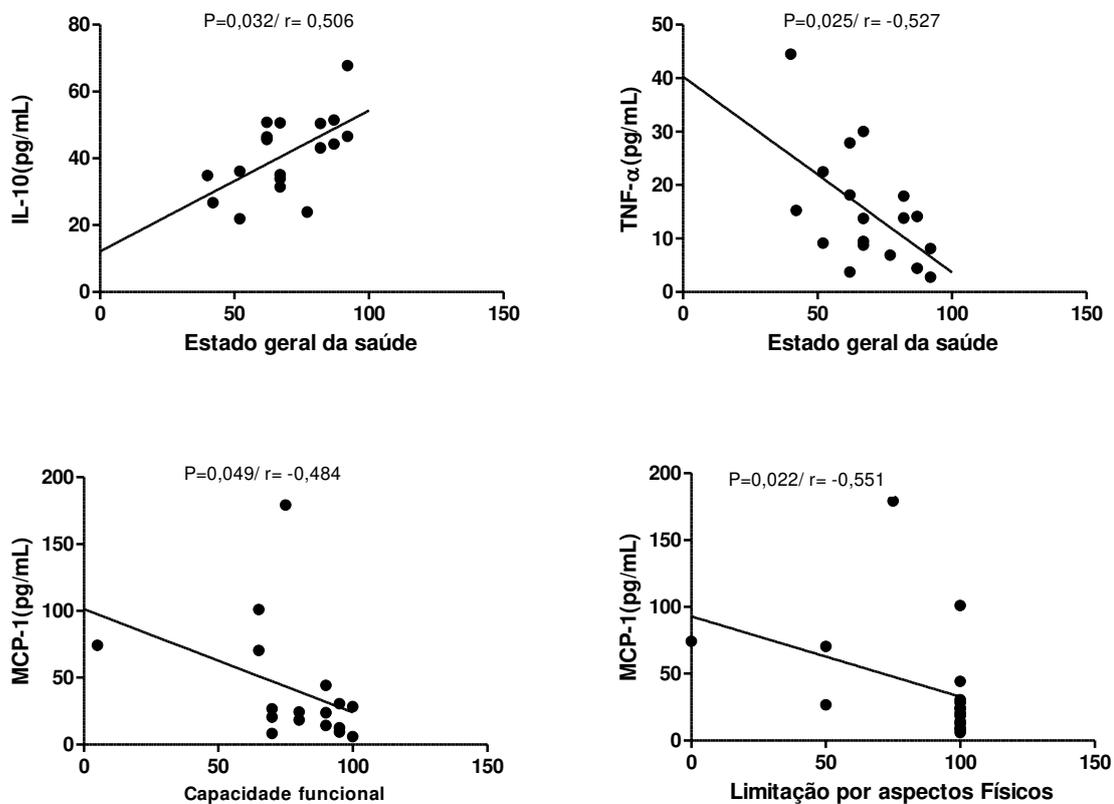


Figura 9: Correlação entre os domínios do SF-36 e níveis de citocinas alterados significativamente no grupo DM2 em T12 (Correlação de Spearman).

4.6. mi-RNA

A suplementação da dieta com *Chlorella* não alterou a expressão do mi-RNA-126 e do mi-RNA-375 nos grupos DM2 e IG (Figura 10).

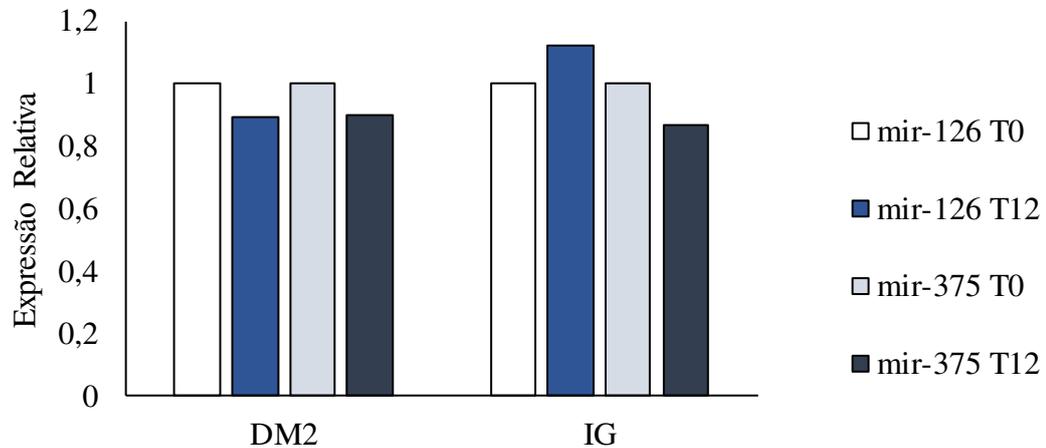


Figura 10: Expressão relativa do mi-RNA-126 e mi-RNA-375 antes e depois da utilização da alga *Chlorella* do grupo DM2 e IG (test t, Wilcoxon).

4.7. Microbiota Intestinal

Foi realizado sequenciamento gênico das bactérias presentes nas fezes do grupo DM2, realizado antes de utilizar *Chlorella* (T0) e após 1 mês (T1) da utilização de 3g/dia da alga. Nossos resultados preliminares confirmam que os dois filos mais presentes entre as bactérias são os *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (na proporção de 42.6% e 45.2%, respectivamente), seguidos por *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Elusimicrobia*, *Fusobacteria*, *Lentisphaerae*, *Proteobacteria*, *Synergistetes*, *Tenericutes* e *Verrucomicrobia* (Figura 11).

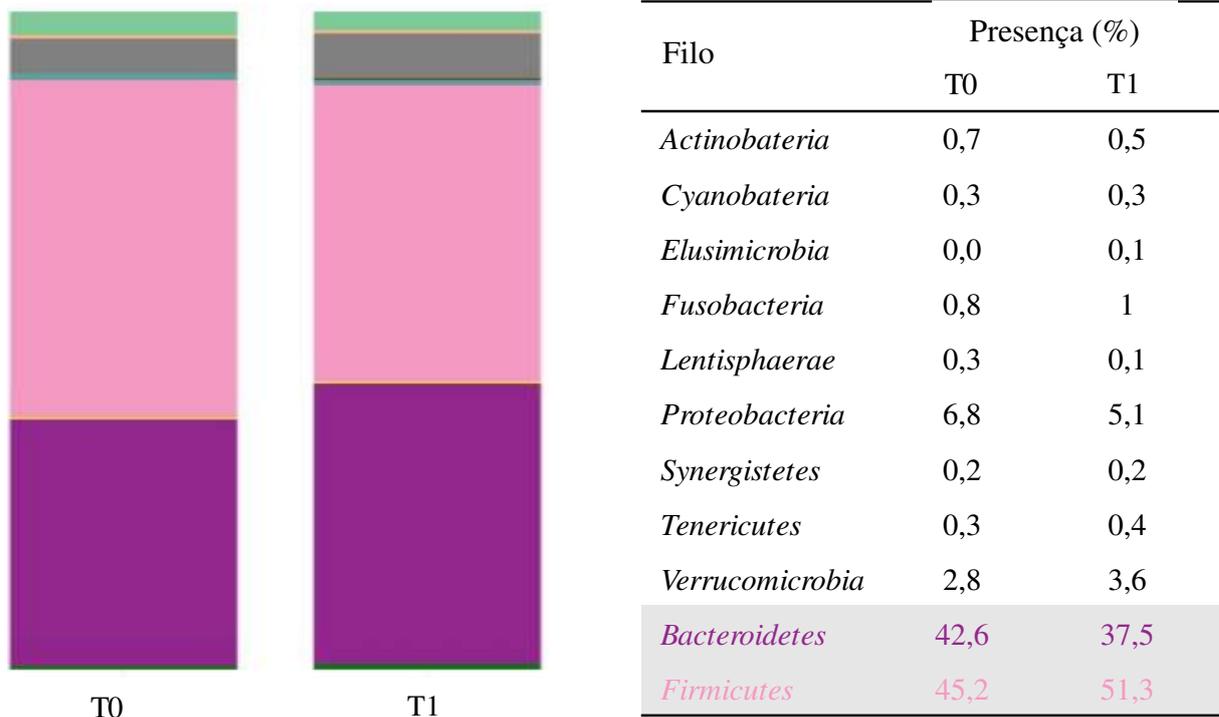


Figure 11: Porcentagens dos principais filos de bactérias presentes em amostras de fezes do grupo DM2, antes e depois da utilização de *Chlorella*.

O consumo diário de *Chlorella* por 30 dias promoveu redução significativa ($P < 0,05$) do filo *Bacteroidetes*, que está aumentado no DM2 (82), e não alterou o filo *Firmicutes*, normalmente diminuído no DM2 (82) (Figura 12).

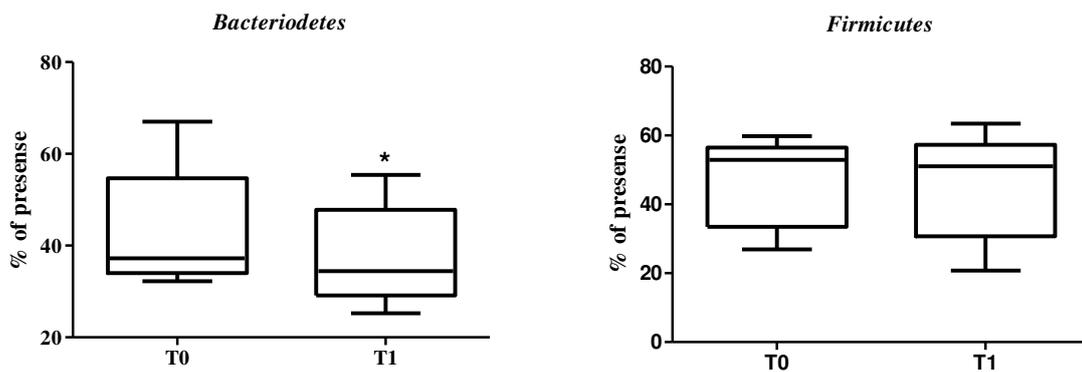


Figura 12: Porcentagem de *Bacteroidetes* e *Firmicutes* em amostras de fezes do grupo DM2, em T0 e T1 após o uso de *Chlorella* (teste t seguido de Wilcoxon). * $P < 0,05$.

4.8. Parâmetros Bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos avaliados não apresentaram alteração estatisticamente significativa durante o tempo de estudo (Tabela 3).

Tabela 4: Parâmetros bioquímicos avaliados durante o período de estudo.

	DM2			IG			CT		
	T0	T6	T12	T0	T6	T12	T0	T6	T12
Glicose (mg/dL)	119±33	123±38	139±78	108±24	105±12	102±12	86±7	84±7	83±8
Insulina (uUI/mL)	14±8,9	17±13	19±9	13±6	13±6	15±5	8±4	8±4	9±8
HOMA- IR	5,4±7,6	5,3±5	5,8±6,5	3,7±1,8	3,7±2	3,9±4	2 ±0,9	2±1	2±0,5
HbA1c (%)	7,8±2,5	7,6±2	7,7±2,3	6,1±1	6±0,7	6±0,5	5,4±0,5	5,5±0,4	5,5±0,4
Colesterol (mg/dL)	172±38	166±39	169±35	182±38	179±31	170±26	188±35	182±36	184±40
LDL (mg/dL)	94±29	91±34	91±31	104±24	108±29	97±25	110±31	109±28	112±31
HDL (mg/dL)	50±9	47±9	48±8	42±11	40±9	40±9	55±13	52±12	50±9
Triglicérides (mg/dL)	148±78	141±66	160±129	173±78	156±68	195±122	106±43	106±53	108±49
Ácidos graxos livres (mEq/L)	0,39±0,178	0,38±0,137	0,32±0,177	0,38±0,156	0,41±0,172	0,33±0,104	0,35±0,143	0,28±0,121	0,29±0,140
Corpos cetônicos (mEq/L)	0,04±0,008	0,05±0,012	0,04±0,0016	0,12±0,037	0,1±0,035	0,12±0,056	0,1±0,051	0,008±0,025	0,06±0,027
ALT (U/L)	20±12	20±11	23±18	23±9	23±8	22±6	18±9	18±9	16±6
AST (U/L)	19±7	20±15	23±25	20±5	20±4	19±4	19±5	19±5	18±4
T4L (ng/dL)	1,2±0,2	1,2±0,2	1,2±0,2	1,3±0,2	1,2±0,2	1,2±0,2	1,2±0,2	1,2±0,2	1,2±0,2
TSH (uUI/mL)	2,9±1,5	3,4±1,5	3,3±1,5	3,3±1,7	3,2±1,8	2,9±1,8	2,6±2,3	3,6±5,9	2,3±1
Ferro (ug/dL)	92±32	84±28	94±26	106±34	93±30	101±40	111±36	106±31	108±48
Ferritina (ng/mL)	195±230	200±291	206±329	352±350	342±316	293±283	99±70	121±89	119±100

5. DISCUSSÃO

Está bem estabelecido que o DM2 consiste de um estado de inflamação sistêmica crônica de baixo grau envolvido na resistência à insulina e caracterizado por aumento nos níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias e redução nos níveis de citocinas anti-inflamatórias, o qual é acompanhado de perda significativa na qualidade de vida (14–16,59). No presente trabalho observamos que o uso de *Chlorella*, nas doses de 1,6g e 3g/dia, por um período de 12 meses, em indivíduos portadores de IG e DM2 aumentou significativamente a qualidade de vida relacionada à saúde (QVRS) nos dois grupos estudados. Não houve diferença estatística na resposta às duas doses utilizadas. Paralelamente, o uso da alga reduziu os níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, MCP-1, IL-1 β , IL-8) e aumentou os níveis reduzidos de citocinas anti-inflamatórias (IL-10). Um aspecto importante foi a correlação entre a melhora na QVRS e a modulação nos níveis de citocinas pró- e anti-inflamatórias produzidos pela alga. Outro aspecto interessante, embora esperado, foi a melhora na qualidade de vida no grupo controle, o que reforça a importante atividade adaptogênica e anti-*stress* da alga, já bem comprovada em estudos do nosso laboratório (7–9,26–32) e da literatura (10–13,19).

Vários fatores afetam a QVRS de pacientes com DM, como limitações na capacidade funcional, física e emocional, presença de dor, fadiga, depressão, além do cuidado diário necessário para o controle adequado de glicemia, preocupação relacionada com as complicações decorrentes da doença, com a dieta e com a rotina necessária de exercícios (119). Portanto, é importante que a melhora na QVRS destes pacientes seja considerada como um dos objetivos primários no tratamento da doença (120,121). Nesse sentido, o questionário SF-36, utilizado no presente estudo, é um instrumento considerado genérico que avalia a qualidade de vida sob oito aspectos diferentes (122,123). Nossos resultados mostram que 6 domínios no grupo DM2, 4 domínios no grupo IG e 3 domínios no grupo CT do questionário SF-36 mostraram melhora com o uso da alga. Como esperado, a melhora foi mais pronunciada no grupo DM2 do que no grupo IG, uma vez que no quadro clínico de IG, um estágio intermediário no desenvolvimento de DM2 (124), os indivíduos não têm tantas limitações físicas e emocionais decorrentes da doença quanto no DM2. A análise estatística da correlação entre os domínios do SF-36 (capacidade funcional, dor, vitalidade, saúde mental, limitação por aspectos físicos e estado geral da saúde) e os níveis das citocinas e adipocinas estudadas (TNF- α , IL-6, MCP-1, IL-1 β , IL-8 e leptina), revelou correlação

negativa moderada entre eles, ou seja, quanto mais reduzidos os níveis de citocinas/adipocinas, maiores os escores obtidos nos domínios do SF-36. Esses resultados demonstram a importância da modulação anti-inflamatória da *Chlorella* no aumento da QVRS (figura 8 e 9). O impacto do uso da *Chlorella* na QVRS foi demonstrado na literatura em outras condições clínicas, como câncer de mama, hepatite C e depressão maior. Em estudo realizado com mulheres com câncer de mama, demonstrou-se que a suplementação com extrato aquoso de *Chlorella* (7,2g/dia/4 semanas) melhora a qualidade de vida das pacientes, representada pela melhora da disposição e na hidratação da pele (79). Em outro estudo realizado com pacientes com hepatite C crônica, a *Chlorella* foi administrada em dose de 9,4g/dia durante 12 semanas. Os pacientes relataram melhora nos níveis de energia e na percepção de saúde geral durante o período de estudo (77). Em 2015, um trabalho piloto mostrou evidências clínicas sobre a eficácia e segurança da terapia adjuvante com extrato de *Chlorella* (1,8g/dia/6semanas) no controle dos sintomas físicos e cognitivos da depressão, bem como sintomas de ansiedade em pacientes depressivos (125). É importante ressaltar que já foi discutido pela literatura, que a melhora da qualidade de vida reflete positivamente na adesão ao tratamento, reduzindo as taxas de morbimortalidade e a progressão da diabetes (126).

A associação entre hiperglicemia, inflamação e complicações em diabetes está bem estabelecida na literatura (127). Níveis de citocinas pró-inflamatórias e de adipocinas estão diretamente relacionados ao influxo de glicose para os tecidos e consequente aumento na circulação. A perda da homeostase glicêmica é agravada pela redução nos níveis séricos de IL-10 e adiponectina, fatores que atuam em prol do metabolismo glicêmico adequado (15,16,49,53,128). As citocinas são produzidas por diferentes tipos de células e secretadas na circulação, onde regulam a função de diferentes tecidos através de suas ações locais, centrais e periféricas (129). Das citocinas avaliadas neste estudo, **IL-6** é uma citocina multifuncional que participa de vários processos biológicos e é secretada por vários tipos celulares, principalmente células T, macrófagos, células endoteliais, células musculares lisas, adipócitos e hepatócitos (130,131), podendo interferir na atividade da insulina e influenciar a disfunção endotelial, principalmente no processo inicial de aterosclerose (132). **TNF- α** é uma potente citocina pró-inflamatória, secretada principalmente por células mielóides via ativação de MAPK e NF κ B, resultando na liberação de outras citocinas inflamatórias, tais como IL-1 β e IL-6 (133). **MCP-1** favorece a migração celular, principalmente de macrófagos, para o tecido adiposo, bem como a polarização de macrófagos para o fenótipo M2-alternativo,

aumentando e mantendo o sinal inflamatório (134,135). **IL-1 β** está relacionada com a morte de células β (136), além de estar correlacionada a doenças cardiovasculares decorrentes do DM2, obesidade e dislipidemia (137). **IL-8** está envolvida na imunidade sistêmica, infiltração de macrófagos no tecido adiposo e desempenha papel significativo na patogênese da DM2 e aterosclerose (138), estando correlacionada com complicações decorrentes da hiperglicemia (139). E finalmente, **IL-10** é uma citocina com efeitos predominantemente anti-inflamatórios e imunossupressores, produzida principalmente por células T e B, monócitos e macrófagos (140). Níveis aumentados/normais de IL-10 são fundamentais no controle glicêmico, uma vez que possui a capacidade de sensibilizar o organismo frente à ação da insulina (53).

No presente estudo, observamos a habilidade moduladora da alga de reduzir os níveis séricos aumentados de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8, MCP- 1, aumentados nos grupos DM2 e IG e, paralelamente, aumentar os níveis reduzidos de IL-10, observado nestes dois grupos. O aumento de IL-10 foi observado na avaliação realizada no período de 6 meses (T6) de uso da alga, não sendo observado em T12, o que parece reforçar o potencial adaptogênico da alga. Esses resultados corroboram estudos anteriores do nosso laboratório em modelo de experimental de obesidade/DM2 (8,9), os quais mostraram a capacidade da *Chorella* de restaurar os níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN γ , IL-1 α , MIF, MCP-1 e TGF- β) e os níveis reduzidos de IL-10 (9) **para os valores observados no grupo controle**. Sabe-se que o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias estimula as enzimas I-kappa- β (IK β) quinasa- β e IKKa, as quais, através da fosforilação do substrato do receptor de insulina em resíduo de serina (IRS-1^{ser307}), ativam o fator nuclear kappa B (NF-kB) responsável pela promoção de resistência à insulina (141–143). Em estudo pioneiro do nosso laboratório, em modelo experimental de obesidade/DM2 (7), observamos a capacidade da *Chlorella* de reduzir no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, os níveis de fosforilação de IRS-1^{ser307}, a qual é utilizada como marcador de resistência à insulina (7). Estes resultados mostram que a alga pode regular as funções da IRS-1 através de um equilíbrio delicado entre a fosforilação “positiva” de IRS-1 em tirosina versus a fosforilação “negativa” de IRS-1 em serina, em combinação com um efeito modulador na produção de citocinas (figura 13).

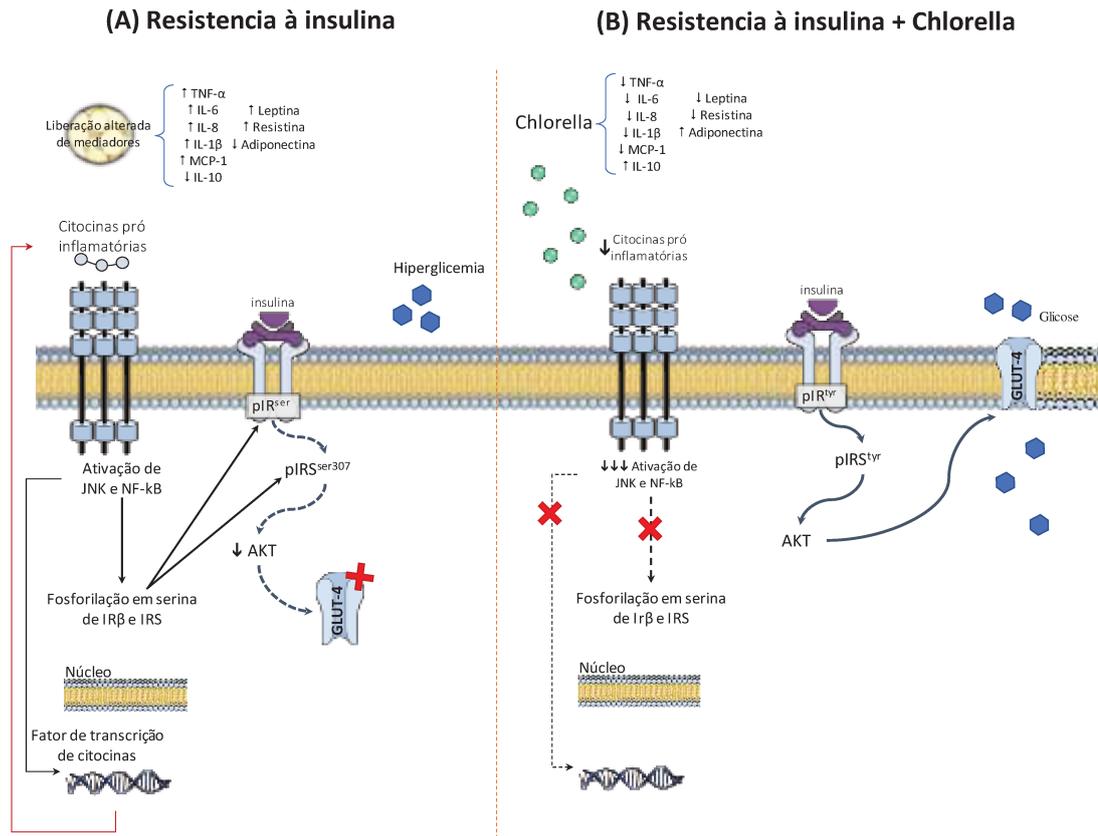


Figura 13: (A) Na resistência à insulina ocorre ativação das vias inflamatórias JNK e NF-κB, as quais são serinas quinases que levam à fosforilação em serina do IIRβ e IRS e consequente diminuição da translocação do GLUT-4 para a membrana, com redução da captação de glicose e consequente hiperglicemia. (B) Em presença da *Chlorella*, com a redução na ativação pró-inflamatória, a ativação de JNK e NF-κB e a transcrição de fatores solúveis pró-inflamatórios são reduzidas, além de restaurar o processo normal de fosforilação do IRS-1 em resíduos de tirosina no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo.

Em relação às adipocinas, os níveis de **leptina** foram significativamente reduzidos em T6 e T12 no grupo DM2 e em T12 no grupo IG. Entre outras funções (144,145), a leptina desempenha papel importante na regulação da homeostase da glicose (146), além de ser regulador negativo do peso corporal, ingestão alimentar e gasto energético. Obesidade e DM2 estão associadas ao aumento dos níveis plasmáticos de leptina, o que favorece a hiperglicemia e dá suporte ao conceito de resistência à leptina (147). Altos níveis de leptina foram relacionados à ativação do sistema nervoso simpático, disfunção endotelial, insuficiência cardíaca e aterosclerose (148). Outra adipocina importante, a **resistina**, aumentada no DM2 e na obesidade, leva ao aumento na produção hepática de glicose e agrava o quadro de hiperglicemia (149–151). Também estimula macrófagos a sintetizarem e secretarem citocinas pró-inflamatórias, aumentando a ativação de vias inflamatórias (152). Em presença da *Chlorella* observamos redução significativa nos níveis desta adipocina em T12, e uma

tendência não significativa de redução em T6, nos grupos IG e DM2. Em relação à **adiponectina**, como no caso de IL-10, o uso da *Chlorella* produziu aumento nos seus níveis apenas em T6 nos grupos IG e DM2. Este achado parece relevante ao reforçar a capacidade da alga de modular a resposta biológica em busca de homeostase. A adiponectina, diminuída do DM2, possui potente efeito antidiabético e propriedades anti-inflamatórias, por inibir a produção de IL-6 e induzir a produção de IL-10 (153,154), além de regular várias vias metabólicas, as quais culminam em maior influxo de glicose para as células (149,155,156). As baixas concentrações de adiponectina estão fortemente relacionadas com a resistência à insulina e as altas concentrações com uma maior sensibilidade à insulina e um menor risco de doença cardiovascular (129). O aumento induzido pela *Chlorella* nos níveis de adiponectina é relevante, devido as suas ações sensibilizantes à insulina, paralelo a diminuição de leptina e resistina, fatores que perpetuam o quadro inflamatório, além de estarem relacionados com a manutenção da hiperglicemia. Importante ressaltar que maiores níveis de adiponectina e menores de leptina e resistina não contribuem para ocorrência de complicações da doença. Nossos achados corroboram um estudo experimental, no qual animais que tiveram a dieta hiperlipídica suplementada com 5% de *Chlorella* apresentaram aumento dos níveis séricos de adiponectina e redução dos níveis séricos de leptina, quando comparado com o grupo que não recebeu a suplementação com a alga (13).

Em relação à produção de incretinas, hormônios com atividade insulínica produzidos pelo trato gastrointestinal e liberados após a entrada de alimentos no intestino (103), o uso da *Chlorella* levou a um aumento na liberação de GLP-1 e GIP e consequente diminuição nos níveis de glucagon nos grupos DM2 e IG. Glucagon é um hormônio contra regulatório que neutraliza as ações da insulina promovendo a mobilização de glicose do fígado através de glicogenólise e gliconeogênese, desempenhando papel fundamental para a manutenção glicêmica em períodos de jejum (157,158). No DM, ocorre a desregulação da secreção de glucagon, mesmo em períodos de refeição, causando a liberação excessiva de glicose, agravando o quadro de hiperglicemia (103,157). Assim como as células β , as células α também não respondem normalmente aos estímulos oriundos da dieta, levando a secreção exacerbada de glucagon (103). GLP-1 e GIP são os principais hormônios secretados pelas células endócrinas localizadas no epitélio do intestino delgado. GLP-1 diminui a secreção de glucagon pelas células α do pâncreas, aumentando a sensibilidade à insulina e sua biossíntese, a proliferação e neogênese das células beta, a captação e o armazenamento de glicose, a disponibilidade de insulina na circulação, ao mesmo tempo que reduz a apoptose das células

beta e a produção de glicose pelo fígado (159,160). Já o GIP atua em células β estimulando a secreção de insulina (103). Portanto, o efeito modulador da *Chlorella* na produção de incretinas é importante, uma vez que estas constituem importantes reguladores da secreção de hormônios das ilhotas, concentrações de glicose, metabolismo lipídico, motilidade intestinal, apetite e peso corporal e o sistema imunológico (159) (figura 14). Neste contexto, nossos resultados corroboram um estudo experimental, no qual *Chlorella* foi capaz de reduzir os níveis de glucagon no jejum de forma semelhante ao exendin-4, um agonista de receptores de GLP-1 resistente a enzima DDP-4, em animais diabéticos que tiveram sua dieta suplementada com a alga (161).

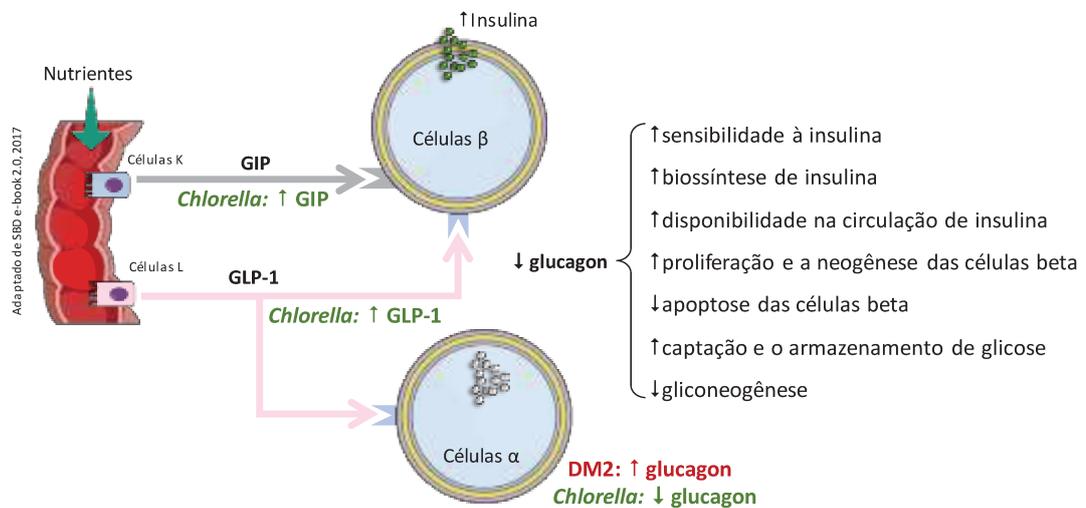


Figura 14: Papel fisiológico das incretinas: após refeições os nutrientes passam pelo intestino e estimulam as células K e L para a produção de GIP e GLP-1. Ambos atuam nas células beta para aumentar a secreção de insulina, e ainda o GLP-1 diminui a secreção de glucagon. No DM2, ocorre a desregulação da secreção de glucagon, estimulando a produção de glicose através da gliconeogênese, agravando o quadro de hiperglicemia. A utilização da *Chlorella* levou a diminuição das concentrações séricas de glucagon e aumentou os níveis séricos de GLP-1 e GIP.

Outro aspecto pioneiro do presente trabalho foi a avaliação dos efeitos da *Chlorella* na microbiota intestinal, a qual consiste da variedade de microrganismos que habitam o trato gastrointestinal. O equilíbrio na composição desta comunidade microbiana é importante para garantir a homeostase, enquanto que o desequilíbrio está associado com várias doenças, tais como doenças gastrointestinais, obesidade, DM2, entre outras (82,162). A composição da população consiste de bactérias, fungos, arqueias, vírus e protozoários (163,164). No entanto, cerca de 90% dela é constituída por bactérias que pertencem aos

filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (165–167), dados estes confirmados no presente estudo. De acordo com a literatura, apesar de alguma controvérsia (80,82,86,87,168–171), há um aumento na proporção de *Bacteroidetes* em pessoas diabéticas em comparação com indivíduos não diabéticos. Nossos resultados, cuja avaliação ainda está em andamento, corroboram indiretamente esta hipótese, uma vez que o uso de 3g/dia por 30 dias de *Chlorella* produziu redução na proporção de *Bacteroidetes* e não alterou a proporção de *Firmicutes*, em associação à redução da resposta inflamatória e aumento na QVRS. O círculo vicioso entre a alteração da microbiota e a inflamação crônica de baixo grau tem sido considerado fator relevante para o agravamento do DM2. Além das proporções alteradas entre os principais filos de bactérias intestinais, observa-se aumento de vários patógenos oportunistas e algumas bactérias gram-negativas produtoras de endotoxinas (82,87,172), acúmulo de moléculas como lipopolissacarídeo, peptidoglicanos e flagelina, derivadas de bactérias, que agravam o quadro inflamatório do paciente DM2 (170,173). Além disso, alterações na microbiota foram observadas nos quadros em que o paciente DM2 já desenvolveu alguma complicação, como retinopatia diabética, toxicidade renal, cálculo renal, hipertensão, aterosclerose, fibrose cística, ulceração de pé e doença de Alzheimer (114). Conter a inflamação de baixo grau, assim como restaurar o equilíbrio da microbiota é de extrema importância, uma vez que ambas contribuem para a ocorrência de complicações, e consequentemente afetam a QVRS e a sobrevida dos pacientes (120,174).

Um ponto relevante deste trabalho está relacionado à busca da dose mínima adequada de *Chlorella* para a produção de seus efeitos adaptogênicos, uma questão ainda aberta na literatura. Estudos em diferentes modelos experimentais do nosso laboratório (7,27–30,32,34,35) confirmam o mecanismo de ação adaptogênico da alga de restaurar para os níveis normais os diferentes desequilíbrios subjacentes aos processos de imunossupressão e inflamação crônica. Os resultados mostram que, uma vez atingida a dose mínima necessária para alcançar os valores obtidos no hospedeiro normal, ocorre um *plateaux* na resposta fisiológica que é mantido em presença de doses mais elevadas. Corroboram estes resultados, efeitos de diferentes doses da alga no hospedeiro normal (28,33,35). Em estudos preliminares, com o objetivo de encontrar a dose ideal a ser utilizada em estudos futuros, utilizamos doses de 50, 100 e 200 mg/Kg em animais portadores do agressivo tumor ascítico de Ehrlich. Os resultados demonstraram que as três doses foram igualmente efetivas em restaurar para os níveis do controle normal o reduzido número de CFU-GM da medula óssea observado no animal portador de tumor. Ainda, a avaliação da atividade antitumoral demonstrou que não há

diferença no efeito das três doses sobre o tempo de prolongamento da sobrevivência dos animais portadores do tumor. Outro aspecto importante foi a ausência de toxicidade observada com as três doses (33).

Em estudos clínicos da literatura observa-se o efeito modulador da *Chlorella* em diferentes patologias e na significativa melhora da baixa qualidade de vida. No entanto, não há um consenso na escolha da dose utilizada. Considerando o perfil adaptogênico da alga, que significa produzir homeostase no organismo, é de se esperar que, uma vez atingido o efeito homeostático, doses superiores não irão produzir respostas fisiológicas mais ou menos intensas, conforme demonstra nosso estudo experimental descrito acima (33). Num destes estudos realizado em pacientes com esteatose hepática não alcoólica, a ingestão da alga na dose de **1,2g/dia por 3 meses**, como adjuvante do tratamento convencional, produziu melhora significativa sobre os níveis de transaminases no soro, triglicérides, bem como o aumento na sensibilidade à insulina (175). Em pacientes com depressão maior, a dose de **1,8g/dia por 6 semanas** da alga levou ao melhor controle dos sintomas cognitivos de depressão (125). Em indivíduos com hepatite C crônica, o tratamento com **5g/dia por 12 semanas** produziu melhora na qualidade de vida em 77% dos pacientes, representada por maior ânimo e disposição para realizar diferentes atividades e melhora nas condições gerais de saúde (77). Os efeitos benéficos da alga foram também relatados por estudos realizados em gestantes saudáveis que receberam **6g/dia por seis semanas** (12^a até 18^a semana de gestação) (176,177) ou a partir da 16^a semana de gravidez até o dia do parto (177), sendo que os resultados observados foram: redução na incidência de anemia, de proteinúria, de edema e aumento nos níveis de luteína, zeaxantina e carotenoides no leite. Em outro estudo, a administração de **7,0g/dia por 30 dias** à mulheres com câncer de mama que recebiam radioterapia e/ou quimioterapia há pelo menos 6 meses, produziu aumento na qualidade de vida em 50% das pacientes, representado por redução da fadiga e melhora na condição de pele seca (79). Em estudo realizado em voluntários sadios e em pessoas com alto fator de risco para desenvolvimento de doenças relacionadas com o estilo de vida, a ingestão de **8g/dia por 12 semanas** produziu melhora no metabolismo da gordura e da glicose, conforme demonstrado pelo aumento dos níveis séricos de HDL e diminuição nos níveis de colesterol, LDL e triglicérides, e redução na glicemia de jejum. Observou-se também aumento na expressão gênica de fatores indispensáveis para a manutenção glicêmica ideal, como Akt e IRS. Um achado interessante neste estudo foi o fato do efeito protetor da alga ter sido mais pronunciado nos pacientes expostos a fatores de alto risco para o desenvolvimento de doenças relacionadas

com o estilo de vida, fato que corrobora o perfil adaptogênico da alga (12). Em voluntários saudáveis, o tratamento com **8g/dia por um período de 2 meses** aumentou a atividade antioxidante no eritrócito, verificados pelo aumento na concentração plasmática e eritrocítica de luteína e diminuição da injúria oxidativa com redução na concentração de hidroperóxido fosfolípide (PLOOH) na membrana de eritrócito (178). Merchant e Andre (19), verificaram os efeitos moduladores de **10g/dia por um período de 3 meses** em três casos clínicos diferentes. No caso de pacientes hipertensos, houve diminuição da pressão arterial elevada e também dos níveis de colesterol. Em pacientes com fibromialgia, houve diminuição da dor. Em pacientes portadores de colite ulcerativa, a região da mucosa retal estava menos inflamada e também os pacientes notaram redução na frequência de evacuação. Em pacientes portadores de tumor primário de cérebro, a dose de **20g/dia por um período de 2 anos** apresentou proteção na resposta imunológica durante terapia quimioterápica e imunossupressora, não tendo apresentado outros efeitos tóxicos, exceto por alguns casos de desconforto gastrointestinal como cólicas abdominais, diminuição do peristaltismo intestinal e náusea (18,19).

Neste contexto, um dos objetivos do presente estudo foi avaliar os efeitos moduladores de doses relativamente baixas da alga em um quadro de inflamação sistêmica crônica, acompanhado de grave prejuízo na QVRS. Para isto, tendo como referência as doses mínimas efetivas encontradas na literatura, selecionamos as doses de 1,6g e 3g/dia, por um período de 12 meses, sendo 1,6g/dia nos primeiros 6 meses e 3g/dia nos 6 meses seguintes. A escolha do período de 12 meses foi feita com o objetivo de reproduzir as condições em longo prazo. Os resultados mostraram que os efeitos na melhora da qualidade de vida e na modulação nos níveis de citocinas foram observados com a menor dose de 1,6g já na avaliação em T6. No grupo DM2, não houve diferença entre T6 e T12 nos 6 domínios que apresentaram melhora. No grupo IG, dos quatro domínios melhorados, um deles manifestou-se já em T6 e manteve-se em T12, e os outros três manifestaram-se apenas em T12. No grupo controle, dos três domínios melhorados, dois foram detectados na avaliação em T6, e o outro apenas em T12. Uma observação importante é que a melhora na QVRS de todos os participantes, incluindo os controles, tenha sido relatada por eles já nos primeiros dias de ingestão da alga, o que confirma o efeito bastante satisfatório da dose de 1,6g/dia na melhora da qualidade de vida. Outro aspecto a ser considerado é a importância de estudos de médio e longo prazo para a avaliação de tratamentos de doenças crônicas, o que permite avaliar as alterações em diferentes fases da intervenção terapêutica.

Em relação aos mi-RNAs, o uso da *Chlorella* não promoveu alteração em mi-RNA 126 e mi-RNA 375. Por outro lado, estudo da literatura evidenciou o potencial da *Chlorella* em modificar a expressão de alguns genes relacionados a moléculas de transdução de sinal, enzimas metabólicas, receptores, transportadores e citocinas (12), reforçando a ideia de que a alga possa ter potencial para modular a expressão de genes importantes para o desenvolvimento de DM2. Em estudo clínico recente (179) com 12 mulheres saudáveis que receberam *Chlorella* na dose de aproximadamente 5g/dia por 2 semanas, observou-se redução na quantidade do composto cancerígeno PAH (*Polycyclic aromatic hydrocarbons*), sugerindo a capacidade moduladora da alga de interferir em diferentes genes e promover alterações epigenéticas.

Todos estes efeitos da alga nos pacientes com DM2 e IG também podem ser explicados pelo efeito adaptogênico da alga de atuar como modificador da resposta biológica e favorecer a homeostase frente a diferentes tipos de estresses ambientais ou psicogênicos, neste caso através da indução de um padrão normal de produção de citocinas endógenas. Neste contexto, os efeitos moduladores da *Chlorella* nas seguintes condições experimentais: estresse físico e psicogênico agudo (27,35), estresse crônico (180), exposição a metais pesados (28–30), infecção (26,31,32) e tumor (33,34) foram demonstrados anteriormente.

Em conjunto, nossos resultados apontam para o uso promissor da *Chlorella* como alternativa terapêutica e/ou complementar no tratamento da DM2 e suas complicações. Além disso, o fato bem reconhecido de que o papel do processo inflamatório é crucial não apenas nas doenças infecciosas, mas também em ampla gama de doenças crônicas não infecciosas, reforça o uso da *Chlorella* no tratamento de outras condições patológicas, incluindo cânceres, doenças autoimunes e infecciosas (181).

6. CONCLUSÃO

A utilização da alga *Chlorella* por 12 meses:

- No grupo DM2:
 - ✓ Melhorou significativamente a QVRS. Em T6 e T12, foi observado melhora (P<0.05) nos domínios **limitação por aspectos físicos, dor, estado geral da saúde, vitalidade, aspectos sociais e saúde mental**;
 - ✓ Diminuiu os níveis de TNF- α , IL-6, MCP-1, leptina e glucagon em T6 e T12;
 - ✓ Diminuiu os níveis IL-1 β em T6;
 - ✓ Diminuiu os níveis de resistina em T12;
 - ✓ Aumentou os níveis de IL-10 e adiponectina em T6,
 - ✓ Aumentou os níveis de GLP-1 e GIP em T6 e T12;
 - ✓ Promoveu modulação do filo *Bacteroidetes*;
 - ✓ Não alterou a expressão do mi-RNA 126 e mi-RNA 375;
 - ✓ Não promoveu alteração dos parâmetros bioquímicos.

- No grupo IG:
 - ✓ Melhorou significativamente a QVRS. Em **T6 e T12**, foi observado melhora no domínio **saúde mental**. Em **T12**, além da melhora no domínio **saúde mental**, foi observado melhora em outros 3 domínios: **dor, estado geral da saúde e vitalidade**.
 - ✓ Diminuiu os níveis de TNF- α , IL-6, MCP-1, IL-8 e glucagon em T6 e T12;
 - ✓ Diminuiu os níveis IL-1 β em T6;
 - ✓ Diminuiu os níveis leptina e resistina em T12;
 - ✓ Aumentou os níveis de IL-10 e adiponectina em T6,
 - ✓ Aumentou os níveis de GLP-1 e GIP em T6 e T12;
 - ✓ Não alterou a expressão do mi-RNA 126 e mi-RNA 375;
 - ✓ Não promoveu alteração dos parâmetros bioquímicos.

- No grupo CT:

- ✓ Melhorou 3 domínios do SF-36: **vitalidade, saúde mental e aspectos sociais**, em T6 e T12, sendo os dois primeiros já detectados em T6.

Em conjunto, nossos resultados demonstram que o uso da *Chlorella* foi capaz de modular os parâmetros inflamatórios, adipocinas, incretinas intestinais e glucagon, bem como modular o filo Bacteroidetes da microbiota intestinal. Sendo assim, a alga *Chlorella* surge como uma alternativa terapêutica e/ou complementar promissora no tratamento da DM2/IG e suas complicações.

7. REFERÊNCIAS

1. Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2013-2014. AC Farm. 2014;1-382.
2. World Health Organization (WHO). Diabetes. Fact sheet n° 312. [cited 2016 Nov 30]. Disponível em: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/%3E
3. IDF. IDF Diabetes Atlas. International Diabetes Federation. 2015. 1-163 p.
4. Narayan KMV, Gregg EW, Fagot-Campagna A, Engelgau MM, Vinicor F. Diabetes - A common, growing, serious, costly, and potentially preventable public health problem. *Diabetes Res Clin Pract.* 2000;50(SUPPL. 2).
5. Hidaka S, Okamoto Y, Arita M. A hot water extract of *Chlorella pyrenoidosa* reduces body weight and serum lipids in ovariectomized rats. *Phyther Res.* 2004 Feb;18(2):164-8.
6. Chang CLT, Lin Y, Bartolome AP, Chen YC, Chiu SC, Yang WC. Herbal Therapies for Type 2 Diabetes Mellitus: Chemistry, Biology, and Potential Application of Selected Plants and Compounds - A review. *Evidence-Based Complement Altern Med.* 2013;2013:33.
7. Vecina JF, Oliveira AG, Araujo TG, Baggio SR, Torello CO, Saad MJA, et al. *Chlorella* modulates insulin signaling pathway and prevents high-fat diet-induced insulin resistance in mice. *Life Sci.* 2014;95(1):45-52.
8. Torello CO, Paredes-Gamero EJ, Martins F, Lopes De Castro TC, Saad STO, Saad MJA, et al. Extramedullary Hematopoiesis in the Spleen of Obese Mice -Modulation by the Alga *Chlorella*. *Med Aromat plants.* 2016;5(6):1216-27.
9. Torello CO, Martins F, Lopes De Castro TC, Saad STO, Saad MJA, Queiroz ML de S. *Chlorella* Modulation of Cytokine Production in Obese Mice and Minireview of the Effects of the Alga in Obesity. *EC Nutr.* 2016;1:1037-45.
10. Lee HS, Kim MK. Effect of *Chlorella vulgaris* on Glucose Metabolism in Wistar Rats Fed High Fat Diet. *Nutr Rsearch Pract.* 2009;12(5):1029-36.
11. Lee HS, Park HJ, Kim MK. Effect of *Chlorella vulgaris* on lipid metabolism in Wistar rats fed high fat diet. 2008;2:204-10.
12. Mizoguchi T, Takehara I, Masuzawa T, Saito T, Naoki Y. Nutrigenomic Studies of Effects of *Chlorella* on Subjects with High-Risk Factors for Lifestyle-Related Disease. *J Med Food.* 2008;11(3):395-404.
13. Noguchi N, Konishi F, Kumamoto S, Maruyama I, Ando Y, Yanagita T. Beneficial effects of *Chlorella* on glucose and lipid metabolism in obese rodents on a high-fat diet. *Obes Res Clin Pract.* 2013;7(2):e95-105.
14. Stumvoll M, Goldstein BJ, Haeften TW Van. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. 2010;365(9467):1333-46.
15. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Review series Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006;116(7):1793-801.
16. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(2):98-107.
17. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu Rev*

- Immunol. 2011;29(1):415–45.
18. Merchant RE, Rice CD, Young HF. Dietary *Chlorella pyrenoidosa* for patients with malignant glioma: Effects on immunocompetence, quality of life, and survival. *Phyther Res.* 1990;4(6):220–31.
 19. Merchant RE, Andre C a. A review of recent clinical trials of the nutritional supplement *Chlorella pyrenoidosa* in the treatment of fibromyalgia, hypertension, and ulcerative colitis. *Altern Ther Health Med.* 2001;7(3):79–91.
 20. Vijayavel K, Anbuselvam C, Balasubramanian MP. Antioxidant effect of the marine algae *Chlorella vulgaris* against naphthalene-induced oxidative stress in the albino rats. *Mol Cell Biochem.* 2007;303(1–2):39–44.
 21. Rodriguez-Garcia I, Guil-Guerrero JL. Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. *Food Chem.* 2008;108(3):1023–6.
 22. Panahi Y, Mostafazadeh B, Abrishami A, Saadat A, Beiraghdar F, Tavana S, et al. Investigation of the effects of *Chlorella vulgaris* supplementation on the modulation of oxidative stress in apparently healthy smokers. *Clin Lab.* 2013;59(5–6):579–87.
 23. Lazarev N. The Adaptogen Concept. In Moscow: 7th All- union Congr. *Physiol., Biochem., Pharmacol. Medgiz, Moscow;* 1947. p. 579.
 24. II B, Dardymov I. New substances of plant origin which increase nonspecific resistance. *Annu Rev Pharmacol.* 1969;9:419–30.
 25. Noda K, Ohno N, Tanaka K, Okuda M, Yadomae T, Nomoto K, et al. A new type of biological response modifier from *Chlorella vulgaris* which needs protein moiety to show an antitumour activity. *Phyther Res.* 1998 Aug 1;12(5):309–19.
 26. Dantas DCM, Queiroz MLS. Effects of *Chlorella vulgaris* on bone marrow progenitor cells of mice infected with *Listeria monocytogenes*. 1999;21:499–508.
 27. Queiroz J d S, Torello CO, Palermo-Neto J, Valadares MC, Queiroz MLS. Hematopoietic response of rats exposed to the impact of an acute psychophysiological stressor on responsiveness to an in vivo challenge with *Listeria monocytogenes*: Modulation by *Chlorella vulgaris* prophylactic treatment. *Brain Behav Immun.* 2008;22(7):1056–65.
 28. Queiroz MLS, Rodrigues APO, Bincoletto C, Figueirêdo CAV, Malacrida S. Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with *Listeria monocytogenes*. *Int Immunopharmacol.* 2003;3(6):889–900.
 29. Queiroz MLS, Torello CO, Perhs SMC, Rocha MC, Bechara EJH, Morgano MA, et al. *Chlorella vulgaris* up-modulation of myelosuppression induced by lead: The role of stromal cells. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(9):3147–54.
 30. Queiroz MLS, da Rocha MC, Torello CO, de Souza Queiroz J, Bincoletto C, Morgano MA, et al. *Chlorella vulgaris* restores bone marrow cellularity and cytokine production in lead-exposed mice. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(11):2934–41.
 31. Dantas DCM, Kaneno R, Queiroz MLS. The effect of *Chlorella vulgaris* in the protection of mice infected with *Listeria mnoocytogenes*. Role of natural killer cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1999;21(3):609–19.
 32. Queiroz MLS, Bincoletto C, Valadares MC, Dantas DCM, Santos LMB. Effects of

- chlorella vulgaris* extract on cytokines production in *listeria monocytogenes* infected mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2002;24(3):483–96.
33. Justo GZ, Silva MR, Queiroz MLS. Effects of the green algae *chlorella vulgaris* on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal ehrlich ascites tumor transplantation in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2001;23(1):119–32. A
 34. Ramos AL, Torello CO, Queiroz MLS. *Chlorella vulgaris* modulates immunomyelopoietic activity and enhances the resistance of tumor-bearing mice. *Nutr Cancer*. 2010;62(8):1170–80.
 35. de Souza Queiroz J, Malacrida SA, Justo GZ, Queiroz ML. Myelopoietic response in mice exposed to acute cold/restraint stress: modulation by *Chlorella vulgaris* prophylactic treatment. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2004;26(3):455–67.
 36. Johns JL, Christopher MM. Extramedullary Hematopoiesis: A New Look at the Underlying Stem Cell Niche, Theories of Development, and Occurrence in Animals. *Vet Pathol*. 2012 May 18;49(3):508–23.
 37. Queiroz ML, Valadares MC, Bincoletto C, Dieamant GC. Ehrlich ascites tumor as a tool in the development of compounds with immunomodulatory properties. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2004;26:511–25.
 38. Steinke JW, Borish L. 3. Cytokines and chemokines. 2005;117(2):441–5.
 39. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001;414(6865):799–806.
 40. Saltiel AR, Pessin JE. Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol*. 2002 Feb;12(2):65–71.
 41. Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem*. 2002 Jan 11;277(2):1531–7.
 42. Howard B V, Ruotolo G, Robbins DC. Obesity and dyslipidemia. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2003 Dec;32(4):855–67.
 43. Sano T, Kumamoto Y, Kamiya N, Okuda M, Tanaka Y. Effect of lipophilic extract of *Chlorella vulgaris* on alimentary hyperlipidemia in cholesterol-fed rats. *Artery*. 1988;15(4):217–24.
 44. Shibata S, Oda K, Onodera-Masuoka, N., Kikuchi-Hayakawa, H., Ishikawa, F., Iwabuchi, A., Sansawa H. Hypocholesterolemic effect of indigestible fraction of *Chlorella regularis* in cholesterol-fed rats. *J Nutr Sci Vitam*. 2001;47:327–77.
 45. Chovaněíková M, Simek V. Effects of high-fat and *Chlorella vulgaris* feeding on changes in lipid metabolism in mice. *Biol Bratislava*. 2001;56(6):661–6.
 46. Cherng J, Shih M. Improving glycogenesis in Streptozotocin (STS) diabetic mice after administration of green algae *Chlorella*. *Life Sci*. 2006;78:1181–6.
 47. Gonzalez-Periz A, Horrillo R, Ferre N, Gronert K, Dong B, Moran-Salvador E, et al. Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by -3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. *FASEB J*. 2009 Jun 1;23(6):1946–57.
 48. Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother*. 2002;56(8):365–79.

49. Pauli JR, Cintra DE, Souza CT de, Ropelle ER. Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009;53(4):399–408.
50. Bogdanski P, Pupek-Musialik D, Dytfeld J, Jagodzinski PP, Jablecka A, Kujawa A, et al. Influence of insulin therapy on expression of chemokine receptor CCR5 and selected inflammatory markers in patients with type 2 diabetes mellitus. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2007;45(10):563–7.
51. Mine S, Okada Y, Tanikawa T, Kawahara C, Tabata T, Tanaka Y. Increased expression levels of monocyte CCR2 and monocyte chemoattractant protein-1 in patients with diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;344(3):780–5.
52. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, et al. CCR2 modulates inflammatory and metabo. *J Clin Invest.* 2006;116(1):115–24.
53. Ikeoka D, Mader JK, Pieber TR. Adipose tissue, inflammation and cardiovascular disease. *Rev Assoc Med Bras.* 2010;56(1):116–21.
54. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance. *Gastroenterology.* 2007;132(6):2169–80.
55. Cucak H, Grunnet LG, Rosendahl A. Accumulation of M1-like macrophages in type 2 diabetic islets is followed by a systemic shift in macrophage polarization. *J Leukoc Biol.* 2014;95(1):149–60.
56. Oh DY, Morinaga H, Talukdar S, Bae EJ, Olefsky JM. Increased macrophage migration into adipose tissue in obese mice. *Diabetes.* 2012;61(2):346–54.
57. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1821–1830.
58. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1796–808.
59. Al Hayek AA, Robert AA, Al Saeed A, Alzaid AA, Al Sabaan FS. Factors Associated with Health-Related Quality of Life among Saudi Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Cross-Sectional Survey. *Diabetes Metab J.* 2014;38(3):220–9.
60. Willis T. *Pharmaceutice rationalis sive diatriba de medicamentorum operationibus in humano corpore.* . [Oxford]: E Theatro Sheldoniano, M.DC.LXXXV; 1675.
61. Menninger W. Psychologic factors in the etiology of diabetes. *J Nerv Ment Dis.* 1935;81:1–13.
62. Slawson P, Flynn W, Kollar E. Psychological factors associated with the onset of diabetes mellitus. *JAMA* 1. 1963;85:96–100.
63. Pouwer F, Beekman ATF, Nijpels G, Dekker JM, Snoek FJ, Kostense PJ, et al. Rates and risks for co-morbid depression in patients with Type 2 diabetes mellitus: results from a community-based study. *Diabetologia.* 2003 Jul 1;46(7):892–8.
64. Schram MT, Baan CA, Pouwer F. Depression and quality of life in patients with diabetes: a systematic review from the European depression in diabetes (EDID) research consortium. *Curr Diabetes Rev.* 2009;5(2):112–9.
65. Pouwer F, Skinner TC, Pibernik-Okanovic M, Beekman ATF, Craddock S, Szabo S, et

- al. Serious diabetes-specific emotional problems and depression in a Croatian-Dutch-English Survey from the European Depression in Diabetes [EDID] Research Consortium. *Diabetes Res Clin Pract.* 2005 Nov;70(2):166–73.
66. Kokoszka A, Pouwer F, Jodko A, Radzio R, Mućko P, Bieńkowska J, et al. Serious diabetes-specific emotional problems in patients with type 2 diabetes who have different levels of comorbid depression: a Polish study from the European Depression in Diabetes (EDID) Research Consortium. *Eur Psychiatry.* 2009 Oct;24(7):425–30.
 67. Pouwer F, Kupper N, Adriaanse MC. Does emotional stress cause type 2 diabetes mellitus? A review from the European Depression in Diabetes (EDID) Research Consortium. *Discov Med.* 2010 Feb;9(45):112–8.
 68. The World Health Organization quality of life assessment (WHOQOL): Position paper from the World Health Organization. *Soc Sci Med.* 1995;41(10):1403–9.
 69. Pereira É, Teixeira C, Santos a Dos. Qualidade de vida: abordagens, conceitos e avaliação. *Rev bras Educ Fís Esporte.* 2012;26(2):241–50.
 70. Altınok A, Marakoğlu K, Kargin NÇ. Evaluation of quality of life and depression levels in individuals with Type 2 diabetes. *J Fam Med Prim care.* 2017;5(2):302–8.
 71. Speight J, Reaney MD, Barnard KD. Not all roads lead to Rome - A review of quality of life measurement in adults with diabetes. *Diabet Med.* 2009;26(4):315–27.
 72. Mills T, Law SK, Walt J, Buchholz P, Hansen J. Quality of life in glaucoma and three other chronic diseases: a systematic literature review. *Drugs Aging.* 2009;26(11):933–50.
 73. Lascar N, Brown J, Pattison H, Barnett AH, Bailey CJ, Bellary S. Type 2 diabetes in adolescents and young adults. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017;1–12.
 74. Browne JL, Nefs G, Pouwer F, Speight J. Depression, anxiety and self-care behaviours of young adults with Type 2 diabetes: Results from the International Diabetes Management and Impact for Long-term Empowerment and Success (MILES) Study. *Diabet Med.* 2015;32(1):133–40.
 75. Aguiar CCT, Vieira APGF, Carvalho AF, Montenegro-Junior RM. Instrumentos de avaliação de qualidade de vida relacionada à saúde no diabetes melito. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52:931–9.
 76. Zhang X, Norris SL, Chowdhury FM, Gregg EW, Zhang P. The effects of interventions on health-related quality of life among persons with diabetes: a systematic review. *Med Care.* 2007;45(9):820–34.
 77. Azocar J, Diaz A. Efficacy and safety of Chlorella supplementation in adults with chronic hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 2013;19(7):1085–90.
 78. Panahi Y, Badeli R, Karami G, Badeli Z, Sahebkar A. Complementary Therapies in Medicine A randomized controlled trial of 6-week Chlorella vulgaris supplementation in patients with major depressive disorder. *Complement Ther Med [.]* 2015;23(4):598–602.
 79. Noguchi N, Maruyama I, Yamada A. The influence of chlorella and its hot water extract supplementation on quality of life in patients with breast cancer. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2014;704619:1–7.
 80. Cani PD. Metabolism in 2013: The gut microbiota manages host metabolism. *Nat Rev*

- Endocrinol. 2013;10(2):74–6.
81. Cani PD, Osto M, Geurts L, Everard A. Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut Microbes*. 2012;3(4):279–88.
 82. Larsen N, Vogensen FK, Van Den Berg FWJ, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One*. 2010;5(2).
 83. Caricilli A, Saad M. The Role of Gut Microbiota on Insulin Resistance. *Nutrients*. 2013;5(3):829–51.
 84. Gong J, Yang C. Advances in the methods for studying gut microbiota and their relevance to the research of dietary fiber functions. *Food Res Int*. 2012;48(2):916–29. 7
 85. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper L V, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(44):15718–23.
 86. Guinane CM, Cotter PD. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. *Therap Adv Gastroenterol*. 2013;6(4):295–308.
 87. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature [Internet]*. 2012;490(7418):55–60.
 88. Khan MT, Nieuwdorp M, Bäckhed F. Microbial modulation of insulin sensitivity. *Cell Metab*. 2014;20(5):753–60.
 89. Everard A, Cani PD. Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2013;27(1):73–83.
 90. Bazhan N, Zelena D. Food-intake regulation during stress by the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Brain Res Bull*. 2013;95:46–53.
 91. Epel E, Lapidus R, McEwen B, Brownell K. Stress may add bite to appetite in women: A laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior. *Psychoneuroendocrinology*. 2001;26(1):37–49.
 92. Kerem M, Salman B, Pasaoglu H, Bedirli A, Alper M, Katircioglu H, et al. Effects of microalgae chlorella species crude extracts on intestinal adaptation in experimental short bowel syndrome. *World J Gastroenterol*. 2008;14(28):4512–7.
 93. Rai UN, Singh NK, Upadhyay AK, Verma S. Chromate tolerance and accumulation in *Chlorella vulgaris* L.: Role of antioxidant enzymes and biochemical changes in detoxification of metals. *Bioresour Technol*. 2013;136:604–9.
 94. Uchikawa T, Kumamoto Y, Maruyama I, Kumamoto S, Ando Y, Yasutake A. Enhanced elimination of tissue methylmercury in *Parachlorella beijerinckii*-fed mice. *J Toxicol Sci*. 2011;36(1):121–6.
 95. Uchikawa T, Ueno T, Hasegawa T, Maruyama I, Kumamoto S, Ando Y. *Parachlorella beyerinckii* accelerates lead excretion in mice. *Toxicol Ind Health*. 2009;25(8):551–6.
 96. Kay RA, Barton LL. Microalgae as Food and Supplement. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1991;30(6):555–73.
 97. Kang M, Kim J, Shin B, Lee H, Kim Y, Lim H, et al. Inhibitory Effect of

- Chlorophyllin on the Propionibacterium acnes - Induced Chemokine Expression. 2013;51(6):844–9.
98. Kwak JH, Baek SH, Woo Y, Han JK, Kim BG, Kim OY, et al. Beneficial immunostimulatory effect of short-term Chlorella supplementation: enhancement of Natural Killer cell activity and early inflammatory response (Randomized, double-blinded, placebo-controlled trial). *Nutr J*. 2012;11(1):53.
 99. Cheng FC, Lin A, Feng JJ, Mizoguchi T, Takekoshi H, Kubota H, et al. Effects of Chlorella on Activities of Protein Tyrosine Phosphatases, Matrix Metalloproteinases, Caspases, Cytokine Release, B and T cell Proliferations, and Phorbol Ester Receptor Binding. *J Med Food*. 2004;7(2):146–52.
 100. Cheng F-C, Feng J-J, Chen K-H, Imanishi H, Fujishima M, Takekoshi H, et al. Chlorella powder inhibits the activities of peptidase cathepsin S, PLA2, cyclooxygenase-2, thromboxane synthase, tyrosine phosphatases, tumor necrosis factor- α converting enzyme, calpain and kinases. *Int J Food Sci Nutr*. 2009;60(sup1):89–98.
 101. Grammes F, Reveco FE, Romarheim OH, Landsverk T, Mydland LT, Øverland M. *Candida utilis* and *Chlorella vulgaris* counteract intestinal inflammation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *PLoS One*. 2013;8(12).
 102. Lund A, Bagger JI, Christensen M, Knop FK, Vilsbøll T. Glucagon and type 2 diabetes: the return of the alpha cell. *Curr Diab Rep*. 2014;14(12):555.
 103. D'aleccio D. The role of dysregulated glucagon secretion in type 2 diabetes. *Diabetes, Obes Metab*. 2011;13(SUPPL. 1):126–32.
 104. Raz I, Gallwitz B. The continuing need for drug development and clinical trials in type 2 diabetes and its complications: Introduction to the RDS special issue. *Rev Diabet Stud*. 2011;8(3):288–92.
 105. Richter B, Bandeira-Echtler E, Bergerhoff K, Lerch CL. Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008;4(2):CD006739.
 106. Chacra AR. Efeito Fisiológico Das Incretinas. *Johns Hopkins Adv Stud Med [Internet]*. 2006;6(7B):S613–7.
 107. Jeong H, Kwon HJ, Kim MK. Hypoglycemic effect of *Chlorella vulgaris* intake in type 2 diabetic Goto-Kakizaki and normal Wistar rats. *Nutr Res Pract [Internet]*. 2009;3(1):23.
 108. Xu Q, Yao MX, Chen L. MicroRNAs 103 and 107: Potential molecular links between diabetes and cancer. *Chin Med J (Engl)*. 2013;126(13):2553–5.
 109. Mao Y, Mohan R, Zhang S, Tang X. MicroRNAs as pharmacological targets in diabetes. *Pharmacol Res*. 2013;75:37–47.
 110. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, et al. Plasma MicroRNA profiling reveals loss of endothelial MiR-126 and other MicroRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res*. 2010;107(6):810–7.
 111. Zhao H, Guan J, Lee H-M, Sui Y, He L, Siu JJ, et al. Up-regulated pancreatic tissue microRNA-375 associates with human type 2 diabetes through beta-cell deficit and islet amyloid deposition. *Pancreas*. 2010;39(6):843–6.

112. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, MacDonald PE, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*. 2004 Nov 11;432(7014):226–30.
113. Poy MN, Hausser J, Trajkovski M, Braun M, Collins S, Rorsman P, et al. miR-375 maintains normal pancreatic α - and β -cell mass. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(14):5813–8.
114. Zhang Y, Zhang H. Microbiota associated with type 2 diabetes and its related complications. *Food Sci Hum Wellness*. 2013;2(3–4):167–72.
115. Zhang J, Sun XJ, Chen J, Hu ZW, Wang L, Gu DM, et al. Increasing the miR-126 expression in the peripheral blood of patients with diabetic foot ulcers treated with maggot debridement therapy. *J Diabetes Complications*. 2017;31(1):241–4.
116. Camargo JL, Gross JL. [Glycohemoglobin (GHb): clinical and analytical aspects]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2004;48(4):451–63.
117. Menezes M das GS, Couto FD, Santos Junior LS, Adôrno EV, Barbosa CG, Gonçalves M de S, et al. Determinação de HbA1c por CLAE: interferência de variantes de hemoglobinas S e C e alta concentração de HbF. *J Bras Patol e Med Lab*. 2012;48(5):337–44.
118. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412–9.
119. Baptista LC, Dias G, Souza NR, Veríssimo MT, Martins RA. Effects of long-term multicomponent exercise on health-related quality of life in older adults with type 2 diabetes: evidence from a cohort study. *Qual Life Res*. 2017;26(8):2117–27.
120. Trikkalinou A, Papazafiropoulou A, Melidonis A. Type 2 diabetes and quality of life. *World J Diabetes Contents Mon*. 2017;8(4):120–71.
121. DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, Henry RR, Herman WH, Holst JJ, et al. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Prim*. 2015;1–23.
122. Ware JE, Sherbourne CD. The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection. *Med Care*. 1992;30(6):473–83. 14
123. Ciconelli RM, Ferraz MB, Santos W, Meinão I, Quaresma MR. Tradução para a língua portuguesa e validação do questionário genérico de avaliação de qualidade de vida SF-36 (Brasil SF-36). *Rev. Bras. Reumato*. 1999;39:143-50;
124. Neumann A, Schoffer O, Norstrom F, Norberg M, Klug SJ, Lindholm L. Health-related quality of life for pre-diabetic states and type 2 diabetes mellitus: a cross-sectional study in Vasterbotten Sweden. *Heal Qual Life Outcomes*. 2014;12(1):150.
125. Panahi Y, Badeli R, Karami G-R, Badeli Z, Sahebkar A. A randomized controlled trial of 6-week *Chlorella vulgaris* supplementation in patients with major depressive disorder. *Complement Ther Med*. 2015;23(4):598–602.
126. Gusmai L de F, NOvato T de S, NOgueira L de S. A influencia da qualidade de vida na adesão ao tratamento do paciente diabético: revisão sistemática. *Rev Esc Enferm USP*. 2015;49(5):839–46.
127. Pollack RM, Donath MY, LeRoith D, Leibowitz G. Anti-inflammatory agents in the treatment of diabetes and its vascular complications. *Diabetes Care*. 2016;39:S244–52.

128. Yaghini N, Mahmoodi M, Asadikaram GR, Hassanshahi GH, Khoramdelazad H, Kazemi Arababadi M. Serum levels of interleukin 10 (IL-10) in patients with type 2 diabetes. *Iran Red Crescent Med J.* 2011;13(10):752.
129. Calle MC, Fernandez ML. Inflammation and type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* 2012;38(3):183–91.
130. Garvin P, Nilsson E, Ernerudh J, Kristenson M. The joint subclinical elevation of CRP and IL-6 is associated with lower health-related quality of life in comparison with no elevation or elevation of only one of the biomarkers. *Qual Life Res.* 2016;25(1):213–21.
131. Rodrigues KF, Pietrani NT, Bosco AA, Campos FMF, Sandrim VC, Gomes KB. IL-6, TNF- α , and IL-10 levels/polymorphisms and their association with type 2 diabetes mellitus and obesity in Brazilian individuals. *Arch Endocrinol Metab [Internet].* 2017;1(0).
132. Moreira PFP, Dalboni MA, Cendoroglo M, Santos GMS, Cendoroglo MS. Postprandial interleukin-6 response in elderly with abdominal obesity and metabolic syndrome. *J Nutr Health Aging.* 2013; 17(3):206–10.
133. Chen G, Goeddel D V. TNF-R1 Signaling: A Beautiful Pathway. *Science (80-).* 2002 May 31;296(5573):1634–5.
134. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2007;117(1):175–84.
135. Bruun JM, Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. Monocyte Chemoattractant Protein-1 Release Is Higher in Visceral than Subcutaneous Human Adipose Tissue (AT): Implication of Macrophages Resident in the AT. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Apr;90(4):2282–9.
136. Dinarello CA, Donath MY, Mandrup-Poulsen T. Role of IL-1 β in type 2 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2010;17(4):314–21.
137. Herder C, Dalmas E, Böni-Schnetzler M, Donath MY. The IL-1 Pathway in Type 2 Diabetes and Cardiovascular Complications. *Trends Endocrinol Metab.* 2015;26(10):551–63.
138. Cimini FA, Barchetta I, Porzia A, Mainiero F, Costantino C, Bertocchini L, et al. Circulating IL-8 levels are increased in patients with type 2 diabetes and associated with worse inflammatory and cardiometabolic profile. *Acta Diabetol.* 2017;54(10):961–7.
139. Ene CD, Anghel AE, Neagu M, Nicolae I. Interleukin 8 and diabetic nephropathy. *Int J Bioflux Soc.* 2015;7(4):370–4.
140. Mtiraoui N, Ezzidi I, Kacem M, Ben Hadj Mohamed M, Chaieb M, Haj Jilani AB, et al. Predictive value of interleukin-10 promoter genotypes and haplotypes in determining the susceptibility to nephropathy in type 2 diabetes patients. *Diabetes Metab Res Rev.* 2009;25(1):57–63.
141. McArdle MA, Finucane OM, Connaughton RM, McMorrow AM, Roche HM. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: Insights into the emerging role of nutritional strategies. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;1–23.
142. Makki K, Froguel P, Wolowczuk I. Adipose Tissue in Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines. *ISRN*

- Inflamm.2013;2013:1–12.
143. Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti J-F. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie*. 2005 J;87(1):99–109.
 144. Tsai J-P. The association of serum leptin levels with metabolic diseases. *Tzu Chi Med J*. 2017;29(4):192.
 145. Farr OM, Gavrieli A, Mantzoros CS. Leptin applications in 2015. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2015 Oct;22(5):353–9.
 146. Fruhbeck G, Salvador J. Relation between leptin and the regulation of glucose metabolism. *Diabetologia*. 2000;43:3–12.
 147. Myers MG, Cowley MA, Münzberg H. Mechanisms of Leptin Action and Leptin Resistance. *Annu Rev Physiol*. 2008;70(1):537–56.
 148. Jaganathan R, Ravindran R, Dhanasekaran S. Emerging Role of Adipocytokines in Type 2 Diabetes as Mediators of Insulin Resistance and Cardiovascular Disease. *Can J diabetes*. 2017;1–12.
 149. Jacobo-Cejudo MG, Valdés-Ramos R, Guadarrama-López AL, Pardo-Morales R-V, Martínez-Carrillo BE, Harbige LS. Effect of n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation on Metabolic and Inflammatory Biomarkers in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Nutrients*. 2017;9(6):573.
 150. Aborehab NM, El Bishbishy MH, Waly NE. Resistin mediates tomato and broccoli extract effects on glucose homeostasis in high fat diet-induced obesity in rats. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16:1–10.
 151. Jamaluddin MS, Weakley SM, Yao Q, Chen C. Resistin: Functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease. *Br J Pharmacol*. 2012;165(3):622–32.
 152. Suragani M, Aadinarayana VD, Pinjari AB, Tanneeru K, Guruprasad L, Banerjee S, et al. Human resistin, a proinflammatory cytokine, shows chaperone-like activity. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110(51):20467–72.
 153. Hampe L, Radjainia M, Xu C, Harris PWR, Bashiri G, Goldstone DC, et al. Regulation and quality control of adiponectin assembly by endoplasmic reticulum chaperone ERp44. *J Biol Chem*. 2015;290(29):18111–23.
 154. Cintra DE, Ropelle ER, Pauli JR. *Obesidade e Diabetes - Fisiopatologia e Sinalização Celular*. São Paulo, SP: Sarvier; 2011. 405 p.
 155. Martinez-Fernandez L, Laiglesia LM, Huerta AE, Martinez JA, Moreno-Aliaga MJ. Omega-3 fatty acids and adipose tissue function in obesity and metabolic syndrome. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2015;121:1–18.
 156. Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Salvador J, Frühbeck G. Adipokines in the treatment of diabetes mellitus and obesity. *Expert Opin Pharmacother*. 2009;10(2):239–54.
 157. Gaisano HY, Macdonald PE, Vranic M. Glucagon secretion and signaling in the development of diabetes. 2012;
 158. Habegger KM, Heppner KM, Geary N, Bartness TJ, DiMarchi R, Tschöp MH. The metabolic actions of glucagon revisited. *Nat Rev Endocrinol*. 2010;6(12):689–97.

159. Campbell JE, Drucker DJ. Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell Metab.* 2013;17(6):819–37.
160. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology.* 2007;132(6):2131–57.
161. Jeong H, Kwon HJ, Kim MK. Hypoglycemic effect of *Chlorella vulgaris* intake in type 2 diabetic Goto-Kakizaki and normal Wistar rats. *Nutr Res Pract.* 2009;3(1):23–30.
162. 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. *Nat Med.* 2013 Apr 7;19(5):576–85.
163. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol Rev.* 2010;90(3):859–904.
164. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010;464(7285):59–65.
165. Wu GD, Lewis JD, Hoffmann C, Chen Y-Y, Knight R, Bittinger K, et al. Sampling and pyrosequencing methods for characterizing bacterial communities in the human gut using 16S sequence tags. *BMC Microbiol.* 2010;10(1):206.
166. Peris-Bondia F, Latorre A, Artacho A, Moya A, D’Auria G. The active human gut microbiota differs from the total microbiota. *PLoS One.* 2011;6(7).
167. Angelakis E, Armougom F, Million M, Raoult D. The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. *Future Microbiol.* 2012;7(1):91–109.
168. Ley R, Turnbaugh P, Klein S, Gordon J. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature.* 2006;444(7122):1022–3.
169. Duncan SH, Lopley GE, Holtrop G, Ince J, Johnstone AM, Louis P, et al. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes.* 2008;32(11):1720–4.
170. Delzenne NM, Cani PD. Gut microbiota and the pathogenesis of insulin resistance. *Curr Diab Rep.* 2011;11(3):154–9.
171. Finucane MM, Sharpton TJ, Laurent TJ, Pollard KS. A Taxonomic Signature of Obesity in the Microbiome? Getting to the Guts of the Matter. Heimesaat MM, editor. *PLoS One.* 2014 Jan 8;9(1):e84689.
172. Wu X, Ma C, Han L, Nawaz M, Gao F, Zhang X, et al. Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes. *Curr Microbiol.* 2010;61(1):69–78.
173. Kootte RS, Vrieze A, Holleman F, Dallinga-Thie GM, Zoetendal EG, de Vos WM, et al. The therapeutic potential of manipulating gut microbiota in obesity and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, Obes Metab.* 2012;14(2):112–20.
174. Laiteerapong N, Karter AJ, Liu JY, Moffet HH, Sudore R, Schillinger D, et al. Correlates of quality of life in older adults with diabetes: The diabetes & aging study. *Diabetes Care.* 2011;34(8):1749–53.
175. Panahi Y, Ghamarchehreh ME, Beiraghdar F, Zare R, Jalalian HR, Sahebkar A. Investigation of the effects of *Chlorella vulgaris* supplementation in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized clinical trial. *Hepatogastroenterology.*

- 2012;59(119):2099–103.
176. Nakano S, Takekoshi H, Nakano M. *Chlorella* (*Chlorella pyrenoidosa*) Supplementation Decreases Dioxin and Increases Immunoglobulin A Concentrations in Breast Milk. *J Med Food*. 2007;10(1):134–42.
 177. Nakano S, Takekoshi H, Nakano M. *Chlorella pyrenoidosa* supplementation reduces the risk of anemia, proteinuria and edema in pregnant women. *Plant Foods Hum Nutr*. 2010;65(1):25–30.
 178. Lee SH, Kang HJ, Lee HJ, Kang MH, Park YK. Six-week supplementation with *Chlorella* has favorable impact on antioxidant status in Korean male smokers. *Nutrition*. 2010;26(2):175–83.
 179. Yang M, Youn J-I, Kim SJ, Park JY. Epigenetic modulation of *Chlorella* (*Chlorella vulgaris*) on exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2015;40(3):758–63.
 180. de Souza Queiroz J, Barbosa CMV, da Rocha MC, Bincoletto C, Paredes-Gamero EJ, de Souza Queiroz ML, et al. *Chlorella vulgaris* treatment ameliorates the suppressive effects of single and repeated stressors on hematopoiesis. *Brain Behav Immun*. 2013;29:39–50.
 181. Hunter P. The inflammation theory of disease. the growing realization that chronic inflammation is crucial in many diseases opens new avenues for treatment. *EMBO Rep* . 2012;13(11):968–70.

ANEXOS

Anexo 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Nome do

paciente: _____

Data nascimento: _____ RG: _____

Endereço: _____

Telefone: _____ Setor em que trabalha/ramal: _____

Prezado(a) Senhor(a),

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar da pesquisa “**Atividade moduladora da alga *Chlorella* em pacientes com intolerância à glicose e diabetes tipo 2**”.

Objetivo e justificativa: Esta pesquisa pretende avaliar o potencial modulador da alga *Chlorella* em pacientes com distúrbios no metabolismo do açúcar. A *Chlorella* é um alimento completo utilizado há décadas como suplemento alimentar e contém todos os ingredientes necessários para promover a saúde. Apesar de alguma eficácia em levar à perda de peso, melhorar parâmetros metabólicos e reduzir as complicações, o tratamento medicamentoso do diabetes tipo 2 tem vários efeitos colaterais, que, em muitos casos, podem piorar as condições de saúde. Portanto, a busca por agentes naturais que minimizem esses efeitos indesejáveis, mas que mantenham a eficácia na regulação dos distúrbios observados nessa doença vem recebendo cada vez mais atenção da comunidade científica. Nesse sentido, a alga *Chlorella* surge como uma alternativa para o tratamento de complicações relacionadas com essa doença. Dentro desse contexto, consideramos promissora a proposta do presente estudo é investigar os efeitos do tratamento com *Chlorella* em pacientes com intolerância à glicose e com diabetes tipo 2.

Procedimentos: A alga será administrada por um período de 15 meses na dose oral de 10 g ao dia, distribuída nas duas primeiras refeições do dia. As doses foram escolhidas com base em estudos clínicos da literatura. Não há registros de efeitos colaterais decorrentes da sua utilização. Amostras de sangue periférico, fezes e urina dos voluntários serão coletadas nos tempos 0 (*baseline*), e após 3, 6, 12 e 15 meses de tratamento. A partir das amostras, serão realizados os estudos dos parâmetros bioquímicos, metabólicos e inflamatórios. A cada coleta, serão obtidas as seguintes amostras: 1 frasco coletor universal de fezes, já utilizado

no CECOM (ou o equivalente a 10 gramas), 1 frasco coletor universal de urina, já utilizado no CECOM (ou o equivalente a 50 mL de urina ou a 3 colheres e meia de sopa) e de até 50 mL de sangue (ou o equivalente a 3 colheres e meia de sopa).

Benefícios esperados: Está pesquisa poderá gerar benefícios à sociedade, pois possibilitará o estudo de uma alternativa para o tratamento profilático de complicações relacionadas ao diabetes, bem como poderá gerar benefícios diretos ao paciente, impactando positivamente a saúde geral, o bem estar e a qualidade de vida. Esclarecemos que não há garantias quanto ao efeito da *Chlorella* na evolução de sua condição clínica e não deve modificar seu tratamento padrão em função da participação no estudo (por exemplo, não deve interromper o uso de hipoglicemiantes, deve manter adesão às recomendações de dieta e exercício físico e outras recomendações médicas).

Tratamentos alternativos: A suplementação oral da dieta com a alga não irá interferir com o tratamento usual administrado ao paciente (dieta ou uso de hipoglicemiantes orais tais como: secretagogos, sensibilizadores de insulina, inibidores da absorção de carboidratos). Caso o paciente não se adapte à proposta da pesquisa ou deixe o estudo, o uso da alga será descontinuado e o paciente irá continuar com o tratamento para diabetes tipo 2 de acordo com o critério do médico responsável. Durante o período de estudo, os participantes serão concomitantemente tratados de suas condições clínicas de acordo com as diretrizes-padrão, sobretudo no que diz respeito a intolerância à glicose e diabetes e que não haverá qualquer modificação da conduta clínica decorrente da participação no estudo.

Desconfortos e riscos: Este estudo não gera riscos ou desconforto ao paciente. Estudos em seres humanos por período de até 2 anos, utilizando doses superiores a 20 gramas de *Chlorella*, não demonstraram efeitos tóxicos com o uso da alga. Apesar do uso de *Chlorella* ser considerado de baixo risco e pouco associado a efeitos colaterais, as seguintes reações podem ser observadas: diarreia, náuseas, flatulência, coloração esverdeada nas fezes e cólicas (especialmente na primeira semana de uso) e maior sensibilidade à luz solar. Em casos muito raros, a *Chlorella* pode causar: reações alérgicas (se você tem alergia ao iodo, você também pode ser alérgico à *Chlorella*), incluindo asma e manifestações respiratórias outras, que podem ser graves. A *Chlorella* pode interagir negativamente com certos medicamentos que contêm vitamina K, podendo interferir com a eficácia de medicamentos anticoagulantes, como a varfarina. Por causa de suas propriedades imunoestimulantes, não é recomendado o uso da *Chlorella* com medicamentos supressores do sistema imunológico, como a ciclosporina e o metotrexato. Recomenda-se especialmente precauções nos

seguintes casos: gravidez e amamentação (o uso deve ser evitado), hipersensibilidade ao iodo e doenças auto-imunes (esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide. As coletas de sangue para o estudo serão realizadas dentro do mesmo procedimento realizado rotineiramente pelo CECOM. Os procedimentos serão realizados por pessoal treinado de acordo com as normas vigentes de bioética e biossegurança. Embora a pesquisa não tenha riscos previsíveis, danos eventuais resultantes da participação na pesquisa são passíveis de reparação.

Monitoramento: Os pacientes serão monitorizados e os efeitos adversos, ainda que não sejam esperados, serão documentados e submetidos à apreciação do CEP utilizando-se o formulário específico (Formulário de Eventos Adversos Sérios Locais/Centro Coordenador). Na eventualidade de ocorrência de um evento adverso grave, a utilização da alga será interrompida definitivamente. Os efeitos adversos: náusea, dor abdominal, diarreia, coloração esverdeada nas fezes, cólicas e flatulência (leves) registrados durante a primeira semana serão considerados transitórios. Ao final dos 6 meses de tratamento, pacientes entrarão em período de observação. Caso o paciente não apresente progressão de doença ou toxicidades e deseje continuar o tratamento, será oferecida a oportunidade de extensão por período adicional de mais 6 meses.

Contatos:

Em caso de **dúvidas** sobre o estudo, você poderá entrar em contato com:

Pesquisador responsável: Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

Laboratório de Imunofarmacologia e Imunotoxicologia/CFU

Rua Carlos Chagas, 480 – Campinas, SP, UNICAMP

Telefone: 19 – 3521-8752 e-mail: mlsq@fcm.unicamp.br

Equipe Multidisciplinar do Cecom:

Rua Vital Brasil nº 150, Campinas, SP, UNICAMP

Telefone: 19 – 3521-9001 e-mail: css@cecom.unicamp.br

Em caso de **emergência** os voluntários poderão procurar por:

Pronto Atendimento do Cecom:

Rua Vital Brasil nº 150, Campinas, SP, UNICAMP

Telefone: 19 – 3521-9001 e-mail: css@cecom.unicamp.br

Em caso de **emergência fora do horário de funcionamento do Cecom**, os voluntários poderão procurar:

Pronto atendimento do Hospital das Clínicas da UNICAMP:

Rua Vital Brasil, 251 – Campinas, SP, UNICAMP

Telefone: 19- 3521-2121.

Em caso de **denúncias ou reclamações** sobre sua participação no estudo, você pode entrar em contato com:

Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 – Campinas, SP, UNICAMP

Telefone: 19 – 3521-8936; Fax: 19 – 3521-7187 e-mail:cep@fcm.unicamp.br

Indicação das formas de indenização ou ressarcimento de eventuais despesas: a participação na pesquisa não envolve gastos para os voluntários, assim não há previsão de ressarcimento dos mesmos.

Participação voluntária e Confidencialidade: Sua participação neste estudo é voluntária e você poderá desistir do estudo a qualquer momento. As informações desta pesquisa serão confidenciais, e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre sua participação. Nos registros, um código substituirá os nomes dos voluntários, que não serão identificados nem prejudicados com o resultado da pesquisa. É garantida aos voluntários total privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa. Você tem direito de acesso aos seus dados, resultados da progressão de seu tratamento e a possibilidade para retificar os dados de acordo com lei local e procedimentos. Você pode discutir este assunto no futuro com seu médico bem como toda equipe envolvida no estudo.

Tendo lido e entendido todas as informações apresentadas neste documento de consentimento informado, e recebido esclarecimentos sobre minhas dúvidas,

CONCORDO EM PARTICIPAR DESTE ESTUDO VOLUNTARIAMENTE.

Data: _____

Assinatura do paciente

Assinatura do pesquisador

Anexo 2

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS - UNICAMP (CAMPUS CAMPINAS)		
COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa:	Atividade moduladora da alga Chlorella em pacientes com intolerância à glicose e diabetes tipo 2.	
Pesquisador:	Mary Luci de Souza Queiroz	
Versão:	3	
CAAE:	30581114.4.0000.5404	
Instituição Proponente:	Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP	
DADOS DO COMPROVANTE		
Número do Comprovante:	036106/2014	
Patrocinador Principal:	Financiamento Próprio	

Anexo 3

SF-36 (Versão brasileira do Questionário de Qualidade de Vida SF-36)

Instruções: Esta pesquisa questiona você sobre sua saúde. Estas informações nos manterão informados de como você se sente e quão bem você é capaz de fazer atividades de vida diária. Responda cada questão marcando a resposta como indicado. Caso você esteja inseguro em como responder, por favor, tente responder o melhor que puder.

1- Em geral você diria que sua saúde é:

Excelente	Muito Boa	Boa	Ruim	Muito Ruim
1	2	3	4	5

2- Comparada há um ano atrás, como você classificaria sua idade em geral, agora?

Muito Melhor	Um Pouco Melhor	Quase a Mesma	Um Pouco Pior	Muito Pior
1	2	3	4	5

3- Os seguintes itens são sobre atividades que você poderia fazer atualmente durante um dia comum. Devido à sua saúde, você teria dificuldade para fazer estas atividades? Neste caso, quando?

Atividades	Sim, dificulta muito	Sim, dificulta um pouco	Não, não dificulta de modo algum
a) Atividades Rigorosas, que exigem muito esforço, tais como correr, levantar objetos pesados, participar em esportes árduos.	1	2	3
b) Atividades moderadas, tais como mover uma mesa, passar aspirador de pó, jogar bola, varrer a casa.	1	2	3
c) Levantar ou carregar mantimentos	1	2	3
d) Subir vários lances de escada	1	2	3
e) Subir um lance de escada	1	2	3
f) Curvar-se, ajoelhar-se ou dobrar-se	1	2	3
g) Andar mais de 1 quilômetro	1	2	3
h) Andar vários quarteirões	1	2	3
i) Andar um quarteirão	1	2	3
j) Tomar banho ou vestir-se	1	2	3

4- Durante as últimas 4 semanas, você teve algum dos seguintes problemas com seu trabalho ou com alguma atividade regular, como consequência de sua saúde física?

	Sim	Não
a) Você diminuiu a quantidade de tempo que se dedicava ao seu trabalho ou a outras atividades?	1	2
b) Realizou menos tarefas do que você gostaria?	1	2

c) Esteve limitado no seu tipo de trabalho ou a outras atividades.	1	2
d) Teve dificuldade de fazer seu trabalho ou outras atividades (p. ex. necessitou de um esforço extra).	1	2

5- Durante as últimas 4 semanas, você teve algum dos seguintes problemas com seu trabalho ou outra atividade regular diária, como consequência de algum problema emocional (como se sentir deprimido ou ansioso)?

	Sim	Não
a) Você diminui a quantidade de tempo que se dedicava ao seu trabalho ou a outras atividades?	1	2
b) Realizou menos tarefas do que você gostaria?	1	2
c) Não realizou ou fez qualquer das atividades com tanto cuidado como geralmente faz.	1	2

6- Durante as últimas 4 semanas, de que maneira sua saúde física ou problemas emocionais interferiram nas suas atividades sociais normais, em relação à família, amigos ou em grupo?

De forma nenhuma	Ligeiramente	Moderadamente	Bastante	Extremamente
1	2	3	4	5

7- Quanta dor no corpo você teve durante as últimas 4 semanas?

Nenhuma	Muito leve	Leve	Moderada	Grave	Muito grave
1	2	3	4	5	6

8- Durante as últimas 4 semanas, quanto a dor interferiu com seu trabalho normal (incluindo o trabalho dentro de casa)?

De maneira alguma	Um pouco	Moderadamente	Bastante	Extremamente
1	2	3	4	5

9- Estas questões são sobre como você se sente e como tudo tem acontecido com você durante as últimas 4 semanas. Para cada questão, por favor, dê uma resposta que mais se aproxime de maneira como você se sente, em relação às últimas 4 semanas.

	Todo o tempo	A maior parte do tempo	Uma boa parte do tempo	Alguma parte do tempo	Uma pequena parte do tempo	Nunca
a) Quanto tempo você tem se sentindo cheio de vigor, de vontade, de força?	1	2	3	4	5	6

b) Quanto tempo você tem se sentido uma pessoa nervosa?	1	2	3	4	5	6
c) Quanto tempo você tem se sentido tão deprimido que nada pode anima-lo?	1	2	3	4	5	6
d) Quanto tempo você tem se sentido calmo ou tranquilo?	1	2	3	4	5	6
e) Quanto tempo você tem se sentido com muita energia?	1	2	3	4	5	6
f) Quanto tempo você tem se sentido desanimado ou abatido?	1	2	3	4	5	6
g) Quanto tempo você tem se sentido esgotado?	1	2	3	4	5	6
h) Quanto tempo você tem se sentido uma pessoa feliz?	1	2	3	4	5	6
i) Quanto tempo você tem se sentido cansado?	1	2	3	4	5	6

10- Durante as últimas 4 semanas, quanto de seu tempo a sua saúde física ou problemas emocionais interferiram com as suas atividades sociais (como visitar amigos, parentes, etc)?

Todo Tempo	A maior parte do tempo	Alguma parte do tempo	Uma pequena parte do tempo	Nenhuma parte do tempo
1	2	3	4	5

11- O quanto verdadeiro ou falso é cada uma das afirmações para você?

	Definitivamente verdadeiro	A maioria das vezes verdadeiro	Não sei	A maioria das vezes falso	Definitivamente falso
a) Eu costumo adoecer um pouco mais facilmente que as outras pessoas	1	2	3	4	5
b) Eu sou tão saudável quanto qualquer pessoa que eu conheço	1	2	3	4	5
c) Eu acho que a minha saúde vai piorar	1	2	3	4	5
d) Minha saúde é excelente	1	2	3	4	5

Anexo 4**Fase 1: Ponderação dos dados.**

QUESTÃO	PONTUAÇÃO
1	Se a resposta for:
	1 5,0
	2 4,4
	3 3,4
	4 2,0
5 1,0	
2	Manter o mesmo valor
3	Soma de todos os valores
4	Soma de todos os valores
5	Soma de todos os valores
6	Se a resposta for:
	1 5
	2 4
	3 3
	4 2
5 1	
7	Se a resposta for:
	1 6,0
	2 5,4
	3 4,2
	4 3,1
	5 2,2
6 1,0	
8	<p>A resposta da questão 8 depende da nota da questão 7</p> <p>Se 7 =1 e se 8=1 o valor da questão é 6 Se 7=2 a 6 8=1 o valor da questão é 5 Se 7=2 a 6 8=2o valor da questão é 4 Se 7=2 a 6 8=3 o valor da questão é 3 Se 7=2 a 6 8=4 o valor da questão é 2 Se 7=2^a6 e se 8=5 o valor da questão é 1</p> <p>S a questão 7 não for respondida o escore da questão 8 passa a ser o seguinte:</p> <p>Se a resposta for 1 a pontuação será 6 Se a resposta for 2 pontuação será 4,75 Se a resposta for 3 a pontuação será 3,5</p>

	<p>Se a resposta for 4 a pontuação será 2,25 Se a resposta for 5 a pontuação será 1,0</p>
9	<p>Nesta questão a pontuação para os itens a,d,e,h deverá seguir a seguinte orientação:</p> <p>Se a resposta for 1 o valor será 6 Se a resposta for 2 o valor será 5 Se a resposta for 3 o valor será 4 Se a resposta for 4 o valor será 3 Se a resposta for 5 o valor será 2 Se a resposta for 6 o valor será 1</p> <p>Para os demais itens (b,c,f,g,i) o valor será mantido o mesmo</p>
10	Considerar o mesmo valor
11	<p>Nesta questão os itens deverão ser somados, porém nos itens b e d deve-se seguir a seguinte pontuação:</p> <p>Se a resposta for 1 o valor será 5 Se a resposta for 2 o valor será 4 Se a resposta for 3 o valor será 3 Se a resposta for 4 o valor será 2 Se a resposta for 5 o valor será 1</p>

Fase 2: Cálculo do RAW SCALE

Nesta fase será necessário transformar os valores das questões anteriores em notas de 8 domínios que variam de 0 a 100, onde 0=pior e 100=melhor para cada domínio. É chamado de raw scale porque o valor final não apresenta nenhuma unidade de medida.

DOMÍNIOS:

1. Capacidade Funcional
2. Limitação por aspectos físicos
3. Dor
4. Estado geral de Saúde
5. Vitalidade
6. Aspectos sociais
7. Aspectos Emocionais

8. Saúde Mental

Fórmula para cálculo de Domínio:

DOMÍNIO: Valor obtido nas questões correspondentes – limite inferior X 100

Variação (Score Range)

Na fórmula os valores de limite inferior e variação de (escore range) são fixos e estão estipulados na tabela abaixo:

Domínio	Pontuação da(s) questão (ões) correspondentes	Limite inferior	Variação (escore range)
Capacidade funcional	03	10	20
Limitação por aspectos físicos	04	4	4
Dor	07+08	2	10
Estado geral de saúde	01+11	5	20
Vitalidade	09 (somente p/ os itens A + E + G + I)	4	20
Aspectos sociais	06+10	2	8
Limitação por aspectos emocionais	05	3	3
Saúde mental	09 (somente p/ os itens B + C + D + F + H)	5	25