



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

MAYARA STOREL BESERRA DE MOURA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ZINCO NA RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA EM PACIENTES COM RETOCOLITE ULCERATIVA**

TERESINA

2016

**MAYARA STOREL BESERRA DE MOURA**

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ZINCO NA RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA EM PACIENTES COM RETOCOLITE ULCERATIVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Saúde da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências e Saúde. Área de concentração - Métodos diagnósticos e análises das condições de saúde.

**Orientadora:** Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

TERESINA  
2016

## FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE DISSERTAÇÃO

**Mestranda:** Mayara Storel Beserra de Moura

**Título do Projeto:** Efeito da Suplementação com Zinco na Resposta Inflamatória em Pacientes com Retocolite Ulcerativa.

**Professora Orientadora:** Prof. Dr<sup>a</sup>. Nadir do Nascimento Nogueira

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

### BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nadir do Nascimento Nogueira  
**(Presidente)**

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Luísa Pereira de Melo  
**(1º examinador)**

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria do Carmo de Carvalho e Martins  
**(2º examinador)**

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Flaviane Alves de Pinho  
**(Suplente)**

**Universidade Federal do Piauí**  
**Serviço de Processamento Técnico**  
**Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde**

M929e Moura, Mayara Storel Beserra de.  
Efeito da suplementação com zinco na resposta inflamatória em pacientes com retocolite ulcerativa / Mayara Storel Beserra de Moura. -- Teresina, 2016.  
73 f. : il.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Piauí, Pós-Graduação em Ciências e Saúde, 2016.  
"Orientadora: Profª. Drª. Nadir do Nascimento Nogueira."  
Bibliografia

1. Retocolite ulcerativa. 2. Imunidade. 3. Suplementação com zinco. I. Título. II. Teresina -- Universidade Federal do Piauí.

CDD 613.2

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que eu era antes.”*

*(Martin Luther King)*

*À Deus, que permite que eu sinta sua presença todos os dias, nos mais simples  
acontecimentos.*

*Aos meus pais, José Bezerra de Moura e Vanira Storel de Moura, que apoiaram todas as  
minhas escolhas e proporcionaram meios para que eu pudesse concretizá-las.*

## **Agradecimentos**

**A Deus**, por me proporcionar sentir sua presença todos os dias e fazer acreditar que era possível, mesmo diante das dificuldades. Por colocar no meu caminho pessoas tão acolhedoras e tão dispostas a ajudar e não me deixar desanimar e desistir diante dos obstáculos. Por me fazer sentir abençoada e amada.

**À minha orientadora Dr.<sup>a</sup> Nadir do Nascimento Nogueira**, por aceitar me orientar quando não tinha obrigação, abrindo as portas do laboratório para que eu pudesse integrar sua equipe e assim realizar um dos meus maiores sonhos. Por todas as orientações tão valiosas e oportunidades que me foram fornecidas.

**Aos meus pais**, José Bezerra de Moura e Vanira Storel de Moura, pelo amor, pelo apoio, pelas palavras nos momentos de desânimo e por acreditarem que posso conseguir chegar onde quero. AMO vocês.

**Aos meus irmãos**, Dayana Storel Bezerra de Moura, por suportar com tanta calma meus momentos de estresse, e Romulo Storel Bezerra de Moura, por me tirar dos sufocos e do desespero nas vezes em que meu computador não queria colaborar. AMO vocês.

**Ao meu sobrinho-afilhado Saulo José Storel de Moura Abreu**, por sua alegria, beijos e abraços sempre confortantes e que me dão força e ânimo para seguir em frente. Dindinha AMA MUITO você.

**À minha parceira de pesquisa, Nina Rosa Mello Soares**, por fazer valer a palavra parceria; pela paciência e dedicação em repassar sua experiência em laboratório; pelas conversas e debates tão enriquecedores sobre pesquisa; pela amizade e companheirismo que nunca deixaram a desejar.

**À minha amiga, Cintia S. Pinheiro**, por se fazer presente mesmo distante; pelas palavras e brincadeiras, por sua paciência e dedicação do seu tempo, mesmo por telefone. Amiga, você é especial.

**Aos amigos “Jumanjis”:** **Mayara Monte Feitosa, Ana Regina de Sousa Araújo, Deylane Teles de Menezes, Susy Érica de Lima Barros, Thiago Maciel Menezes, Thiago Pinheiro e novamente Nina Rosa Mello Soares,** pelo apoio, conversas e pelos inúmeros momentos de alegria que foram tão importantes nesses anos de mestrado.

**À Dr.<sup>a</sup> Flaviane Alves de Pinho,** pela dedicação do seu valioso tempo, por repassar com tanta boa vontade e dedicação seus conhecimentos em laboratório, pelas conversas tão enriquecedoras e pelo auxílio nas análises das citocinas.

**Ao prof. Dr. Edivan Carvalho Vieira,** pela gentileza em disponibilizar o laboratório do Grupo de Instrumentação Analítica e Preparo de Amostras e pelo o auxílio na etapa de digestão das amostras de sangue.

**À prof. Dr.<sup>a</sup> Dilina do Nascimento Marreiro** pelas importantes contribuições na etapa de qualificação do projeto, imprescindíveis para o adequado seguimento da pesquisa.

**Ao Dr. José Miguel Luz Parente** por suas orientações e auxílio junto ao Hospital Universitário da Universidade Federal do Piauí.

**Ao prof. Dr. Adalberto Socorro da Silva** pelas contribuições nas etapas de construção e qualificação do projeto, foram fundamentais para a realização do mesmo.

**Ao prof. Dr. José Machado Moita Neto,** pelo auxílio na análise estatística.

**Ao prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa,** por disponibilizar gentilmente o citômetro de fluxo para a determinação das citocinas.

**Ao Dr. Jardes Figuerêdo do Rêgo,** pelo auxílio na etapa de digestão das amostras de sangue.

**À doutoranda Débora Cavalcante Braz,** pelo auxílio com a citometria de fluxo para a determinação das citocinas.

**Ao Thomas Magno Costa Silva,** pela dedicação do seu tempo e auxílio com a digestão das amostras de sangue e análises do zinco.



**À família LANEX**, pelo apoio e carinho, em especial a Larissa Cristina, pelas conversas e debates científicos.

**Aos pacientes** pela disponibilidade, confiança e colaboração com a pesquisa. Vocês são pessoas fundamentais para o progresso da ciência.

**Às atendentes do HU**, pelo auxílio no recrutamento dos pacientes para a pesquisa.

**Aos técnicos de enfermagem do laboratório de coleta de sangue do HU-UFPI**, pela coleta de sangue dos pacientes feita de forma tão carinhosa.

**Aos funcionários de Serviços Gerais do Departamento de Nutrição, em especial à Dona Maisa e Seu Oswaldo**, pelo auxílio durante os trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Nutrição Experimental e por nos esperar até tarde na noite quando tínhamos trabalho no laboratório.

**À UFPI**, pelo apoio financeiro e pela infraestrutura dos laboratórios de Nutrição Experimental, GRIAPA e LASAN, essenciais para as análises bioquímicas.

**Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Saúde** pelas sábias contribuições, oportunizando-me o olhar científico.

**Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Saúde**, por serem sempre prestativos e atenciosos, em especial a Edilene.

**Aos colegas de turma, em especial ao amigo José Carlos Castelo Branco Ribeiro (*in memoriam*)**, pelos momentos de trocas científicas e descontração. Valeu muito a pena o tempo que passamos juntos dentro e fora da sala de aula.

**À CAPES**, pela concessão da bolsa de estudos.

**À UESPI**, por disponibilizar o espectrofotômetro de absorção atômica do Núcleo Interinstitucional de Geração de Novas Tecnologias (GERATEC) para a determinação do zinco.

**À FAPEPI**, pelo financiamento do projeto, tornando possível a conclusão do mesmo.

## RESUMO

MOURA, S. B. de M. **Efeito da Suplementação com Zinco na Resposta Inflamatória em Pacientes com Retocolite Ulcerativa**. 2016. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciências e Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina – PI.

**INTRODUÇÃO:** A Retocolite Ulcerativa (RCU) é uma doença inflamatória intestinal que afeta a mucosa do cólon. A patogênese não está clara, porém há complexa interação entre fatores genéticos, ambientais e imunológicos. Pacientes com RCU apresentam desequilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias, resultando em inflamação exacerbada. O zinco é importante na manutenção das células T e na ativação da timulina. Por ter propriedades anti-inflamatórias, esse mineral pode ser um coadjuvante no tratamento de pacientes com RCU. Este trabalho avaliou o efeito da suplementação com zinco na resposta inflamatória de pacientes com RCU.

**METODOLOGIA:** Ensaio clínico, unicego, que envolveu 41 pacientes com Retocolite Ulcerativa, na faixa etária de 18 a 70 anos, distribuídos em dois grupos: grupo suplementado (n= 23) e grupo placebo (n= 18). Os pacientes do grupo suplementado receberam cápsulas com 35 mg de gluconato de zinco durante 60 dias, e o grupo placebo recebeu amido de milho em cápsulas por igual período. A ingestão dietética dos macronutrientes e zinco foi investigada por meio de registro alimentar de três dias, analisados no *software* “Nutwin”, versão 1.5.2.51. As concentrações plasmáticas e eritrocitárias do mineral foram analisadas por espectrofotometria de absorção atômica em chama. As concentrações da citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  foram determinadas por citometria de fluxo. Realizou-se a análise estatística no *software* SPSS for Windows versão 20.0, adotando-se o nível de significância de 5%. **RESULTADOS:** Os pacientes apresentavam baixo percentual de probabilidade de adequação da ingestão energética. Quanto aos macronutrientes, esses estavam de acordo com as recomendações. O grupo suplementado tinha menor percentual de probabilidade de adequação da ingestão de zinco em relação ao placebo. As concentrações plasmáticas e eritrocitárias no grupo suplementado tiveram diferenças significativas entre os tempos de estudo. A intervenção resultou em alterações significativas nas concentrações das interleucinas IL-2 e IL-10 sem diferença para as demais investigadas ( $p > 0,05$ ). Houve correlação significativa positiva no grupo suplementado entre IL-2/TNF- $\alpha$  e TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  no T0 e entre TNF- $\alpha$ /IL-2, IL-4/IL-2, IL-6/IL-2, e IL-4/TNF- $\alpha$  no T1. **CONCLUSÃO:** A suplementação com o gluconato de zinco mostrou-se eficaz em relação ao estado nutricional relativo ao mineral, refletindo no processo inflamatório, pela redução das citocinas IL-2 e IL-10, em pacientes com Retocolite Ulcerativa.

**Palavras-chave:** Retocolite Ulcerativa; Zinco; Imunidade.

## ABSTRACT

**MOURA, S. B. de M. Effect of supplementation with zinc in the Response Inflammatory in Patients with Ulcerative Colitis, 2016.** Thesis (Master) - Master's Graduate Program in Science and Health, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí.

**INTRODUCTION:** Ulcerative Colitis (UC) is an inflammatory bowel disease that affects the lining of the colon. The pathogenesis is unclear, but there is a complex interaction between genetic, environmental and immunological factors. Patients with UC have imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines, resulting in inflammation exacerbated. Zinc is important in maintaining T cell activation and thymulin. To have anti-inflammatory properties, this mineral may be useful in treating these individuals. This study evaluated the effect of zinc supplementation on the inflammatory response of patients with ulcerative colitis. **METHODS:** Clinical, unicego, which involved 41 patients with Ulcerative Colitis, aged 18-70 years characterized into two groups: supplemented group (n = 23) and placebo group (n = 18). Patients in the supplemented group received capsules with 35 mg of zinc gluconate for 60 days and the placebo group received corn starch capsules for the same period. Dietary intake of macronutrients and zinc was investigated by food record three days, analyzed by software "Nutwin" version 1.5.2.51. Plasma concentrations and erythrocyte mineral were analyzed by atomic absorption spectrometry in flame. The concentrations of the cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  were determined by flow cytometry. We conducted a statistical analysis in SPSS for Windows version 20.0, adopting the significance level of 5%. **RESULTS:** The patients had low percentage of probability of adequacy of energy intake. As for macronutrients, were in accordance with the recommendations. The supplemented group had a lower percentage of probability of adequacy of zinc intake relative to placebo. Plasma concentrations and erythrocyte in the supplemented group had significant differences between the time of the study. Cytokines no significant difference in their concentrations at different timepoints except for IL-2 and IL-10. The supplemented group showed positive correlations at T0 between IL-2 / TNF- $\alpha$  and TNF- $\alpha$  / IFN- $\gamma$ ; in T1 for TNF- $\alpha$  / IL-2, IL-4 / IL-2, IL-6 / IL-2 and IL-4 / TNF- $\alpha$ . **CONCLUSION:** Supplementation with zinc gluconate was effective in relation to the nutritional status of the mineral, reflecting the inflammatory process by reducing the IL-2 and IL-10 in patients with Ulcerative Colitis.

**Keywords:** Ulcerative Colitis; Zinc; Immunity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1</b> - Sistema imune intestinal saudável e inflamado.....	<b>20</b>
<b>FIGURA 2</b> – Fluxograma do protocolo experimental do estudo .....	<b>30</b>
<b>FIGURA 3</b> Atividade da Doença segundo escore de Mayo nos diferentes tempos de intervenção .....	<b>40</b>
<b>FIGURA 4</b> – Percentuais de adequação do consumo de calorias, segundo as recomendações nutricionais .....	<b>41</b>
<b>FIGURA 5</b> – Probabilidade de adequação da ingestão de zinco, segundo as recomendações nutricionais .....	<b>42</b>
<b>FIGURA 6</b> - Correlação linear de Spearman entre as concentrações séricas de citocinas em pacientes com RCU do grupo suplementado no T0 .....	<b>44</b>
<b>FIGURA 7</b> - Correlação linear de Spearman entre as concentrações séricas de citocinas em pacientes com RCU no grupo suplementado no T1 .....	<b>45</b>
<b>FIGURA 8</b> - Correlação linear de Spearman entre as concentrações séricas de citocinas em pacientes com RCU no grupo placebo no T1 .....	<b>46</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – Condições de trabalho de forno micro-ondas para digestão de amostras sanguíneas .....	<b>34</b>
<b>TABELA 2</b> – Valores médios e desvios padrão de energia e macronutrientes dos pacientes com Retocolite Ulcerativa .....	<b>39</b>
<b>Tabela 3</b> – Valores médios e desvios padrão das concentrações plasmática e eritrocitária de zinco dos pacientes com RCU nos diferentes grupos e tempos estudados .....	<b>42</b>
<b>Tabela 4</b> – Concentrações séricas de citocinas dos pacientes com Retocolite Ulcerativa nos diferentes grupos e tempos estudados .....	<b>44</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APC's** – Células apresentadoras de antígenos
- CDs** – Células dendríticas
- DC** – Doença de Crohn
- DII** – Doença Inflamatória Intestinal
- DRI's** – *Dietary Reference Intakes*
- EAR** - Necessidade média estimada
- EROs** – Espécies reativas de oxigênio
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** -Peróxido de hidrogênio
- HNO<sub>3</sub>** -Ácido nítrico
- IFN- $\gamma$**  – Interferon- $\gamma$
- IL-10** – Interleucina 10
- IL-17** – Interleucina 17
- IL-2** – Interleucina 2
- IL-4** – Interleucina 4
- IL-6** – Interleucina 6
- MO** – Micro-organismos
- PAMPs** - padrões moleculares associados à patógenos
- RCU** – Retocolite Ulcerativa
- TACO** - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
- TCLE** - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- TGI** – Trato Gastrointestinal
- Th1**- Linfócito helper tipo 1
- Th2** - Linfócito helper tipo 2
- TNF- $\alpha$**  – Fator de Necrose Tumoral alfa
- UFPI** - Universidade Federal do Piauí

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>17</b>
2.1 <i>Retocolite Ulcerativa: aspectos clínicos, fisiopatológicos e epidemiológicos</i> ..	17
2.1.1 <i>Processo inflamatório na Retocolite Ulcerativa</i> .....	18
2.1.2 <i>Citocinas e Retocolite Ulcerativa</i> .....	21
2.2 <i>Zinco: aspectos metabólicos e imunológicos</i> .....	23
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
3.1 <i>Objetivo Geral</i> .....	28
3.2 <i>Objetivos Específicos</i> .....	28
<b>4 CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
4.1 <i>Caracterização do Estudo e Protocolo Experimental</i> .....	29
4.2 <i>Avaliação do consumo alimentar</i> .....	31
4.3 <i>Coleta e separação de material biológico</i> .....	31
4.3.1 <i>Coleta de sangue</i> .....	31
4.3.1.1 <i>Controle de contaminação e preparo dos reagentes</i> .....	32
4.3.1.2 <i>Separção dos componentes do sangue</i> .....	32
4.3.2 <i>Separção dos componentes do sangue</i> .....	32
4.4 <i>Determinação do zinco plasmático e eritrocitário</i> .....	33
4.4.1 <i>Digestão das amostras</i> .....	33
4.4.1.1 <i>Digestão do plasma</i> .....	33
4.4.1.2 <i>Digestão dos eritrócitos</i> .....	33
4.5 <i>Determinação do zinco plasmático</i> .....	34
4.6 <i>Determinação do zinco eritrocitário</i> .....	35
4.6.1 <i>Determinação da hemoglobina</i> .....	35
4.7 <i>Determinação das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN-<math>\gamma</math> e TNF</i> ....	36
4.8 <i>Análise estatística</i> .....	37
4.9 <i>Aspectos éticos</i> .....	37
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>47</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>53</b>
<b>APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</b> .....	<b>61</b>

<b>APÊNDICE B – Protocolo de acompanhamento dos pacientes .....</b>	<b>63</b>
<b>APÊNDICE C – Diário Alimentar .....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO A – Escore de Mayo .....</b>	<b>69</b>
<b>ANEXO B - Parecer Consubstanciado do CEP .....</b>	<b>70</b>
<b>ANEXO C - Carta de aprovação do CEP / HU .....</b>	<b>73</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Doenças inflamatórias intestinais (DII) são inflamações crônicas, recorrentes, idiopáticas do trato gastrointestinal de etiologia desconhecida e que apresentam dois fenótipos distintos: Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU) (HISAMATSU et al., 2012; MARTIN; CHAN; HART, 2015).

A RCU envolve sempre o cólon e afeta apenas as camadas superficiais da mucosa e submucosa da parede intestinal (ORDÁS et al., 2012). Tem como sintomas característicos: sangramento retal, diarreia sanguinolenta persistente e cólica abdominal (BAUMGART; SANDBORN, 2007).

Embora a exata causa das DII permaneça indeterminada, as condições parecem estar relacionadas a combinações de fatores ambientais e genéticos, onde se descrevem uma grande variedade de genes de baixa expressão interagindo com fatores ambientais, e desencadeando processo inflamatório multissistêmico (ACTIS; ROSINA, 2013).

Em indivíduos saudáveis, o equilíbrio imunológico intestinal é mantido entre as células T reguladoras ( $T_{reg}$ ) e as células  $T_{efetoras}$  (Th1, Th2, Th17). Em pacientes com inflamação intestinal as disfunções das células epiteliais contribuem para o aumento à exposição bacteriana, que pode resultar na ativação de células apresentadoras de antígeno (APCs) e, conseqüentemente, aumento nos níveis de  $TCD4^+$  na lâmina própria, principalmente daquelas com ação inflamatória (ABRAHAM; CHO, 2009). Esse acúmulo resulta no desequilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12) e anti-inflamatórias (IL- 4, IL-10, IL-11 e IL- 3), gerando resposta inflamatória exacerbada (KORZENIK; PODOLSKI., 2006).

O processo inflamatório das lesões intestinais pode levar o paciente à desnutrição, não só pela atividade da doença, mas também por anorexia, má absorção de nutrientes, estresse oxidativo, necessidades nutricionais aumentadas e uso de medicamentos (SANTOS et al., 2015).

O zinco funciona como modulador da resposta imune, sua biodisponibilidade é regulada por proteínas transportadoras. A falha deste mecanismo resulta na alteração da sobrevivência, proliferação e diferenciação das células de diferentes órgãos e sistemas, em particular, as células do sistema imunitário (BONAVENTURA; BENEDETTI; ALBARÈDE et al., 2015).

Considerando que a patogênese das DII possui fortes componentes inflamatórios, e evidências da participação do zinco na modulação da resposta imune nessas doenças, pretende-se com este estudo contribuir para o melhor entendimento acerca da participação do zinco na resposta inflamatória na Retocolite Ulcerativa.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Retocolite Ulcerativa: aspectos clínicos, fisiopatológicos e epidemiológicos

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) são desordens inflamatórias crônicas que afetam o trato gastrointestinal, com pico de acometimento no início da segunda à quarta década de vida. Existem duas principais formas clínicas de DII: Doença de Crohn (DC), que pode afetar qualquer parte do trato gastrintestinal, e Retocolite Ulcerativa (RCU) que afeta apenas a mucosa e submucosa da parede intestinal (BEERY; KANE, 2014; GEREMIA et al., 2014; KASER et al., 2010; ORDÁS et al., 2012).

A RCU apresenta três sintomas característicos: sangramento retal, diarreia sanguinolenta e dores abdominais (CONRAD; ROGGENBUCK; LAASS, 2014). Outros sintomas incluem urgência fecal grave como resultado da diminuição da complacência retal, irritabilidade, perda de peso e mal-estar geral. O curso clínico da doença normalmente é caracterizado por períodos de remissão pontuados por recidivas imprevisíveis (BAUMGART; SANDBORN, 2007). A patogênese das DII ainda não está clara, mas sabe-se que há complexa interação entre fatores genéticos, ambientais e imunológicos. Existem evidências de que a origem dessas doenças está associada à resposta imune inadequada ou exagerada aos constituintes normais da microbiota intestinal em indivíduos predispostos geneticamente (HO; BOYAPATI; SATSANG, 2015, KASER et al., 2010; KHOR *et al.*, 2011), resultando no desequilíbrio entre o número de células T reguladoras ( $T_{regs}$ ) e T efectoras ( $T_{efectoras}$ ) no sangue periférico e na mucosa do cólon inflamado (WANG et al., 2011).

Porém, a concordância relativamente mais fraca em pares de gêmeos monozigóticos com RCU (6-14%) em comparação com DC (44-50%) aponta que fatores ambientais são mais importantes do que os genéticos na patogênese da doença (ORHOLM et al., 2000, SANCHEZ-MUNOZ et al., 2008).

A incidência anual de RCU foi de 24,3 por 100.000 pessoas/ano na Europa, 6,3 por 100.000 pessoas/ano na Ásia e no Oriente Médio, e 19,2 por 100.000 pessoas/ano na América do Norte (MOLODECKY et al., 2012). Um aspecto interessante, porém ainda não elucidado, é o aumento da incidência dessas

doenças em países cujas condições socioeconômicas vêm sendo melhoradas, como, por exemplo, na América Latina

No Brasil, os estudos sobre a incidência e prevalência das DII são escassos. De acordo com Victoria, Sasaki e Nunes (2009), as taxas de incidência aumentaram de 1,0 para 8,0 casos/100.000 habitantes e a prevalência aumentou de 1,0 para 20,5 casos/100.000 habitantes no período de 1986 a 2005. Verificou-se também predomínio no sexo feminino em ambas as doenças.

Estudo recente no Piauí, em uma instituição de referência para o tratamento e acompanhamento das DII, verificou que dos 252 pacientes, 39,7% tinham DC e 60,3% RCU. Houve também predomínio do sexo feminino 1,3:1,0 para a RCU. A ocorrência do índice anual subiu de 0,08/100.000 habitantes/ano em 1988 para 1,53/100.000 habitantes/ano em 2007. Em 2012, a prevalência da DII na instituição do estudo foi de 12,8 casos/100.000 habitantes (PARENTE et al., 2015).

### 2.1.1 Processo inflamatório na Retocolite Ulcerativa

A saúde intestinal depende da interação benéfica entre hospedeiro e micro-organismos (MO), principalmente no cólon, que abriga o maior e mais diversificado número de MO do que qualquer outro órgão (GILL et al., 2006; PETERSON et al., 2008).

A superfície epitelial do TGI constitui uma barreira física contra o meio externo, proporcionando assim a primeira camada de defesa contra a infecção. O muco constitui o segundo meio de defesa. A camada de muco é constituída por complexa rede de proteínas antimicrobianas que cobrem a superfície epitelial do trato gastrointestinal, impedindo assim que os MO alcancem as células epiteliais. O terceiro mecanismo de defesa é composto por células do sistema imunológico. Juntos, a camada de muco, as células epiteliais e as células do sistema imunológico, constituem a barreira da mucosa intestinal, prevenindo que MO comensais e patógenos oportunistas cheguem aos sítios sistêmicos. No entanto, muitos patógenos escapam de algumas defesas do hospedeiro desencadeando doenças em indivíduos saudáveis (PEREZ-LOPEZ et al., 2016).

A resposta imune inata, diferentemente da adaptativa, é inespecífica e não confere memória imunológica. As células imunes do sistema inato, tais como células

dendríticas (CDs), macrófagos, células epiteliais intestinais e miofibroblastos, podem detectar a microbiota intestinal e responder aos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Isto permite a iniciação de respostas inflamatórias de forma rápida e eficaz contra a invasão microbiana. Além disso, as CDs são células apresentadoras de antígenos (APC's) responsáveis pela ativação de células T e a indução de respostas imunitárias adaptativas (GEREMIA et al., 2014).

Durante a ativação do Receptor de Células T (TCR) em um determinado meio de citocinas, células TCD4<sup>+</sup> inativas podem diferenciar-se em linhagens de células T<sub>efetoras</sub> (Th), incluindo Th1, Th2, Th17 e T<sub>reg</sub>, definidas pelo seu padrão de produção de citocinas e função (ZHU; YAMANE PAUL et al., 2010).

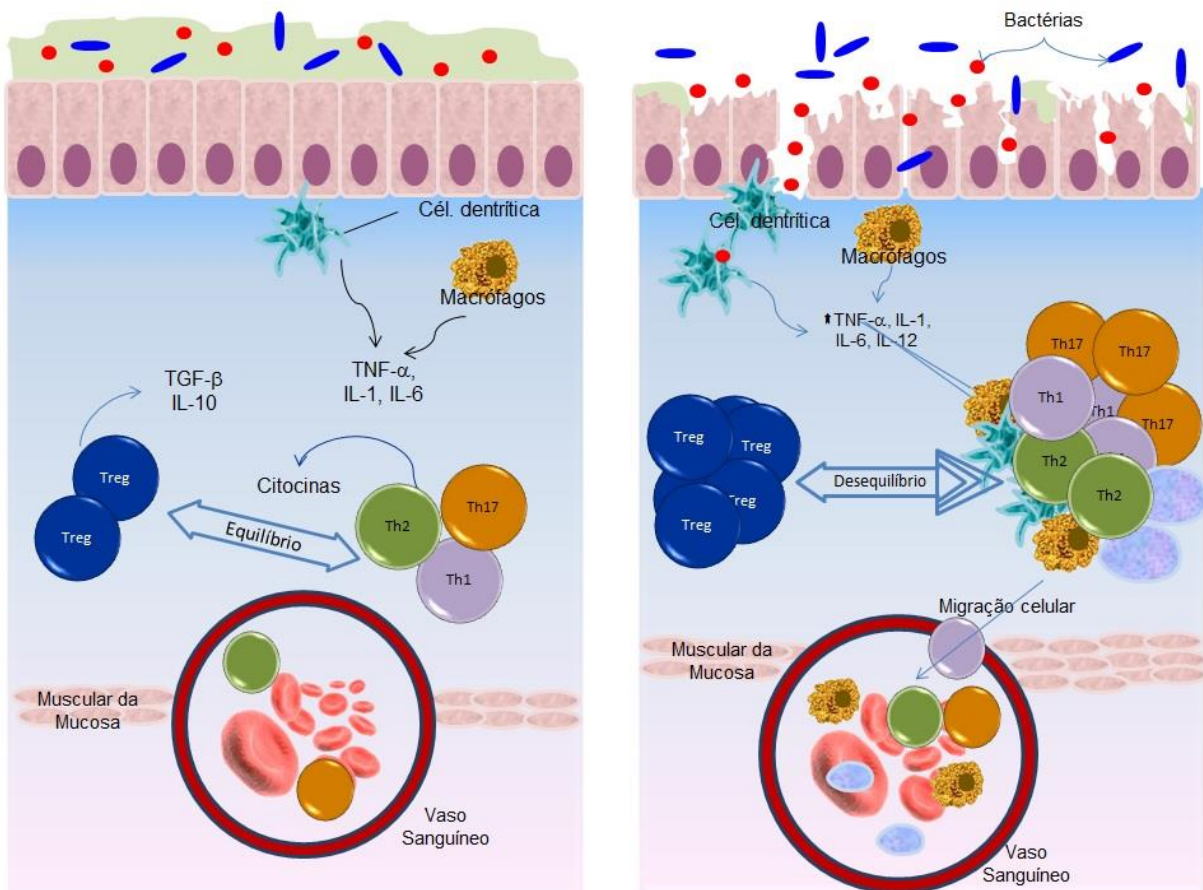
Em indivíduos saudáveis o equilíbrio homeostático intestinal é mantido entre células T<sub>reg</sub> e T<sub>efetoras</sub> (Th1, Th2, Th17). A lâmina própria contém diversificado conjunto de células imunes e citocinas secretadas, como os mediadores anti-inflamatórios (TGF- $\beta$  e a IL-10), que estabelecem respostas imunes regulares, bem como mediadores pró-inflamatórios que limitam a entrada excessiva de MO intestinais e defendem contra patógenos (FIGURA 1) (ABRAHAM; CHO, 2009, BAMIAS; ARSENEAU; COMINELLI, 2014).

Em pacientes com inflamação intestinal, a associação entre vários eventos contribuem para o aumento da exposição bacteriana, incluindo alterações na camada de muco, a desregulação de junções apertadas do epitélio intestinal, aumento da permeabilidade intestinal e da adesão bacteriana a essas células epiteliais. Esta disfunção pode ativar as APC's, que conduzem os mesmos para as células TCD4<sup>+</sup>, em órgãos linfóides secundários, modulando a diferenciação dos subgrupos de células TCD4<sup>+</sup> em células T<sub>efetoras</sub> (Th1, Th2, Th17) e células T<sub>reg</sub> (FIGURA 1) (ABRAHAM; CHO, 2009; BAMIAS; ARSENEAU; COMINELLI, 2014, NEURATH, 2014).

O incremento nos níveis de células TCD4<sup>+</sup> na lâmina própria, especialmente dos subgrupos infamatórios, induz o recrutamento celular e aumento das concentrações de citocinas e quimiocinas, resultando na maior mobilização de leucócitos para a área inflamada. Esse acúmulo resulta no desequilíbrio entre citocinas com atividade pró-inflamatórias (TNF - $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12) e anti-inflamatórias (IL- 4 , IL-10 , IL-11 e IL- 3 ), gerando resposta inflamatória exacerbada (ABRAHAM; CHO, 2009; KORZENIK; PODOLSKI., 2006).

Nos indivíduos com RCU, essas disfunções tornam-se permanentes, com limitada capacidade para combater a adesão de patógenos e reparar traumas agudos, estabelecendo a inflamação crônica (BAMIAS; ARSENEAU; COMINELLI, 2014).

**FIGURA 1 – Sistema imune intestinal saudável e inflamado.**



Fonte: A própria autora.

O imunofenótipo da reação inflamatória parece ser distinto entre a DC e a RCU. A DC é frequentemente descrita como uma doença mediada por linfócitos T efetor 1 (Th1), cujos mediadores inflamatórios são as citocinas IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , enquanto a RCU pela ação dos linfócitos T efetor 2 (Th2), devido à expressão intestinal aumentada de citocinas, como a IL-4, IL-5 e IL-13 (MUZES et al., 2012).

No entanto, este conceito de polarização de respostas Th1/DC *versus* Th2/RCU tem sido questionado por estudos que relatam aumento da regulação de IL-4 ou IL-5 em DC, e de citocinas Th1 na RCU (CARVALHO, et al., 2003). Na RCU, a resposta favorável ao anti-TNF- $\alpha$  sugere a participação da resposta Th1 na sua

patogênese (HANAUER, 2006). Essas constatações têm levado pesquisadores a sugerir um novo modelo de “natureza fásica” da patogênese da DII, no qual as citocinas do tipo Th1 e Th2 exercerão funções e atividades distintas, a depender da fase da doença (PIZARRO; COMINELLI, 2007).

### 2.1.2 Citocinas e Retocolite Ulcerativa

As citocinas constituem um grupo complexo de glicoproteínas que ocorrem naturalmente e são produzidas quando o sistema imune é ativado por uma infecção, antígeno ou autoantígeno (BUCHBINDER; McDERMOTT, 2014).

Diferentes citocinas e outros mediadores inflamatórios têm sido identificados na RCU e na DC. A produção dessas proteínas por células inflamatórias e macrófagos desempenha papel crítico na lesão do tecido do cólon, modulando importantes funções celulares como a proliferação e diferenciação celular (HISAMATSU et al., 2012).

A interleucina 2 (IL-2) é uma proteína  $\alpha$ -helicoidal, de 15 kDa predominantemente produzida por células T ativadas por antígeno, que se liga a um receptor de alta afinidade, encontrado em células  $T_{reg}$  e linfócitos T recém ativados por antígeno (MALEK; CASTRO, 2010).

A estimulação com IL-2 é fundamental para a manutenção de células  $T_{reg}$  e para a diferenciação de células  $TCD4^+$  em subconjuntos de células  $T_{efetoras}$ . Para as células  $TCD8^+$ , sinais de IL-2 otimizam tanto a geração de células  $T_{efetoras}$  quanto a diferenciação em células de memória (BOYMAN; SPRENT, 2012).

A interleucina IL-4 é a principal interleucina reguladora da diferenciação de linfócitos Th2 (GUO; HU-LI; PAUL, 2005). Essa citocina inibe a diferenciação de células Th1, induz a proliferação e diferenciação de células B, aumenta a expressão de MHC-II, possibilitando maior ativação de Th2 (SATO et al., 1993).

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina secretada por células T e macrófagos. Tem-se mostrado importante na patogênese das DII e como mediador da resposta de fase aguda (ATREYA; NEURATH, 2005) ao induzir a liberação de proteínas de fase aguda no fígado, como a Proteína C Reativa (PCR) (BECKER et al., 2004). Exerce atividade tanto nas respostas imune inata quanto na adaptativa. É sintetizada por monócitos, células endoteliais, fibroblastos e outras células em

resposta a micro-organismos e também à estimulação por outras citocinas, e é considerada uma citocina pró-inflamatória (SOUZA et al., 2008).

A IL-6 modula a resistência das células T contra a apoptose, induz a ativação de células  $T_{\text{efetoras}}$  e controla o equilíbrio entre as células  $T_{\text{regs}}$  e células Th17, promovendo ambiente pró-inflamatório em que as respostas  $T_{\text{regs}}$  são suprimidas (MARKUS; NEURATH; SUSETTA, 2011; KIMURA; KISHIMOTO, 2010).

As células Th17 ( $CD4^+$ , IL-17<sup>+</sup>), produtoras da IL-17, induzem a mobilização, recrutamento e ativação de neutrófilos e desencadeiam a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas por várias células alvos, incluindo células intestinais, endoteliais e macrófagos (WEAVER et al, 2007). São abundantes no intestino, especialmente no íleo terminal, onde são induzidas por citocinas (IL-6 e IL-23) que são reguladas positivamente em resposta a componentes da microbiota (IVANOV et al, 2009; JIANG et al, 2014).

Em contraste com as células Th1 e Th2, que dependem das respectivas citocinas efetoras (IFN- $\gamma$  e IL-4) para diferenciação, as células Th17 não requerem IL-17 para seu desenvolvimento. Este é ampliado e estabilizado pelas interleucinas 21 e 23 (KRYCZEC et al., 2008).

As regiões mais inflamadas do colón de pacientes com RCU apresentam concentrações elevadas de células Th17 e IL-17, enquanto estão ausentes no cólon e reto de indivíduos saudáveis (FONSECA-CAMARILLO et al., 2011, GONG et al., 2015). Associados a baixas concentrações de células  $T_{\text{reg}}$ , estes resultados estão positivamente correlacionados com o índice de atividade clínica e endoscópica da doença, confirmando que o desequilíbrio imunológico Th17/ $T_{\text{reg}}$  pode desempenhar um papel crucial no desenvolvimento da RCU (GONG et al., 2015).

As citocinas secretadas por diferentes tipos de células T pró-inflamatórias são mediadores centrais das lesões na mucosa inflamada de pacientes com DII. Em particular, o IFN- $\gamma$ , produzido por células Th1, induz apoptose do enterócito e aumenta a ativação de monócitos/macrófagos, desencadeando liberação de TNF- $\alpha$ . Assim, as células Th1 são uma fonte importante de TNF- $\alpha$  (MACDONALD et al., 2012, RODRÍGUEZ et al., 2005).

O TNF- $\alpha$  exerce diversas funções pró-inflamatórias na mucosa inflamada na DII. Essa citocina induz hipervascularização e angiogênese, estimula a produção de outras citocinas pró-inflamatórias e de células T, induz a diferenciação das células



estromais em miofibroblastos e promove a produção de metaloproteinases de matriz (MMPs). Essas últimas são enzimas que promovem a degradação tecidual e induzem a apoptose dos enterócitos por digestão da membrana basal. Portanto, TNF- $\alpha$  liga as respostas imune inata e adaptativa, e tem uma importância crucial na patogênese das DII (BIANCHERIA et al, 2013; MACDONALD et al., 2012; NEURATH, 2014).

Células T<sub>regs</sub> são de suma importância para a regulação da resposta inflamatória na RCU. Apresentam ação protetora, pois suprimem respostas pró-inflamatórias (HUBER et al., 2011) por meio da expressão de citocinas imunossupressoras (IL-10, TGF- $\beta$ ) (ATTRIDGE et al., 2012; WANG et al., 2011), da expressão do receptor IL-2 e estímulo da maturação de células dendríticas (CDs) (VIGNALI et al., 2008).

Entre as citocinas anti-inflamatórias, destaca-se a IL-10, que possui atividade imunossupressora. Age por “feedback” negativo, inibindo a síntese daquelas com ação pró-inflamatórias como o TNF - $\alpha$ ; IL-6 e IL-8 pelos monócitos (ZEITOUN et al., 2010). Atua também prevenindo lesões nos tecidos causadas pela resposta imune adaptativa exacerbada. Assim, a IL-10 é uma citocina central durante a fase de resolução da inflamação (OUYANG et al., 2011).

## *2.2 Zinco: aspectos metabólicos e imunológicos*

A alimentação pode ter participação na etiologia das doenças inflamatórias intestinais. Apesar da descoberta de mais de 160 loci relacionados ao desenvolvimento das DII, a contribuição desses genes para o desencadeamento da doença é de apenas 25%, sugerindo que outros fatores podem estar envolvidos na patogênese, como a dieta, tendo em vista a crescente incidência de DII em áreas previamente de baixa incidência em que a população adotou estilo de vida ocidentalizado, incluindo alterações na ingestão alimentar (CHAN; LUBEN; SCHAİK, 2014).

Os micronutrientes desempenham papel fundamental para o funcionamento adequado dos sistemas imunológico e antioxidante. Influenciam os genes envolvidos na codificação de proteínas, necessárias para a resposta imuno-inflamatória adequada (MOCCHEGIANE et al, 2012).

O zinco é um mineral essencial para o funcionamento normal da célula. Participa de várias vias metabólicas, na regulação da expressão gênica, na manutenção estrutural de biomembranas, na imunidade e na proteção contra radicais livres (FAA, 2008; YU et al, 2011), evitando que respostas imunoinflamatórias provoquem prejuízos aos tecidos (FAA et al., 2008; LIVINGSTONE, 2015; PRASAD; 2013).

A essencialidade do zinco para humanos foi identificada em 1961, quando sua deficiência foi associada a sintomas de anemia grave, retardo de crescimento, hipogonadismo e problemas dermatológicos (PRASAD; HALSTED; ITSUMURA, 1961).

O jejuno é a porção do intestino em que a maior parte do zinco é absorvido e este processo é dependente de sua concentração no lúmen. A captação do zinco pelas células intestinais ocorre por meio de mecanismos mediados por transportadores e por difusão simples. O mecanismo mediado por carreador predomina em situação de baixa concentração de zinco na dieta, enquanto que a absorção por difusão simples é predominante quando a concentração desse mineral é elevada (DEVIRGILIIS et al., 2007).

A homeostase desse micronutriente é controlada por proteínas transportadoras e por sua ligação à proteínas como a metalotioneína (MT). Os transportadores são denominados de ZIP e ZnT. O primeiro é a responsável pela compartimentalização do mineral e o segundo pelo efluxo do zinco. A MT pode ligar-se até 15% do  $Zn^{2+}$  celular e liberá-lo durante o stress oxidativo (KAMBE et al., 2015; MARET, 2011).

O zinco está associado com até 10% de todas as proteínas celulares, incluindo mais de 300 enzimas e mais do que 2.000 fatores de transcrição. Concentrações intracelulares de  $Zn^{2+}$  são mantidas até  $10^4$  vezes mais baixas do que no meio extracelular, gerando assim gradiente químico para sua mobilização para o citosol (CHAIGNE-DELALANDE; LENARDO, 2014).

O zinco encontra-se amplamente distribuído em todo o corpo humano, porém em pequenas quantidades (1,5 a 2,5 g) (HAMBIDGE et al., 2008). Aproximadamente 60% de zinco são armazenados no músculo esquelético, 30% nos ossos, e 5% são armazenados no fígado e pele. A porcentagem remanescente é distribuída em outros órgãos, tais como o cérebro, rim e pâncreas. Excesso de zinco é excretado

através da secreção gastrointestinal e descamação de células da mucosa (JACKSON, 1989).

A deficiência desse mineral está relacionada a quadros patológicos graves que surgem, na sua maioria, em função da deficiência alimentar, presença de compostos quelantes nos alimentos, distúrbios no processo de absorção gastrointestinal ou aumento na excreção urinária (HAMBIDGE et al., 2008).

Os alimentos constituem as fontes primárias de zinco para os humanos, e somente pequena parte é proveniente da água. Os teores de zinco são variáveis, porém, as carnes, peixes, fígado, ovos, mariscos, leites e derivados são considerados boas fontes deste mineral, devido à presença de aminoácidos como a histidina, a metionina e a cisteína que ajudam a melhorar a solubilidade do mineral (FRANSSINETTI et al, 2006).

As recomendações diárias de ingestão (DRI's) de zinco para adultos são de 11 g/dia para homens e 8 g/dia para mulheres. Em algumas fases da vida, as necessidades do mineral estão aumentadas, como na gestação, infância, puberdade e senescência (HAMBIDGE et al, 2008).

Praticamente todos os mecanismos envolvidos na imunidade inata e adaptativa são influenciados pelo zinco. A deficiência do mineral influencia a sobrevivência, proliferação e diferenciação das células do sistema imunitário, como monócitos, células natural *killer*, células T e B. Os subconjuntos de células T, são particularmente sensíveis à modificações nas concentrações de zinco (BONAVENTURA; BENEDETTI; ALBARÈDE et al., 2015; HAASE; RINK, 2014). Atua também como um segundo mensageiro em células do sistema imunológico, como na sinalização do receptor *Toll Like* (TLR) em macrófagos (PRASAD, 2013; YU et al, 2011).

O zinco também é importante na manutenção das células T por meio do hormônio timulina, cuja atividade biológica depende do mineral para a maturação e diferenciação de linfócitos (FRAKER; KING, 2004).

Esse micronutriente é acumulado no compartimento lisossômico de células T, do qual é liberado pela proteína transportadora ZIP8 em resposta a ativação da sinalização do receptor de linfócitos T (TCR) por anticorpos (AYDEMIR et al., 2009).

Em condições inflamatórias, citocinas podem aumentar ou reduzir a expressão de transportadores de zinco em resposta ao aumento da demanda pelo

mineral. A resposta de fase aguda inclui rápido declínio na concentração plasmática do micronutriente como resultado da sua redistribuição nos compartimentos celulares (FOSTER; SAMMAN, 2012).

A IL-2 induz a sinalização do zinco, isto é, sua rápida translocação a partir de lisossomos para o citosol, sinal necessário para manter a fosforilação da ERK (enzima envolvida na ativação linfocitária e inibição da apoptose), e a proliferação de células T (KALTENBERG et al., 2010; PLUM et al., 2014) .

A deficiência de zinco influencia a produção de citocinas, incluindo IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 e TNF- $\alpha$ , e em resposta à suplementação com o mineral, as concentrações de citocinas plasmáticas apresentam resposta dose-dependente (FOSTER; SAMMAN, 2012).

Mecanismos adaptativos permitem ao organismo manter as concentrações de zinco total normal, mas a deficiência pode ocorrer devido à redução da absorção ou aumento das perdas gastrointestinais (LIVINGSTONE, 2015).

A concentração plasmática de zinco responde dentro de poucos dias (6 a 12 dias) tanto para o início quanto para a interrupção da suplementação (KING et al., 2016, WESSELLS et al., 2010) e suas concentrações séricas parecem atingir um platô quando a ingestão do mineral aproxima-se de 25-30 mg/dia. Assim, concentração plasmática do mineral mostra ser um biomarcador útil na avaliação de resposta à suplementação em uma população (HESS et al., 2007).

Estudo duplo cego, com homens saudáveis, observou que os picos de aumento da concentração de zinco plasmático nos grupos que receberam 10 mg ou 20 mg/dia de sulfato de zinco, ocorreram de 14-21 dias após o início da suplementação. E, após 2 semanas do final da mesma, as concentrações do mineral no plasma dos grupos suplementados não diferiram do grupo placebo. Assim, as concentrações plasmáticas do mineral podem ser um biomarcador útil do mineral (WESSELLS, et al., 2010).

A suplementação oral de zinco aumenta os níveis séricos do mineral após a diarreia osmótica induzida por lactose. Em ratos desnutridos, a administração de zinco melhorou o ganho de peso após diarreia osmótica e reduziu significativamente os escores da mesma no terceiro dia de ingestão de lactose com a melhoria da histologia jejuno verificado por meio o aumento da altura das vilosidades, profundidade das criptas e relação vilo/cripta. Esse estudo reforça a importância da

suplementação com zinco sobre o ganho de peso na presença de diarreia, sugerindo o papel do zinco no balanço hidroeletrolítico intestinal e integridade da barreira intestinal como mecanismo para evitar a perda de peso (QUEIROZ et al., 2014).

Estudo de caso e controle com ratos com colite experimental, observou que os animais que receberam dieta pobre e em zinco (5 mg/Kg) apresentaram concentrações séricas do mineral reduzida e maior atividade da colite quando comparado ao grupo recebeu dieta adequada em zinco (30 mg/Kg). Verificaram também que apesar de ambos os grupos apresentarem sangramento retal, o grupo com dieta deficiente em zinco apresentou maior perda de peso, inconsistência fecal, encurtamento do cólon e aumento de 12 vezes o TNF- $\alpha$ , que leva ao incremento na produção da IL-10, um imunorregulador do trato gastrintestinal (SUWENDI et al, 2012).

Os estudos têm demonstrado efeito positivo do zinco no equilíbrio da resposta inflamatória. No entanto, trabalhos envolvendo a suplementação com o mineral em pacientes com Retocolite Ulcerativa ainda são escassos. Nessa perspectiva, propõe-se com este estudo contribuir para a melhor compreensão do papel do zinco na resposta inflamatória nesse grupo de pacientes.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito da suplementação com zinco na resposta inflamatória em pacientes com Retocolite Ulcerativa.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar o consumo alimentar e adequação da dieta em relação à energia, macronutrientes e zinco;
- Determinar as concentrações plasmáticas e eritrocitárias do zinco antes e após a suplementação com o mineral;
- Quantificar as concentrações séricas das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$  e TNF - $\alpha$  antes e após a suplementação;
- Verificar a existência de relação entre os parâmetros nutricionais relativos ao zinco e as concentrações das citocinas na Retocolite Ulcerativa.

## 4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 4.1 Caracterização do Estudo e Protocolo Experimental

Ensaio clínico unicego envolvendo 41 pacientes com RCU, de ambos os sexos, na faixa etária entre 18 e 70 anos, em fases de remissão e ativa da doença atendidos em livre demanda do Hospital Universitário (HU) da Universidade Federal do Piauí – UFPI.

Os pacientes com RCU foram clinicamente caracterizados segundo avaliação clínica, laboratorial, achados endoscópicos e histopatológicos. A atividade da RCU foi determinada por meio do Escore de Mayo (ANEXO A).

Para fins de análise da intervenção com zinco na resposta inflamatória, os pacientes foram alocados em dois grupos: Grupo Suplementado - pacientes com baixa concentração plasmática de zinco ( $<70 \mu\text{g/dL}$ , GIBSON, 2005), e o Grupo Placebo - pacientes com zinco plasmático adequado ( $>70 \mu\text{g/dL}$ , GIBSON, 2005).

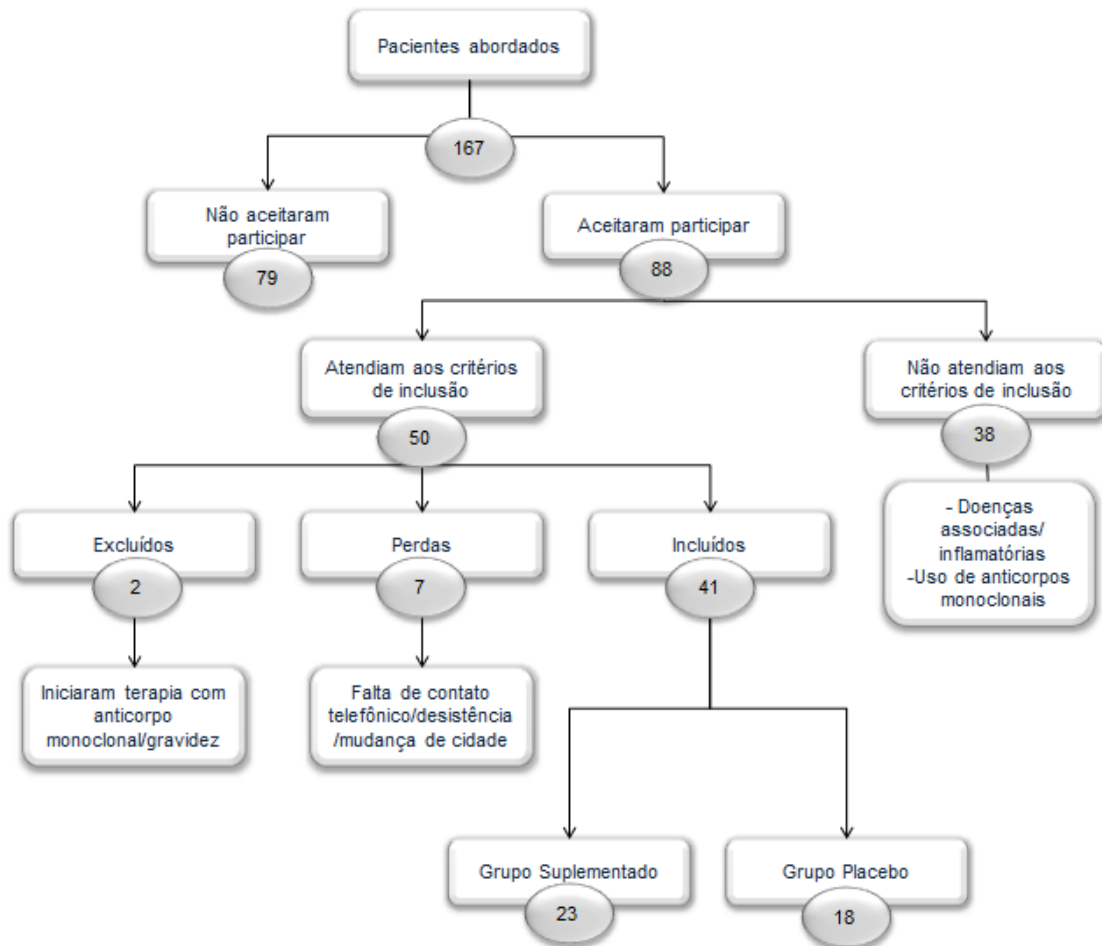
A inclusão dos participantes no estudo obedeceu aos seguintes critérios: não fumar, não possuir doença coexistente como diabetes, hipertensão e doença renal, doenças cardiovasculares, doenças reumáticas e quaisquer outras doenças que envolvam processo inflamatório; não fazer uso de suplemento vitamínico-mineral que possa interferir no metabolismo do zinco, e não entrar em terapia com anticorpos monoclonais.

Foram excluídos do estudo: pacientes que iniciaram o uso da terapia com anticorpos monoclonais; que mudaram de cidade e/ou estado, falta de contato telefônico, que apresentaram impossibilidade de continuar com o uso do suplemento e aqueles que não compareceram às coletas de material biológico. O fluxograma apresentado na figura 2 ilustra o protocolo experimental deste estudo.

Mediante resultado do zinco plasmático, aqueles que apresentaram concentrações abaixo do valor de referência ( $70 \mu\text{g/dL}$ , GIBSON, 2005) foram suplementados com cápsulas de gluconato de zinco ( $35 \text{ mg/dia}$  -  $4,9 \text{ mg}$  de zinco elementar) durante 60 dias e os pacientes com valores de zinco plasmático normal receberam placebo (cápsulas de amido de milho), ingerido diariamente pela manhã, em jejum, por igual período. O efeito da intervenção foi avaliado utilizando os seguintes parâmetros: concentrações plasmáticas e eritrocitárias do zinco e

concentrações séricas das citocinas nos tempos T1 e T2, após 30 e 60 dias de intervenção, respectivamente.

FIGURA 2 – Fluxograma do protocolo experimental do estudo.



Os pacientes que aceitaram participar do estudo receberam informações sobre a pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A). Os mesmos responderam ao questionário contendo informações sobre história clínica e familiar (APÊNDICE B), bem como receberam o formulário do diário alimentar (APÊNDICE C) para ser devolvido por ocasião da primeira coleta do material biológico.



## 4.2 Avaliação do consumo alimentar

O consumo alimentar foi avaliado mediante o registro alimentar de três dias, preenchido em dias não consecutivos, sendo dois durante a semana e um no final de semana. Os pacientes foram orientados quanto à forma correta de registrar os alimentos e os porcionamentos, auxiliados por álbum ilustrativo de tamanhos e medidas caseiras (APÊNDICE C).

As informações referentes à energia, macro e micronutrientes foram calculadas com o auxílio do software Nutwin (versão 1.5.2.51) do Departamento de Informática da Escola Paulista de Medicina/ UNIFESP. Para fins de análise dos registros, todos os alimentos relatados pelos pacientes foram incluídos no programa tendo como base a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011).

Para os cálculos da adequação dos nutrientes, foram consideradas as recomendações das DRI's (*INSTITUTE OF MEDICINE*, 2011) e seguiu-se a metodologia proposta por Soares; Penha e Moura (2013). A adequação do consumo calórico foi calculada com base na média da estimativa de energia requerida (*Estimated Energy Requirements - EER*) de cada grupo, considerando sexo, idade, peso, altura e nível de atividade física.

A adequação do consumo de macronutrientes foi feita mediante comparação das médias de ingestão com os valores de distribuição aceitável para macronutrientes (*Acceptable Macronutrient Distribution Range - AMDR*) como segue: carboidratos (45% - 65%), proteínas (10% - 35%) e lipídeos (20% - 35%). A adequação do consumo de zinco foi calculada pelo método probabilístico, com base no valor médio de ingestão diária estimado (*Estimated Average Requirement - EAR*) de acordo com o sexo de cada indivíduo e variação intrapessoal da ingestão.

## 4.3 Coleta e separação de material biológico

### 4.3.1 Coleta de sangue

A coleta de sangue foi realizada por profissional técnico em enfermagem do Hospital Universitário - UFPI, no período da manhã, estando os pacientes em jejum de no máximo 12 horas, utilizando-se seringas plásticas descartáveis e agulhas de aço inoxidável, estéreis e descartáveis.

Do total de sangue coletado, 10 mL foram transferidos para tubos de ensaio desmineralizados, contendo citrato de sódio a 30% como anticoagulante (10 µL/mL de sangue total) para a análise de zinco. Os 5 mL restantes foram transferidos para tubos de ensaio contendo fator ativador de coágulo para a obtenção do soro a ser utilizado para a determinação das citocinas.

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

A fim de garantir o controle de contaminação de toda a vidraria e material de polipropileno utilizado para as análises, os mesmos foram desmineralizados, em banho de solução de ácido nítrico a 30%, durante um período mínimo de 12 horas. Posteriormente foram enxaguados dez vezes consecutivas, em água ultra pura (MILLI-Q®, Water System - Continental Water System Corp. El Paso, Texas), secos em estufa e mantidos em depósitos fechados, até o momento da utilização (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Os reagentes foram preparados e diluídos em água ultra pura (MILLI-Q® Water System - Continental Water System Corp. El Paso, Texas) e todos os reagentes possuíam grau de pureza analítica (P.A.).

#### 4.3.2 Separação dos componentes do sangue

Para a determinação do zinco, o plasma foi separado do sangue total por centrifugação a 1831 x g durante 15 minutos a 4°C (Centrífuga SIGMA® 4K15), e transferido com pipeta automática para microtubos de polipropileno desmineralizados, e armazenados em freezer a – 20°C para posterior análise.

Para separação dos eritrócitos e subsequente determinação do zinco, foi utilizado o método proposto por Whithehouse et al. (1982). A massa eritrocitária obtida do sangue total foi lavada com 10 mL de solução salina isotônica 0,9%, e homogeneizada lentamente por inversão e centrifugada a 2493 x g por 10 minutos a 4°C (Centrífuga SIGMA® 4K15), e o sobrenadante descartado.

O procedimento descrito foi realizado três vezes para remover contaminantes dos eritrócitos (plaquetas e leucócitos). Após a última centrifugação, a solução salina foi aspirada, descartada e a massa eritrocitária cuidadosamente transferida, com o

auxílio de uma pipeta automática, para microtubos de polipropileno desmineralizados e mantidos à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises.

Para a determinação das citocinas, o sangue total, com fator ativador de coágulo, foi centrifugado  $1831 \times g$  durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  (Centrífuga SIGMA® 4K15) para a obtenção do soro. O mesmo foi transferido com pipeta automática, para microtubos de polipropileno e armazenado em freezer a  $-35^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.

#### *4.4 Determinação do zinco plasmático e eritrocitário*

##### *4.4.1 Digestão das amostras*

Todas as amostras de plasma e eritrócitos foram submetidas à digestão prévia em forno de micro-ondas, modelo Microwave 300 (Anton Paar®) anteriormente à determinação do zinco por espectrofotometria de absorção atômica. Esta etapa visa decompor a matéria orgânica da amostra a fim de reduzir a viscosidade do material. Segundo Wineforn e Latz (1961), a imprecisão em métodos de chama pode ser atribuída à viscosidade, por influenciar as taxas de aspiração das amostras (WINEFORNE; LATZ, 1961).

##### *4.5.1.1 Digestão do plasma*

Adicionou-se nos fracos digestores, 1 mL da amostra, 2,0 mL de ácido nítrico, 0,5 mL de peróxido de nitrogênio e 1,5 mL de água ultra pura (MiliQ®), com diluição final de 1:5. Em seguida, os frascos foram fechados e alocados no rotor dando prosseguimento ao processo de digestão.

##### *4.5.1.2 Digestão dos eritrócitos*

Adicionou-se nos fracos digestores, 0,5 mL da amostra, 2,0 mL de ácido nítrico, 0,5 mL de peróxido de nitrogênio e 2 mL de água ultra pura (MiliQ®), com diluição final de 1:10. Em seguida os frascos foram fechados e alocados dentro do rotor dando prosseguimento ao processo de digestão.

Para fins de conclusão da digestão do plasma e eritrócitos, o rotor foi acoplado ao forno de micro-ondas (Microwave Reaction System: Multiwave PRO - Anton Paar®), e programado de acordo com os pontos de aquecimento conforme tabela 1. Após a digestão, as amostras foram transferidas para tubos tipo Falcon de 15 mL.

**TABELA 1** – Condições de trabalho de forno micro-ondas para digestão de amostras sanguíneas.

Tempo	Temperatura	Rampa	Hold	Fan
1	60	7:00	5:00	1
2	120	8:00	5:00	1
3	180	7:00	15:00	1
4	Ventilação/Resfriamento	0:00	20:00	3

#### 4.5 Determinação do zinco plasmático

A determinação da concentração do zinco no plasma foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica de chama, segundo o método proposto por Rodriguez et al. (1989). Três alíquotas de cada amostra foram preparadas seguindo o protocolo de digestão abordado no item 4.5.1 e aspiradas diretamente na chama do espectrofotômetro de absorção atômica (AAS), modelo FAAS 240FS (VARIAN®).

A fim de verificar a presença de contaminação durante o preparo das amostras, o branco foi preparado com 2,5 mL de ácido nítrico; 0,5 mL de peróxido de hidrogênio e 2 mL de água ultra pura (Mili-Q®) e lido em paralelo às amostras.

Durante a leitura das amostras, o aparelho de AAS foi ajustado para as seguintes condições de trabalho: comprimento de onda ( $\lambda = 213,9$  nm); fenda espectral: 1,3 nm; chama oxidante acetileno/ar; sistema de atomização-queimador com altura de 7,5 mm e nebulizador munido de pérola de impacto, e três leituras com tempo de 3 segundos de integração.

O equipamento foi calibrado com soluções aquosas de ácido nítrico a 1%, preparadas por diluição de padrão de zinco Tritizol® (MERCK), nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,75, 1,0 e 1,5  $\mu\text{g Zn/mL}$ , sendo os resultados fornecidos em absorbância e expressos em  $\mu\text{g/dL}$ , representando a média das concentrações das amostras preparadas em triplicatas. O estado nutricional relativo ao Zn plasmático foi

classificado utilizando como referência os valores de 70 a 110 µg/dL, propostos por Gibson (2005).

#### *4.6 Determinação do zinco eritrocitário*

Para determinação de zinco nos eritrócitos, seguiu-se o protocolo de digestão descrito no item 4.5.1.2, cujas amostras foram aspiradas no espectrofotômetro de absorção atômica de chama. A fim de verificar a presença de contaminação durante o preparo das amostras, o branco foi preparado com 2,0 mL de ácido nítrico; 0,5 mL de peróxido de hidrogênio e 2,5 mL de água ultra pura (Mili-Q®) e lido em paralelo às amostras.

A determinação da concentração de zinco nos eritrócitos foi feita em triplicata, utilizando-se o mesmo equipamento e condições descritas para o plasma. Como padrão de zinco também foi utilizado o Tritizol® (MERCK), preparado por diluição em água Mili-Q® e ácido nítrico, nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,5, 0,75, 1,0 e 1,5 µg Zn/mL.

##### *4.6.1. Determinação da hemoglobina*

A concentração de hemoglobina eritrocitária foi determinada pelo método da cianometahemoglobina (VAN ASSENDELFT, 1972).

Para o preparo da solução de Drabkin, foram adicionados 990 mL de água ultra pura (Mili-Q®) e 10 mL do reagente cor-estoque em balão volumétrico de 1 L. A mistura foi homogeneizada, transferida para frasco âmbar de 1 L e mantida à temperatura ambiente, ao abrigo da luz direta e da umidade.

Para expressar as concentrações de zinco eritrocitário em zinco/massa de hemoglobina (µg/g Hb), foram preparadas amostras para análise da concentração de hemoglobina.

O lisado 1 foi preparado com uma alíquota de 20 µL de plasma e diluído em 800 mL de água ultra-pura (Mili-Q®). Para o preparo do lisado 2, feito em triplicata, 20 µL do lisado 1 foram transferidos para tubo de ensaio contendo 5 mL da solução de Drabkin.

Espectrofotômetro UV visível (FEMTO modelo 700s) foi utilizado para leitura da absorbância em comprimento de onda de 540 nm. A partir dos valores das concentrações de Zn e de hemoglobina, foi calculada a concentração de zinco eritrocitário, expressa em  $\mu\text{g Zn/g Hb}$ . O estado nutricional relativo ao Zn nos eritrócitos foi avaliado utilizando como referência os valores de 40-44  $\mu\text{g Zn/g Hb}$  propostos por Guthier e Picciano (1994).

#### 4.7 Determinação das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- $\gamma$ e TNF

A determinação das concentrações séricas das citocinas foi realizada pelo método *Cytometric Bead Array* (CBA), utilizando o Kit Th1/Th2/Th17 Human (Becton Dickison Bioscience, EUA).

Reconstituiu-se o padrão de citocinas (**FRASCO C**), diluindo o mesmo em 2 mL de solução proteica tamponada (**FRASCO G - Assay diluente**), mantendo a mistura por 15 minutos em temperatura ambiente, homogeneizando-a em seguida.

Para a curva de calibração, adicionou-se em 8 tubos, previamente numerados, 300  $\mu\text{L}$  de solução proteica tamponada (**FRASCO G - Assay diluente**). Transferiu-se para o tubo 1, 300  $\mu\text{L}$  do padrão de citocinas reconstituído, homogeneizando delicadamente com a pipeta. Posteriormente, realizou-se diluições seriadas, transferindo 300  $\mu\text{L}$  do tubo 1 para o tubo 2, e assim sucessivamente até o tubo 8, que permaneceu com 600  $\mu\text{L}$ . Para compor a curva de calibração, enumerou-se 10 tubos, o primeiro recebeu 25  $\mu\text{L}$  de solução proteica tamponada (**G - Assay diluente**), os 8 tubos seguintes, receberam 25  $\mu\text{L}$  de cada tubo da diluição seriada, e o último 25  $\mu\text{L}$  da solução padrão de citocinas reconstituído.

Para o preparo do *pool de beads*, adicionou-se 433,0  $\mu\text{L}$  de cada *bead* em um tubo do tipo Falcon. Antes de retirar o volume de cada *bead*, cada frasco foi vortexado vigorosamente por 5 segundos. Em seguida, o tubo com as *beads* foi centrifugado a 200 g durante 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e acrescentou-se a mesma quantidade descartada, de solução tampão de soro (**FRASCO H - Serum Enhancement Buffer**). Após essa etapa, o *pool de beads* foi incubado durante 30 minutos protegido da luz.

Em cada tubo da amostra adicionou-se 25  $\mu\text{L}$  de soro, 25  $\mu\text{L}$  do *pool de beads* e 25  $\mu\text{L}$  do reagente controle de anticorpo marcado ficoetritrina (PE). Os tubos foram incubados durante 3 horas, em temperatura ambiente e protegidos da luz.

Após a incubação, foi adicionado 1 mL de solução salina com tampão fosfatos (PBS) (*FRASCO F - Wash Buffer*) em cada tubo e centrifugado a 200 g por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 300  $\mu\text{L}$  solução salina com tampão fosfatos (PBS) para ressuspender o sedimento das *beads* para análise imediata no citômetro de fluxo, BD FACSCanto II (*Becton Dickison Bioscience, San Diego, CA, USA*). Para a análise dos dados foi utilizado o software *FCAP Array* (*Becton Dickison Bioscience, BD Biosciences, EUA*). Os resultados foram expressos em pg.

#### 4.8 Análise estatística

Os dados foram organizados no programa SPSS (for Windows® versão 22.0.0.0, 2013) para análise estatística dos resultados.

Para verificar a distribuição dos dados foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para comparação entre os tempos no mesmo grupo foi aplicado o teste “t” de Student pareado para dados com distribuição normal, e o de Wilcoxon para os dados com distribuição não normal.

A comparação de médias entre os grupos foi realizada aplicando-se o teste “t” de Student independente para dados com distribuição normal, e o teste de Mann Whitney para os dados com distribuição não normal.

Para o estudo de correlação entre as variáveis foram aplicados os testes de Correlação linear de Pearson e de Spearman para os dados com distribuição normal e não normal, respectivamente. Foi adotado o intervalo de confiança de 95% e de significância de 5,0%.

#### 4.9 Aspectos éticos

O projeto, em seus aspectos éticos e metodológicos foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Piauí, conforme prevê a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) (BRASIL, 2012) sob o número 32479814.2.0000.5214 (ANEXO B). O projeto também foi aprovado pelo Comitê de

Ética em Pesquisa do HU da UFPI (ANEXO C). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Os participantes foram beneficiados com os resultados dos exames bioquímicos bem como pela orientação nutricional com vistas à melhora da ingestão dietética do zinco.



## 5 RESULTADOS

Os dados apresentados são referentes a 41 pacientes com Retocolite Ulcerativa assistidos no Hospital Universitário da Universidade Federal do Piauí (HU/UFPI). O grupo suplementado foi composto por 69,57% de mulheres, com média de idade de  $47,22 \pm 11,8$  anos; e o grupo placebo distribuído igualmente entre os sexos masculino e feminino, com média de idade de  $45,33 \pm 12,4$  anos ( $p=0,623$ ).

A caracterização dos pacientes quanto à atividade da doença é apresentada na figura 3, por meio do Escore de Mayo. Observou-se que 78,26% dos pacientes do grupo suplementado e 83,33% do grupo placebo encontravam-se em estágio de remissão da doença.

A tabela 2 mostra as médias e desvios padrão da energia e ingestão de macronutrientes pelos pacientes. Verificou-se que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao consumo de energia, proteína e lipídeo entre os grupos suplementado e placebo ( $p < 0,05$ ), sendo significativamente menor no grupo suplementado.

**TABELA 2** – Valores médios e desvios padrão de energia e macronutrientes dos pacientes com Retocolite Ulcerativa.

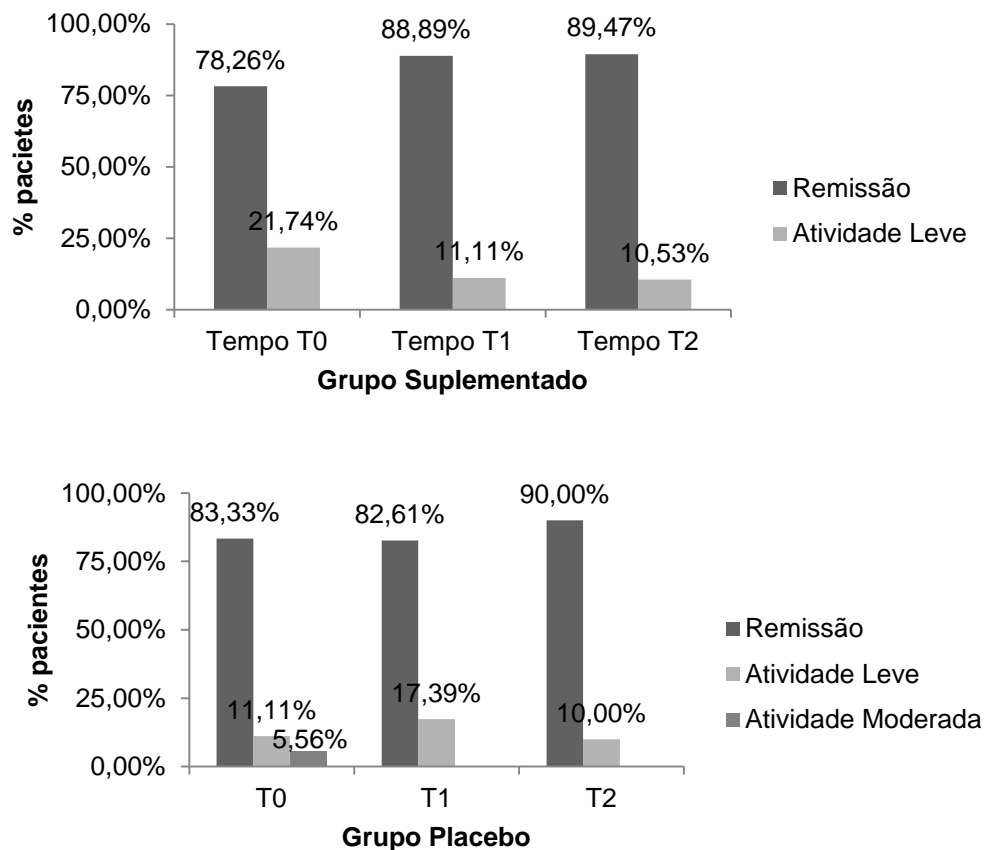
	Grupo	Média±Desvio padrão	p <sup>c</sup>
Calorias (Kcal)	Suplementado	1520,9±438,9	0,027
	Placebo	1838,2±431,2	
Carboidrato (g)	Suplementado	215,14 90,69 – 323,94	0,497
	Placebo	213,40 119,42 – 476,14	
Proteína (g)	Suplementado	77,8±25,2	0,026
	Placebo	96,8±26,4	
Lipídeo (g)	Suplementado	44,1±17,8	0,009
	Placebo	60,4±19,4	

<sup>c</sup> Teste T de Student Independente ( $p<0,05$ )

Avaliando a probabilidade de adequação para ingestão de energia e macronutrientes dos participantes do estudo, antes da suplementação, observou-se que os grupos suplementado e placebo apresentavam baixa ingestão calórica, segundo a EER (necessidade média estimada), com percentuais de 77% e 84%, respectivamente. Quanto ao consumo de carboidratos, proteínas e lipídeos, estes

estavam de acordo com a faixa de distribuição aceitável de macronutrientes (AMDR), segundo o *Instituto of Medicine* (2011) (figura 4).

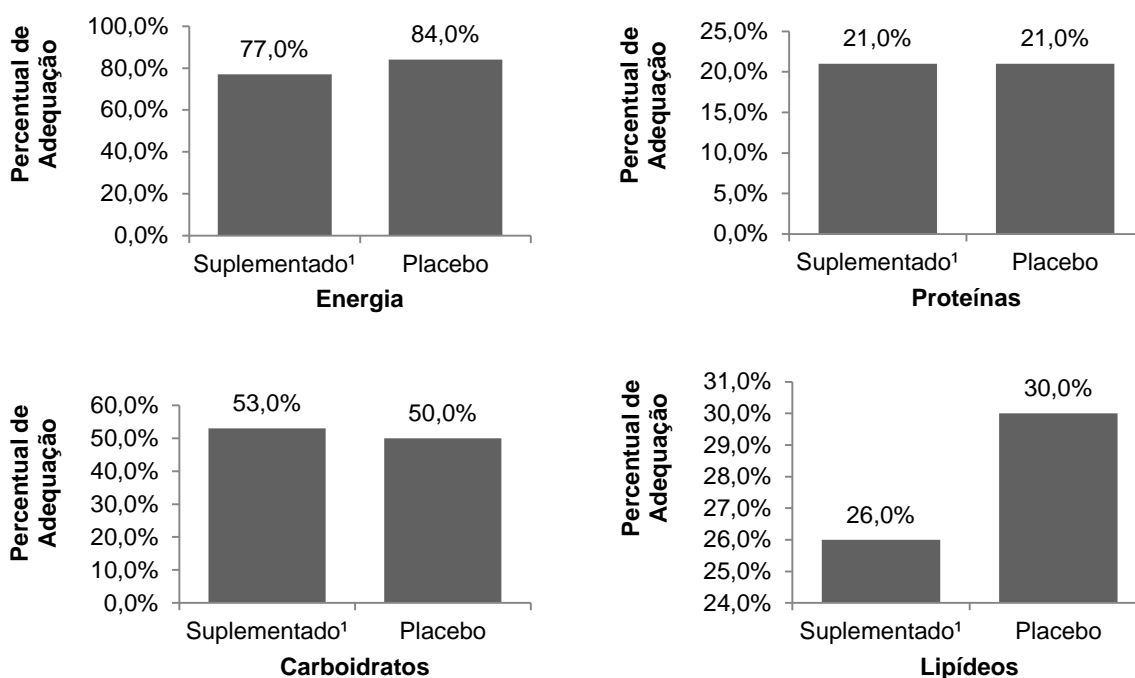
**FIGURA 3** – Atividade da Doença segundo escore de Mayo nos diferentes tempos de intervenção.



**Fonte:** a própria autora

A recomendação de zinco segundo a Ingestão Dietética de Referência (*Dietary Reference Intakes – DRI's*) difere para homens e mulheres, e adotando-se o método probabilístico, apresentado na metodologia, a probabilidade média de adequação do zinco para o grupo suplementado foi de 64,83% e para o placebo de 87,02% (figura 5).

**FIGURA 4** – Percentuais de adequação do consumo de calorias, segundo as recomendações nutricionais.

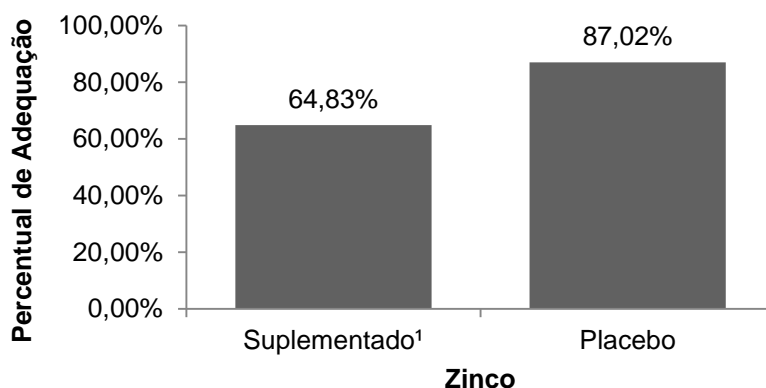


Valores de referência: calorias 100%; proteínas 10 - 35%; carboidratos 45 - 65%; lipídios 20 - 35%; zinco 100%. <sup>1</sup> 1 paciente não preencheu o registro alimentar

Conforme demonstrado na tabela 3, as médias das concentrações de zinco plasmático foram significativamente menores ( $p < 0,001$ ) no grupo suplementado em relação ao placebo, antes de iniciar a intervenção. Avaliando o efeito da suplementação com zinco nos tempos T1 e T2, houve aumento significativo nas concentrações do mineral ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao tempo inicial (T0). Em relação ao placebo, houve redução significativa nas concentrações do micronutriente nos tempos T1 e T2 ( $p < 0,05$ ). Comparando o efeito da intervenção entre os grupos, o estudo não evidenciou diferença significativa nos tempos T1 ( $p = 0,655$ ) e T2 ( $p = 0,980$ ).

Em relação ao zinco eritrocitário, verificou-se aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nas concentrações do mineral nos tempos T1 e T2, quando comparados ao tempo inicial (T0) no grupo suplementado. No grupo placebo houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) no tempo T1 quando comparado ao tempo T0, e T2 em relação à T1. Avaliando o efeito da intervenção entre os grupos, o estudo não evidenciou diferença significativa no tempo T2 ( $p = 0,485$ ).

**FIGURA 5** – Probabilidade de adequação da ingestão de zinco, segundo as recomendações nutricionais.



Valores de Referência: Zinco 100%. <sup>1</sup> 1 paciente não preencheu o registro alimentar

**TABELA 3** – Valores médios e desvios padrão das concentrações plasmática e eritrocitária de zinco dos pacientes com RCU nos diferentes grupos e tempos estudados.

		T0	T1	T2	p (T0xT1)	p (T1xT2)	p (T0xT2)
Plasma µg/dL	Suplementado	53,2± 11,4	74,8±20,8	61,86 (51,4-96,7)	0,000 <sup>a</sup>	0,18 <sup>b</sup>	0,003
	Placebo	82,38±11,02	70,0 (33-143)	67,37±9,67	0,041 <sup>b</sup>	0,205 <sup>b</sup>	0,001 <sup>a</sup>
	p (entre grupos)	0,000 <sup>d</sup>	0,655 <sup>e</sup>	0,980 <sup>e</sup>			
		T0	T1	T2	p (T0xT1)	p (T1xT2)	p (T0xT2)
Eritrócito µg Zn/g Hb	Suplementado	25,0 (13-49)	32,78±7,35	35,88±7,74	0,017 <sup>b</sup>	0,17 <sup>a</sup>	0,011
	Placebo	34,9±8,2	25,0 (19-37)	38,1±7,4	0,004 <sup>b</sup>	0,008 <sup>b</sup>	0,948 <sup>a</sup>
	p (entre grupos)	0,007 <sup>e</sup>	0,001 <sup>e</sup>	0,485 <sup>d</sup>			

Valores de referência: Zn plasmático 70-110 µZn/dL; Zn eritrocitário 40-44 µZn/gHb.

Comparação entre os tempos estudados: <sup>a</sup>Teste T de Student Dependente; <sup>b</sup>Teste de Wilcoxon. Comparação entre os grupos estudados: <sup>d</sup>Teste T de Student Independente; <sup>e</sup>Teste de Mann-Whitney.

Os resultados das análises das concentrações séricas das citocinas estão apresentados na tabela 4. Verificou-se que as concentrações da IL-2 e IL-10 reduziram significativamente no grupo suplementado no tempo T2. Observou-se também que a IL-10 estava significativamente maior no grupo suplementado antes da intervenção (p= 0,014).

Analisando as concentrações das citocinas no grupo suplementado, após 30 dias de intervenção, verificou-se redução nas interleucinas IL-6, IL-10 e TNF-α e

aumento da interleucinas IL-4, IL-17 e IFN- $\gamma$ . Após 60 dias de suplementação com zinco, observou-se redução das citocinas IL-2, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  e do IFN- $\gamma$ , quando comparados ao tempo T0, porém, sem diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

Para o grupo placebo, observou-se que após 30 dias de intervenção as concentrações das citocinas IL-6 e IL-10 reduziram, enquanto as interleucinas IL-17 e TNF- $\alpha$  aumentaram. Após 60 dias da intervenção, ocorreu diminuição nas citocinas IL-6, IL-17 e IFN- $\gamma$ , e aumento das citocinas IL-2, IL-10 e TNF- $\alpha$ , porém, sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre os tempos de intervenção.

No estudo das correlações houve correlação positiva no tempo T0, para o grupo suplementado, entre as citocinas IL-2 e TNF- $\alpha$  ( $p= 0,000$ ,  $r= 0,774$ ), e IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  ( $p= 0,021$ ,  $r= 0,447$ ) (figura 6), e T1 entre IL-4 e IL-2 ( $p= 0,02$ ,  $r= 0,615$ ), IL-2 e IL-6 ( $p= 0,005$ ,  $r= 0,556$ ), IL-2 e TNF- $\alpha$  ( $p= 0,007$ ,  $r= 0,549$ ) e IL-4 e TNF- $\alpha$  ( $p= 0,046$ ,  $r= 0,420$ ), conforme demonstrado na figura 7.

Para o grupo placebo, no tempo T1, as correlações ocorreram entre as citocinas IL-2 e IL-10 ( $p= 0,031$ ,  $r= 0,510$ ), IL-4 e IL-10 ( $p= 0,024$ ,  $r= 0,563$ ), IL-10 e TNF- $\alpha$  ( $p= 0,007$ ,  $r= 0,614$ ) e IL-10 e IL-17 ( $p= 0,024$ ,  $r= 0,529$ ), figura 8.

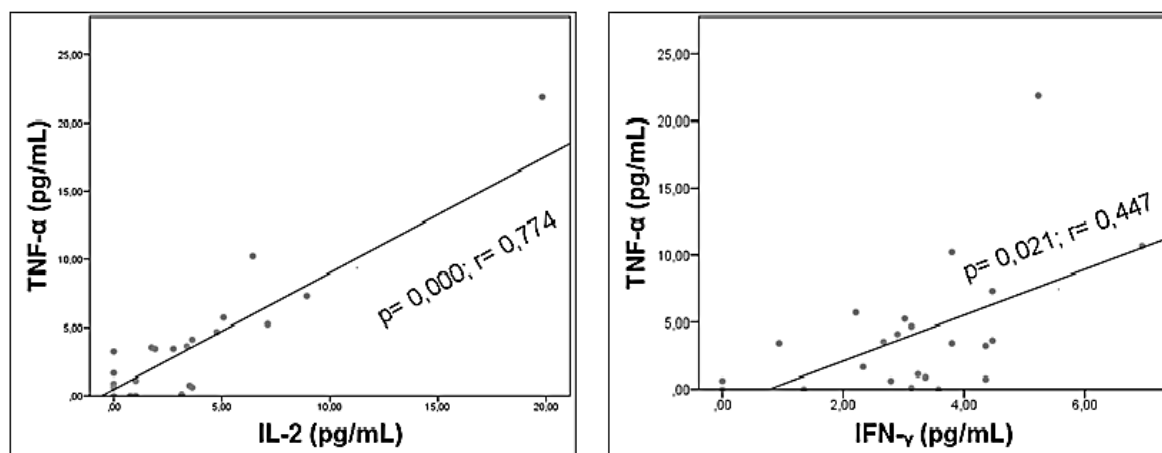
**Tabela 4** – Concentrações séricas de citocinas dos pacientes com Retocolite Ulcerativa nos diferentes grupos e tempos estudados.

Citocina	Grupo Suplementado				Grupo Placebo				$\rho$ Entre grupos
	Concentração pg/mL	T0xT1 $\rho$	T1xT2 $\rho$	T0xT2 $\rho$	Concentração pg/mL	T0xT1 $\rho$	T1xT2 $\rho$	T0xT2 $\rho$	
IL2-T0	3,14 (0,0 - 19,8)				2,0±1,6				0,249 <sup>e</sup>
IL2-T1	2,35 (0,0 - 26,66)	0,286 <sup>b</sup>	0,552 <sup>b</sup>	<b>0,026<sup>b</sup>↓</b>	1,59 (0,0 - 15,52)	0,842 <sup>b</sup>	0,624 <sup>b</sup>	0,859 <sup>a</sup>	0,420 <sup>e</sup>
IL2-T2	1,31 (0,0 - 8,84)				2,3±2,4				0,492 <sup>e</sup>
IL4-T0	0,77 (0,0 - 7,62)				0,8±0,9				0,579 <sup>e</sup>
IL4-T1	1,04 (0,0 - 11,53)	0,348 <sup>b</sup>	0,368 <sup>b</sup>	0,723 <sup>b</sup>	0,8 (0,0 - 5,0)	0,868 <sup>b</sup>	0,553 <sup>b</sup>	0,859 <sup>b</sup>	0,067 <sup>e</sup>
IL4-T2	0,78 ±0,8				0,7 (0,01 - 2,0)				0,938 <sup>e</sup>
IL6-T0	2,67 (0,0 - 17,26)				4,1±2,6				0,365 <sup>e</sup>
IL6-T1	2,0 (0,0 - 16,87)	0,738 <sup>b</sup>	0,379 <sup>b</sup>	0,332 <sup>b</sup>	3,5±2,9	0,476 <sup>a</sup>	0,516 <sup>a</sup>	0,619 <sup>a</sup>	0,520 <sup>e</sup>
IL6-T2	1,9 (0,0 - 16,28)				3,2±2,				0,256 <sup>e</sup>
IL10-T0	1,66 (0,77 - 11,97)				1,01 (0,21 - 92,67)				<b>0,014<sup>e</sup></b>
IL10-T1	0,93 (0,0 - 20,43)	0,083 <sup>b</sup>	0,571 <sup>b</sup>	<b>0,002<sup>b</sup>↓</b>	0,98 (0,0 - 82,65)	0,913 <sup>b</sup>	0,953 <sup>b</sup>	0,859 <sup>b</sup>	0,854 <sup>e</sup>
IL10-T2	1,04 ±0,53				1,61 (0,88 - 68,92)				0,053 <sup>e</sup>
IL17-T0	9,05 (0,0 - 40,86)				6,86 (0,0 - 38,67)				0,752 <sup>e</sup>
IL17-T1	15,16 (0,0 - 92,72)	0,116 <sup>b</sup>	0,572 <sup>b</sup>	0,485 <sup>b</sup>	10,49 (0,0 - 82,85)	0,064 <sup>b</sup>	0,917 <sup>b</sup>	0,5 <sup>b</sup>	0,861 <sup>e</sup>
IL17-T2	6,86 (0,0 - 126,10)				0,0 (0,0 - 30,01)				0,383 <sup>e</sup>
IFN-T0	3,13±1,6				3,2±1,6				0,960 <sup>d</sup>
IFN-T1	3,36±1,45	0,626 <sup>a</sup>	0,266 <sup>a</sup>	0,794 <sup>a</sup>	3,3 (0,46 - 17,5)	0,653 <sup>b</sup>	0,594 <sup>b</sup>	0,825 <sup>b</sup>	0,528 <sup>e</sup>
IFN-T2	3,01±1,38				2,9±1,8				0,938 <sup>d</sup>
TNF-T0	3,43 (0,0 - 21,9)				1,33 (0,0 - 6,09)				0,144 <sup>e</sup>
TNF-T1	2,51 (0,0 - 35,67)	0,537 <sup>b</sup>	0,316 <sup>b</sup>	0,758 <sup>b</sup>	2,46 (0,62 - 16,17)	0,653 <sup>b</sup>	0,575 <sup>b</sup>	0,889 <sup>b</sup>	0,216 <sup>e</sup>
TNF-T2	2,31±0,99				2,4±1,2				0,979 <sup>d</sup>

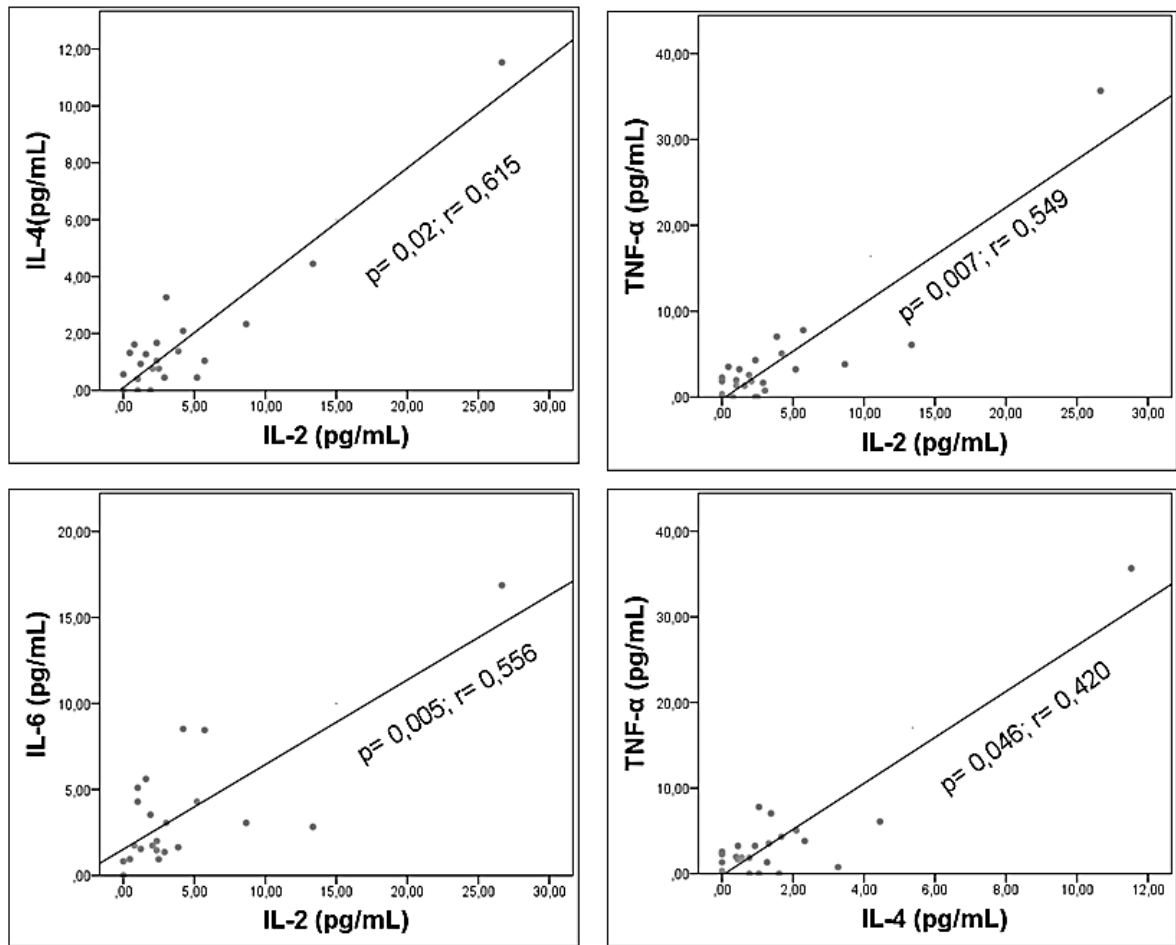
**Tempos:** T0 (tempo inicial), T1 (30 dias após intervenção) e T2 (60 dias após intervenção)

Comparação entre os tempos estudados: <sup>a</sup>Teste T de Student Dependente; <sup>b</sup>Teste de Wilcoxon. Comparação entre os grupos estudados: <sup>d</sup>Teste T de Student Independente; <sup>e</sup>Teste de Mann-Whitney. Em **negrito** = valores estatisticamente significativos. ↓ = redução da concentração.

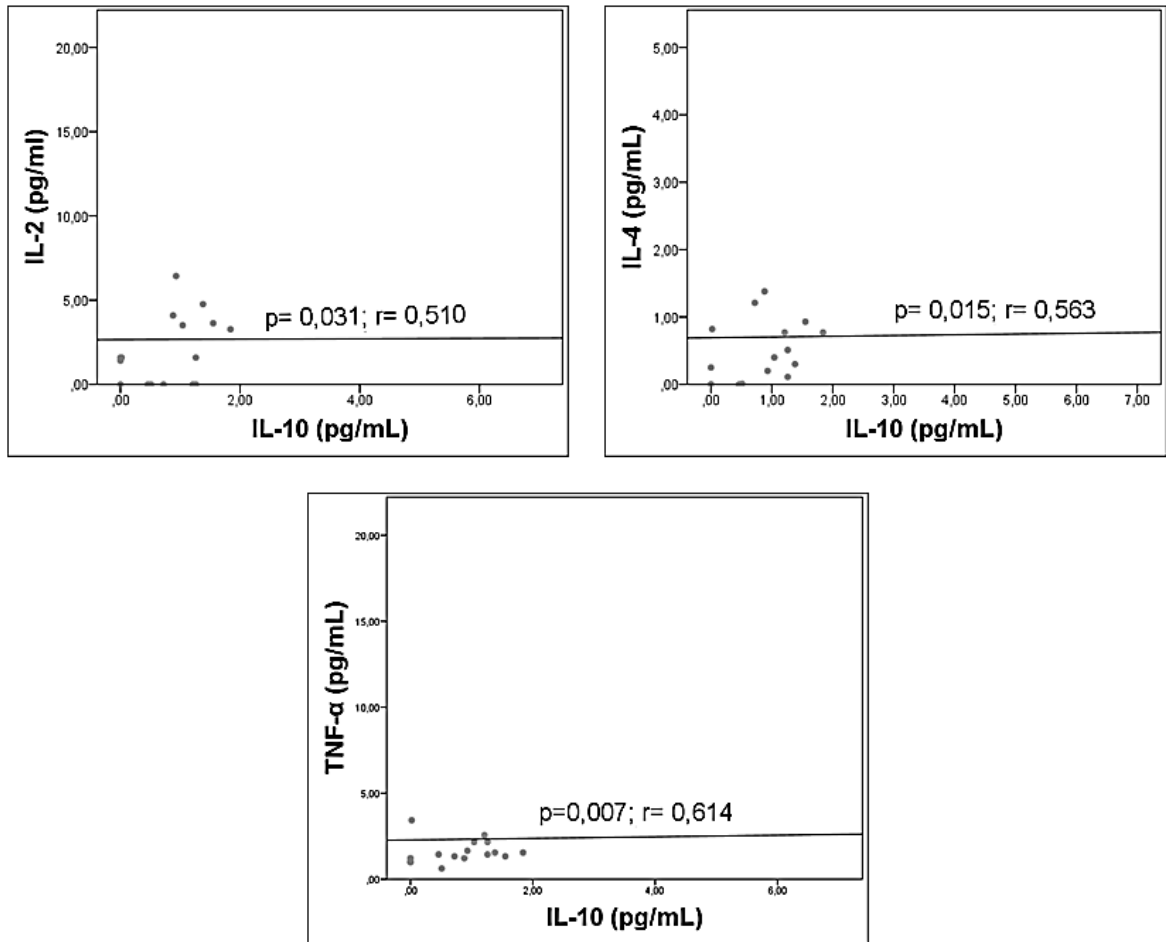
**Figura 6** - Correlação linear de Spearman entre as concentrações séricas de citocinas em pacientes com RCU do grupo suplementado no T0.



**Figura 7** - Correlação linear de Spearman entre as concentrações séricas de citocinas em pacientes com RCU no grupo suplementado no T1.



**Figura 8** – Correlação linear de Spearman entre as concentrações séricas de citocinas em pacientes com RCU no grupo placebo no T1.





## 6 DISCUSSÃO

Neste estudo analisou-se a relação entre os parâmetros nutricionais do zinco e o efeito da suplementação com o mineral na resposta inflamatória em pacientes com Retocolite Ulcerativa em diferentes tempos.

Com relação ao consumo de macronutrientes, o estudo mostrou inadequação alimentar com baixa da ingestão calórica nos grupos suplementado e placebo. Esse resultado pode ser em decorrência das limitações do método aplicado para a avaliação do consumo alimentar, no qual podem ocorrer sub-relatos dos alimentos ou das porções, aliado à probabilidade de inadequação da ingestão de zinco, pois este mineral está associado à falta de apetite, além do medo de comer, devido à doença aguda ativa (GEERLING et al., 2000).

Este dado corrobora com aqueles encontrados por Waltona e Alaunytea (2014) e de Silva, Schieferdecker e Amarante (2011), que também observaram baixo consumo calórico em pacientes com RCU ( $p < 0,05$ ). Porém, diferem quanto aos encontrados para carboidratos, proteínas e lipídeos.

Com relação ao consumo dietético de zinco, os pacientes do grupo suplementado apresentavam menor probabilidade de adequação quanto à ingestão do mineral em relação ao grupo placebo. Este resultado é consistente com as baixas concentrações plasmáticas e eritrocitárias de zinco no grupo suplementado, indicando o efeito da baixa ingestão no estado nutricional relativo a esse mineral.

Os resultados deste estudo corroboram os de Wessells e Brown (2012), que verificaram baixa adequação do consumo de zinco relacionada negativamente ao conteúdo energético, fato também observado nesta pesquisa, que identificou 77% dos pacientes do grupo suplementado com baixa ingestão calórica.

Com relação aos marcadores bioquímicos do mineral, o estudo evidenciou efeito positivo da suplementação nas concentrações de zinco plasmático e eritrocitário, comportamento não evidenciado no grupo placebo em que foram observadas reduções nas concentrações plasmáticas e eritrocitárias desse mineral. Uma possível explicação para esse resultado é a resposta a curto prazo à suplementação com zinco nas concentrações plasmáticas do mineral (WESSELLS et al., 2010), confirmando o uso desse biomarcador de resposta aguda à suplementação em populações (HESS et al., 2007).

O aumento do mineral no compartimento eritrocitário após 60 dias de suplementação pode ser atribuído ao fato do zinco eritrocitário responder mais lentamente à mudança do estado nutricional relativo ao mineral devido à meia-vida longa dessas células (120 dias), e ser menos influenciado pela inflamação decorrente da doença (VAN DAEL; DEELSTRA, 1993; STEFANOWICZ et al., 2013).

Fortalecendo essa hipótese, a diferença entre as concentrações de zinco plasmático e eritrocitário entre os grupos, observadas no tempo T0, tornou-se inexistente para o plasma, a partir dos primeiros 30 dias de suplementação, e para os eritrócitos, após 60 dias do uso do suplemento. Estes resultados refletem a eficácia da suplementação na recuperação do estado nutricional relativo ao zinco nesses pacientes, e, por conseguinte, para o bom funcionamento do sistema de defesa desses indivíduos. A baixa concentração de zinco no sangue pode implicar, ao nível celular na diminuição da capacidade do organismo em responder à inflamação (SKROVANEK et al., 2014).

A ausência de alterações significativas para as citocinas IL-4, IL-6, IL-17, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , entre os diferentes tempos de intervenção e entre os grupos, pode ser devido à composição dos mesmos eram constituídos por pacientes com a mesma doença, diferindo somente quanto à concentração de zinco plasmático. Aliado a esse aspecto, a baixa quantidade do mineral no suplemento ofertado (4,9 mg de zinco), contribuindo com 44,54% e 61,25% das recomendações do micronutriente para homens e mulheres, respectivamente. Outra explicação é o tempo da intervenção, que pode ter sido insuficiente para resultar em diferenças consideráveis entre os grupos, além das citocinas poderem estar restritas aos sítios de inflamação tecidual e possuir meia-vida relativamente curta, elevando-se na circulação apenas em condições graves da inflamação (KOROLKOVA et al., 2015).

A deficiência de zinco resulta em disfunção imunológica e contribui para inflamação sistêmica por potencializar a sinalização da resposta pró-inflamatória de forma exacerbada (WONG, RINALDI; HO, 2015). Partindo dessa premissa verificou-se no tempo T0 do estudo concentrações mais elevadas de TNF- $\alpha$  no grupo suplementado comparado ao placebo, bem como a existência de correlação positiva e significativa entre TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , e TNF- $\alpha$  e IL-2, citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1; quadro não observado para o grupo placebo, que apresentou concentrações plasmáticas de zinco adequadas.

Ainda nesse contexto, é importante ressaltar que a importância biológica da IL-2 não se baseia apenas no seu papel na proliferação de células T, mas também no desenvolvimento de células T reguladoras, e na formação de células T de memória (MALEK, 2008).

A redução nos níveis séricos de IL-2 ao final de 60 dias de suplementação com gluconato de zinco, encontrada deste estudo, pode indicar redução do estímulo proliferativo dos linfócitos, mostrando que o zinco pode atenuar a resposta inflamatória. Esse fato pode também ser justificado pela correlação mais fraca entre a IL-2 e TNF no tempo T1, quando comparada ao T0, e sua inexistência no T2, fortalecendo a participação do micronutriente na resposta imune.

Vale ainda destacar que além de participar na resposta imune humoral, e favorecer a resposta do tipo Th2, a IL-4, que também apresentou correlação com o TNF- $\alpha$ , suprime respostas pró-inflamatórias de monócitos, como a produção de TNF- $\alpha$ , atuando como anti-inflamatória (CURFS; MEIS; HOOBKAMP-KORSTANJE, 1997).

Porém, para melhor entendimento das correlações analisadas, são necessários estudos com intervalos de tempos menores, devido à meia-vida curta dessas proteínas (OLIVEIRA et al., 2011), aliados a outros parâmetros de resposta inflamatória, bem como estratificação dos estágios de atividade da doença.

A falta de correlações entre a IL-6 e as outras citocinas pró e anti-inflamatórias investigadas pode ser devido ao fato de os pacientes com RCU encontrarem-se na fase crônica e em estágio de remissão da doença. Vale destacar que o efeito biológico mais conhecido da IL-6 é sua atuação na síntese de proteínas de fase aguda (ZEITOUN et al., 2010). Logo, estudos que envolvam pacientes em estado ativo da doença podem contribuir para melhor compreensão da relação do zinco com essa citocina.

A interleucina IL-10 encontra-se elevada na mucosa de pacientes RCU, e tem papel importante na resolução da inflamação (AUTSCHBACH; 1998; OUYAND et al., 2011). A magnitude de resposta dessa interleucina parece correlacionar-se com a gravidade do processo inflamatório, e a concentração de citocinas pró-inflamatórias, como a ativação da TNF- $\alpha$  (ZEITOUN et al., 2010; COSTA et al., 2012; VALERIO et al., 2012).

A redução da IL-10 no grupo suplementado após 60 dias de intervenção, simultaneamente ao aumento do percentual de pacientes em estágio de remissão da doença no grupo suplementado, pode sugerir efeito positivo do mineral na melhora da inflamação nesses indivíduos. Segundo Mitsuyana et al. (2011), as concentrações séricas da IL-10 estão elevadas no momento da melhora clínica dos pacientes e reduzidas quando os mesmos entram em estágio de remissão. Assim, as concentrações séricas da IL-10 podem ser um marcador útil no monitoramento da doença (MITSUYAMA, et al., 2006).

Com relação a IL-17 e o IFN- $\gamma$  o estudo não nos permite fazer inferências sobre as mesmas, visto apresentarem comportamento similar entre os grupos. Porém, evidências mostram que o tratamento de células TCD4<sup>+</sup> com zinco, na presença de monócitos ativados, resulta na inibição da produção de IFN- $\gamma$  e células Th17, produtoras de IL-17. Essa descoberta sugere que a biodisponibilidade de zinco extracelular pode afetar a resposta das células de memória TCD4<sup>+</sup>, pela modulação da via de sinalização mediada pelo zinco (LEE et al., 2015).

Gong et al. (2015) também demonstraram que os níveis de Th17 e IL-17 no sangue e no cólon de pacientes com RCU são significativamente mais elevadas do que as células T<sub>reg</sub>, quando comparado com indivíduos saudáveis. No entanto, um fator a ser considerado, é que o estudo compara indivíduos doentes com saudáveis, o que pode justificar os resultados discordantes. Logo, pesquisas que envolvam a cinética de produção dessa citocina, mediante estudos de intervenção com o mineral em grupos de pacientes com a mesma doença podem contribuir para melhor compreensão da relação entre a IL-17 e o zinco.

Os dados obtidos neste trabalho demonstram que a suplementação com zinco melhora o estado nutricional relativo ao mineral e a inflamação, refletindo na melhora do quadro clínico dos pacientes com Retocolite Ulcerativa.

Tendo em vista que a maioria dos estudos que relacionam o zinco à resposta imune envolvem modelos experimentais, e que a suplementação com o mineral, mesmo em quantidades abaixo da RDA, pode reduzir a inflamação em pacientes com RCU, sugere-se mais estudos que envolvam a suplementação com diferentes concentrações e tempos de avaliação, em pacientes em diferentes estágios da doença, para melhor entendimento acerca da influência desse micronutriente na

resposta inflamatória, bem como estabelecer a quantidade adequada do mineral para a modulação da resposta imune.

## 7 CONCLUSÃO

Os pacientes com RCU apresentam ingestão adequada de macronutrientes, porém insuficiente para calorias e zinco.

A intervenção com gluconato de zinco promoveu melhora no estado nutricional relativo ao mineral nos pacientes submetidos a essa intervenção.

Dentre as citocinas investigadas, a suplementação mostrou efeito na resposta imune com alterações nas concentrações da interleucinas IL-2 e IL-10.

Nos pacientes com RCU a suplementação mostrou-se eficaz em relação ao estado nutricional relativo ao mineral e contribuiu para a redução do estado inflamatório nesses pacientes.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, C.; CHO, J.H. Inflammatory bowel disease. **N Engl J Med.**, v.61, n.21, p.2066-78, 2009.
- ACTIS, G. C.; ROSINA, F. Inflammatory bowel disease: a dysregulated disorder of outer environment sensor systems. **World J Gastrointest Pharmacol Ther.**, v. 6, n. 4, p. 41-46, 2013.
- ATREYA, R.; NEURATH, M.F. Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. **Clin Rev Allergy Immunol.**, v.28, n.03, p.187-196, 2005.
- ATTRIDGE, K. et al. IL-21 inhibits T cell IL-2 production and impairs Treg homeostasis. **Blood**, v. 119, n. 20, p. 4656-4664, 2012.
- AUTSCHBACH, F. et al. In situ expression of interleukin-10 in noninflamed human gut and in inflammatory bowel disease. **Am J Pathol.**, v.153, n.01, p.121-130, 1998.
- AYDEMIR, T. B.; MCCLELLAN, S.; LIUZZI, J. P.; COUSINS, R. J., Zinc Transporter ZIP8 (SLC39a8) Influences Human T cell activation. **J. Leukoc. Biol.**, v.86, p.337–348, 2009.
- BAMIAS, G., ARSENEAU, K.O., COMINELLI, F. Cytokines and Mucosal Immunity. **Curr Opin Gastroenterol.**, v.30, n.6, p. 547–552, 2014.
- BAUMGART, D.C.; SANDBORN, W.J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. **Lancet**, v.369, n. 9573, p.1641-1657, 2007.
- BECKER, C. et al. TGF- $\beta$  suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. **Immunity**, v. 21, n.04, p.491-501, 2004.
- BEERY, M., KANE, S. Current approaches to the management of new-onset ulcerative colitis. **Clin Exp Gastroenterol.**, v.7, n.1, p.111-132, 2014.
- BIANCHERIA, P. et al. Proteases and the intestinal barrier. **Cell Tissue Res.**, v. 351, p. 269-280, 2013.
- BONAVENTURA, P.; BENEDETTI, G.; ALBARÈDE, F.; MIOSSEC, P. Zinc and its role in immunity and inflammation. **Autoimmun Rev**, v.14, n.01, p.277–285, 2015.
- BOYMAN, O.; SPRENT, J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. **Nat Rev Immunol.**, v.12, n.03, p.180-190, 2012.
- BUCHBINDER, E.I.; McDERMOTT, D.F. Interferon, Interleukin-2, and other cytokines. **Hematol Oncol Clin N Am**, v.28, n.03, p.571–583, 2014.
- CARVALHO, A.T. et al. Immunohistochemical study of intestinal eosinophils in inflammatory bowel disease. **J Clin Gastroenterol.**, v.36, n.02, p.120-125, 2003.

CHAIGNE-DELALANDE, B.; LENARDO, M. J. Divalent cation signaling in immune cells. **Trends Immunol.**, v.35, n.07, p.332-344, 2014.

CHAN, S.S.M., LUBEN, R., VAN SCHAİK, F. et al. Carbohydrate Intake in the Etiology of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. **Inflammatory Bowel Diseases.**, v.20, n.11, p.2013-2021, 2014.

CONRAD, K.; ROGGENBUCK, D.; LAASS, M.W. Diagnosis and classification of ulcerative colitis. **Autoimmun Rev**, v.13, n.01, p.463-466, 2014.

COSTA, T.B.; MORAIS, N.G.; ALMEIDA, T.M. et al. Desnutrição neonatal e produção de IFN- $\gamma$  IL-12 e IL-10 por macrófagos/linfócitos: estudo da infecção celular, in vitro, por Staphylococcus aureus meticilina sensível e meticilina resistente. **Rev. Nutr.** v.25, n.5, 2012).

CURFS, J.H.; MEIS, J.F. e HOOGKAMP-KORSTANJE, J.A. A Primer on Cytokines: Sources, Receptors, Effects, and Inducers. **Clinical Microbiology Reviews**, v.10, n.4, p.742-780, 1997.

DEVIRGILIIS, C. et al. Zinc fluxes and zinc transporter genes in chronic diseases. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 622, n. 1-2, p. 84-93, 2007.

FAA, G. et al. Zinc in gastrointestinal and liver disease. **Coord. Chem. Rev.**, v.252, p.1257-1269, 2008.

FONSECA-CAMARILLO, G. et al. Interleukin 17 gene and protein expression are increased in patients with ulcerative colitis. **Inflamm Bowel Dis**, v.17, n.10, 2011.

FOSTER, M.; SAMMAN, S. Zinc and Regulation of Inflammatory Cytokines: Implications for Cardiometabolic Disease. **Nutrients**, v. 4, n. 7, p. 676-694, 2012.

FRAKER, P. J.; KING, L.E. Reprogramming of the immune system during zinc deficiency. **Annu Rev Nutr**, v.24, p.277-298, 2004.

FRANSSINETTI, S.; et al. The role of zinc in life: a review. **J Environ Pathol Toxicol Oncol**, v.25, n.3, p.597-610, 2006.

GEERLING, B. J. et al. Comprehensive nutritional status in recently diagnosed patients with inflammatory bowel disease compared with population controls. **Eur J Clin Nutr.**, v. 54, p. 514-521, 2000.

GEREMIA, A. et al. A. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. **Autoimmun. Rev.**, v.13, n.1, p.3-10, 2014.

GIBSON, R.S. Assessment of chromium, copper and zinc status. In: \_\_\_\_\_. (Org.). Principles of nutritional assessment. **Orford: Oxford University Press**, p.683-730, 2005.



GILL, S.R. et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. **Science**, v.312, n. 5778, p.1355-1359, 2006.

GONG, Y et al., The th17/treg immune balance in ulcerative colitis patients with two different chinese syndromes: dampness-heat in large intestine and spleen and kidney yang deficiency syndrome. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

GUO, L.; HU-LI, J.; PAUL, W.E. Probabilistic regulation of IL-4 production. **Journal of Clinical Immunology**, v.25, p.573-581, 2005.

GUTHIER, H. A.; PICCIANO, M. F. Micronutrient Minerals. In: GUTHIER, H. A.; PICCIANO, M. F.; eds. **Human nutrition**. New York. Mosby, p.351-357, 1994.

HAASE, H.; RINK, L. Zinc signals and immune function. **Bio Factors**, v. 40, p. 27-40, 2014.

HAMBIDGE, M. K. et al. Dietary reference intakes for zinc may require adjustment for phytate intake based upon model predictions. **J. Nutr.**, v.138, n.12, p. 2363-2366, 2008.

HANAUER, S.B. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. **Inflamm Bowel Dis.**, v.12, n.1, p.3-9, 2006.

HESS, S. Y.; PEERSON, J. M.; KING, J. C. Use of serum zinc concentration as an indicator of population zinc status. **Food Nutr Bull**, v. 28, p. S403–29, 2007.

HISAMATSU, T. et al. Immune aspects of the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Pharmacol Ther.** v. 137, n. 3, p. 283–297, 2013.

HO, L.T.; BOYAPATY, R.; SATSANG, J. **Ulcerative colitis**. v.43, n.5, P.276–281, 2015.

HUBER, S. et al. Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3<sup>-</sup> and Foxp3<sup>+</sup> regulatory CD4<sup>+</sup> T cells in an interleukin-10-dependent manner. **Immunity**, v.34, n.04, p.554–565, 2011.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Food and Nutrition Board: Dietary Reference Intakes**. Washington: National Academies Press, 2011.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 1ª edição digital. São Paulo: O Instituto, 2008. 1020 p.

IVANOV, I. I. et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. **Cell**, v.139, n.03, p.485-498, 2009.

JACKSON, M. J. Physiology of zinc: general aspects. **Zinc in Human Biology**, p. 1–14, 1989.

JIANG, J. W. et al., "Elevated levels of Th17 cells and Th17-related cytokines are associated with disease activity in patients with inflammatory bowel disease," **Inflammation Research**, v. 63, n. 11, p. 943–950, 2014.

JUNG, S., KIM, M.K.; CHOI, B.Y. The Relationship between Zinc Status and Inflammatory Marker Levels in Rural Korean Adults Aged 40 and Older. **PLoS ONE**, v.10, n.6, p.e013001, 2015.

KALTENBERG, J.; PLUM, L.M.; BAUM, J.L.; HO"NSCHEID, A.; RINK, L.; HAASE, H.. Zinc signals promote IL-2-dependent proliferation of T cells. **Eur. J. Immunol.**, v.40, p.1496–1503, 2010.

KAMBE, T. et al. The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. **Physiol Rev.**, v. 95, n. 3, p. 749-84, 2015.

KASER, A.; ZEISSIG, S.; BLUMERG, R. S. Inflammatory bowel disease. **Annu. Rev. Immunol**, v. 28, n.1, p. 573 – 621, 2010.

KHOR, B.; GARDET, A.; XAVIER, R.J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, v.474, n. 7351, p.307-317, 2011.

KIMURA A, KISHIMOTO T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. **Eur J Immunol**, v.40, n. 7 , p. 1830–5, 2010.

KING, J. C. et al. Biomarkers of Nutrition for Development (BOND)—Zinc Review. **J. Nutr**, v. 146, n. 4, p. 858S-885S, 2016.

KOROLKOVA, O. Y. Characterization of Serum Cytokine Profile in Predominantly Colonic Inflammatory Bowel Disease to Delineate Ulcerative and Crohn's Colitides. **Clinical Medicine Insights Gastroenterology**, v. 8, p. 29-44, 2015.

KORZENIK, J.; PODOLSKI, D. Evolving knowledge and therapy of inflammatory bowel disease. **Nat Rev Drug Discov.**, v.5, n.03, p.197-209, 2006.

KRYCZEK, I. et al. Cutting edge: IFN-gamma enables APC to promote memory Th17 and abate Th1 cell development. **J Immunol.**, v.181, n.09, p.5842–5846, 2008.

LEE, H., et al. Inhibition of interleukin-1 $\beta$ -mediated interleukin-1 receptor-associated kinase 4 phosphorylation by zinc leads to repression of memory T helper type 17 response in humans. **Immunology**, v.146, n.4, p.645-56, 2015.

LIVINGSTONE, C. Zinc: physiology, deficiency, and parenteral nutrition. **Nutr Clin Pract**, v.30, n.03, p.3371-382, 2015.

MACDONALD, T. T. et al. What is the best next target cytokines in IBD? **Inflamm Bowel Dis**, v. 18, p. 2180-2189, 2012.

MALEK, T. R.; CASTRO, I. Interleukin-2 Receptor Signaling: At the Interface between Tolerance and Immunity. **Immunity**, v. 33, n. 2, p. 153-165, 2010.

MALEK, T.R. The biology of interleukin-2. **Annu. Rev. Immunol.**, v.26, p.453-479, 2008.

MARET, W. Redox biochemistry of mammalian metallothioneins. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v.16, p.1079–1086, 2011.

MARKUS, F; NEURATH, A.; SUSETTA, F. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 22, p. 83–89, 2011.

MARTIN, T.D.; CHAN, S.S.M.; HART, A.R. Environmental Factors in the Relapse and Recurrence of Inflammatory Bowel Disease: A Review of the Literature. **Dig Dis Sci**, v.60, p.1396, 2015.

MOCCHEGIANI, E. et al. Micronutrient (Zn, Cu, Fe) gene interactions in ageing and inflammatory age-related diseases: Implications for treatments. **Ageing Res Rev.**, v.11, n.02, p.297-319, 2012.

MOLODECKY, N. A. et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. **Gastroenterology**. v. 142, p. 46–54, 2012.

MÚZES, G., et al. Changes of the cytokine profile in inflammatory bowel diseases. **World Journal of Gastroenterology : WJG.**, v.18, n.41, p.5848-5861, 2012.

NEURATH, M.F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v.14, p.329–342, 2014.

ORDÁS, I. et al. Ulcerative colitis. **Lancet**, v. 380, p. 1606-1619, 2012.

ORHOLM, V.; BINDER, T.I.; SORENSEN, L.P.; RASMUSSEN, K.O. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. **Scand J Gastroenterol**, v. 35, n.10, p.1075–1081, 2000.

OUYANG, W. et al. Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 71-109, 2011.

PARENTE, J. M. L. et al. “Inflammatory Bowel Disease in an Underdeveloped Region of Northeastern Brazil.” **World Journal of Gastroenterology** : v.21, n.4, p.1197–1206, 2016.

PEREZ-LOPEZ, A. et al. Mucosal immunity to pathogenic intestinal bacteria. **Nature Reviews Immunology**, v.16, n.1, p.135–148, 2016.

PETERSON, D. A.; FRANK, D. N.; PACE, N. R.; GORDON, J.I. Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. **Cell Host Microbe**, v.3, n.06, p.417-427, 2008.

PIZARRO, T.T.; COMINELLI, F. Cytokine therapy for Crohn's disease: advances in translational research. **Annu Rev Med.**, v.58, p.433-444, 2007.

PLUM, L.M. et al. PTEN-inhibition by zinc ions augments interleukin-2-mediated Akt phosphorylation. **Metallomics**, v.6, p.1277-1287, 2014.

PRASAD, A. S. Discovery of Human Zinc Deficiency: Its Impact on Human Health and Disease. **Adv Nutr.**, v.04, n.02, p.176-190, 2013.

PRASAD, A.S.; BECK, F.W.; BAO, B.; FITZGERALD, J.T.; SNELL, D.C.; STEINBERG, J.D. ; CARDOZO, L.J . Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. **Am J Clin Nutr.**v.85, n.3, p.837-44, 2007.

PRASAD, A. S.; HALSTED, J. A.; NADIMI, M. Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia. **Am J Med.**, v. 31, p. 532–546, 1961.

QUEIROZ, C.A. et al. Zinc treatment ameliorates diarrhea and intestinal inflammation. **BMC Gastroenterol**, v. 14, n. 136, 2014.

RODRÍGUEZ, L.; GONZÁLEZ, C.; FLORES L.; JIMÉNEZ Z.L.; GRANIEL, J. ORTIZ, R. Assessment by flow cytometry of cytokine production in malnourished children. **Clin Diagn Lab Immunol.**, v.12, n.4, p.5027, 2005.

RODRIGUEZ, M.P. et al. A simple method for the determination of zinc human plasma levels by flame atomic absorption spectrophotometry. **At. Spectrosc**, Norwalk, v.10, n.2, p.68-70, 1989.

SANCHEZ-MUNOZ, F.; DOMINGUEZ-LOPEZ, A.; YAMAMOTO-FURUSHO, J.K. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, v.14, n.27, p.4280-4288, 2008.

SANTOS, L.A.A., et al. Terapia nutricional nas doenças inflamatórias intestinais: artigo de revisão. **Nutrire**, v.40, n.3, p.383-396, 2015.

SATO, T.A., WINMER, M.B., FINKELMAN, F.D., et al. Recombinant soluble murine IL4 receptor can inhibit or enhance IgE responses in vivo. **J Immunol.**, v.150, p.2717-2723, 1993.

SILVA, A.F.; SCHIEFERDECKER, M.E.M.; AMARANTE, H.M.B.S. Ingestão alimentar em pacientes com doença inflamatória intestinal. **Arq Bras Cir Dig.**, v.24, n.3, p.204-209, 2011.

SKROVANEK, S. et al. Zinc and gastrointestinal disease. **World J Gastrointest Pathophysiol.**, v. 5, n. 4, p. 496-513, 2014.

SOUZA, J. R. M. et al. Serum levels of interleukin-6 (Il-6), interleukin-18 (Il-18) and C-reactive protein (CRP) in patients with type-2 diabetes and acute coronary syndrome without ST-segment elevation. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 90, n. 2, p. 94-99, 2008.

STEFANOWICZ, F. A., et al. Erythrocyte selenium concentration as a marker of selenium status. **Clinical Nutrition**, v. 32, p. 837-842, 2013.

SUWENDI, E. et al. Zinc deficiency induces dysregulation of cytokine productions in an experimental colitis of rats. **Biomed Res.**, v.33, n.6, p.329-36, 2012.

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

VALERIO, T.A.; et al. Marcadores inflamatórios e oxidativos em sangue de cordão umbilical como preditores de gravidade em sepse neonatal. **Rev Bras Ter Intensiva**.v.24, n.1, p:30-34, 2012.

VAN DAEL, P.; DEELSTRA, H. Selenium. **Inter J for Vitamin and Nutr Research**, v. 63, n. 4, p. 312-16, 1993.

VAN ASSENDELFT, O. W.; The measurement of hemoglobin. In: IZAK, G.; LEWIS, S.M. eds. *Modern concepts in hematology*. New York: **Academic press**, p.14-25, 1972.

VICTORIA, C.R. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo State, Brazil. **Arq. Gastroenterol.**, v.46, n.01, p. 20-25, 2009.

VIGNALI, D. A.; COLLISON, L.W.; WORKMAN, C.J. How regulatory T cells work. **Nature Rev Immunol.**, v.8, n.07, p.523–532, 2008.

WANG, Y. et al. Expression of CD4+ forkhead box P3 (FOXP3)+ regulatory T cells in inflammatory bowel disease. **J Dig Dis**. v.12, p.286–294, 2011.

WEAVER, C.T.; HALTTON, R.D.; MANGAN, P.R.; HARRINGTON, L.E. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. **Annu. Rev Immunol.**, v.25, p.821-852, 2007.

WESSELLS, K. R. et al. Plasma zinc concentration responds rapidly to the initiation and discontinuation of short-term zinc supplementation in healthy men. **J Nutr.**, v.140, p.2128–33, 2010.

WESSELLS, K.R.; BROWN, K.H. Estimating the Global Prevalence of Zinc Deficiency: Results Based on Zinc Availability in National Food Supplies and the Prevalence of Stunting. **PLoS ONE**. v.7, n.11, 2012.

WHITEHOUSE, R. C.; PRASAD, A. S.; RABBANI, P. I., COSSACK, Z. T. Zinc in plasma, neutrophils, lymphocytes, and erythrocytes as determined by flameless atomic absorption spectrophotometry. **Clin Chem**, Detroit, v.28, n.3, p.475-80, 1982.

WONG, C.P.; RINALDI, N.A.; H.O. E. Zinc deficiency enhanced inflammatory response by increasing immune cell activation and inducing IL6 promoter demethylation. **Mol Nutr Food Res.**, v.59, n.5, p.991-9, 2015.

YU, M. et al. Regulation of T cell receptor signaling by activation-induced zinc influx. **J Exp Med**, v. 208, p. 775–785, 2011.

ZEITOUN, A. A. et al. Evaluation of neutrophilic CD64, interleukin 10 and procalcitonin as diagnostic markers of early- and late-onset neonatal sepsis. **Scand J Infect Dis.**, v.42, n.04, p.299-305, 2010.

ZHU, J.F.; YAMANE, H; PAUL, W.E. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. **Annual Review of Immunology**, v. 28, p. 445-489, 2010.

## APÊNDICE A

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO  
Campus Universitário Ministro Petrônio Portella - Bairro Ininga – Teresina/PI  
CEP: 64049-550 - Fone (86) 3237-2062  
E-mail: [ppgan@ufpi.edu.br](mailto:ppgan@ufpi.edu.br)

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Título do projeto:** Estresse oxidativo e atividade de citocinas na doença inflamatória intestinal.

**Pesquisador responsável:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira.

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

**Pesquisadores participantes:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira, Mayara Storel Beserra de Moura, Nina Rosa Mello Soares, Susy Érika de Lima Barros.

**Telefone para contato (inclusive a cobrar):** (86) 8858-1679/ (86) 9829-0728/ (86)9986-6162/ (86) 9927-4060

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), em uma pesquisa. Você precisa decidir se quer participar ou não. Por favor, não se apresse em tomar a decisão. Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pelo estudo sobre qualquer dúvida que tiver. Este estudo será conduzido pelas Mestrandas Mayara Storel Beserra de Moura, Nina Rosa Mello Soares, Susy Érika de Lima Barros, sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine este documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, você não será penalizado (a). Em caso de dúvida, você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí pelo telefone (086) 3215 5437.

#### DESCRIÇÃO DA PESQUISA

Esta pesquisa tem por objetivo analisar “O perfil nutricional relativo a minerais e vitaminas do complexo B, de marcadores do estresse oxidativo e inflamatório em pacientes com doença inflamatória intestinal”. Para tanto, o voluntário (a) será submetido (a) à coleta de sangue venoso para análise do zinco, selênio e vitaminas do complexo B, determinação de citocinas pró e antiinflamatórias, malondialdeído, isoprostanos e grupos carbonílicos; e, além disso, será determinado o consumo alimentar por meio de registros alimentares. Não será realizada entrevista gravada ou filmada. Ao participar da pesquisa, o voluntário (a) não sofrerá nenhum prejuízo; no entanto, poderá sentir leve desconforto em vista da coleta do material biológico requerido para realização desta pesquisa. Alguns procedimentos deverão realizar-se junto à Universidade Federal do Piauí, cabendo ao voluntário e/ou responsável comparecer à mesma quando for solicitado (a), em dia e hora a serem estabelecidos de acordo com a disponibilidade de ambas as partes (pesquisador (a) e voluntário (a)).

Os participantes do estudo terão como benefícios os resultados dos exames bioquímicos das amostras de sangue, que serão fornecidos após a realização dos mesmos, e orientação nutricional. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de

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

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

**Nomes e assinaturas dos pesquisadores:**

Nadir do Nascimento Nogueira \_\_\_\_\_

Mayara Storel Beserra de Moura \_\_\_\_\_

Nina Rosa Mello Soares \_\_\_\_\_

Susy Érika de Lima Barros \_\_\_\_\_

**CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO**

Eu, \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar do estudo “Estresse oxidativo e atividade de citocinas na doença inflamatória intestinal”, como sujeito. Tive pleno conhecimento das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo. Discuti com as mestrandas acima citadas sobre a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais serão os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo, voluntariamente, em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo. A retirada do consentimento ao estudo não acarretará penalidades ou prejuízos.

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

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

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

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

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

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

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

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



## APÊNDICE B

### Protocolo de acompanhamento dos pacientes



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E SAÚDE E**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO**

**PROJETO:** Estado nutricional e marcadores do estresse oxidativo, inflamação e expressão gênica de metaloproteínas na Doença Inflamatória Intestinal

### PROTOCOLO DA PESQUISA

Nº do Formulário: \_\_\_\_\_

**Iniciais** \_\_\_\_\_

Nº do Prontuário: \_\_\_\_\_

DADOS SOCIO-ECONÔMICO-EDUCACIONAL	
Nome: _____	
Endereço: _____	
Ponto de referência: _____	
Cidade: _____	Estado: _____
Telefones: _____	
Data de nascimento: ____/____/____	Idade: _____
Sexo: ( ) masculino ( ) feminino	
<b>Se mulher:</b> Está grávida? ( ) sim ( ) não	
Está amamentando? ( ) sim ( ) não	
HÁBITOS DE VIDA	
Você <b>fuma</b> ? ( ) sim ( ) não ( ) parou	
Há quanto tempo parou? _____	
Em sua casa, alguém fuma? ( ) sim ( ) não	
Você consome alguma <b>bebida alcoólica</b> ? ( ) sim ( ) não	
Qual? ( ) cerveja ( ) cachaça ( ) vinho	
Quantos dias na semana? ( ) 1 ( ) 2 ( ) 3 ( ) 4 ( ) 5 ( ) 6 ( ) 7 ( ) raro/social	
Qual a quantidade? _____	
HISTÓRICO CLÍNICO E FAMILIAR	
Entre seus pais e irmãos, alguém também tem DII? ( ) sim _____ ( ) não	
Você faz uso de algum <b>suplemento vitamínico mineral</b> ( ) sim ( ) não	
Se <b>SIM</b> , qual? _____	
Há quanto tempo você usa? _____	
Além da DII, você tem outra doença?	
( ) DCV ( ) DM ( ) Hepatopatia ( ) Nefropatias ( ) Câncer ( ) AIDS	
( ) Outra _____	
Você faz uso de <b>medicamentos</b> ? ( ) sim ( ) não	
( ) Mesalazina ou sulfalazina ( ) Azatioprina ( ) corticosteróides - _____	
( ) Outros _____	
<b>Terapia biológica</b>	

<input type="checkbox"/> Infiximabe <input type="checkbox"/> Adalimumabe <input type="checkbox"/> outros _____ Se terapia biológica, quanto tempo faz uso _____ <input type="checkbox"/> parou – tempo _____			
Qual a forma da DII? <input type="checkbox"/> RCIU <input type="checkbox"/> Crohn <input type="checkbox"/> As duas <input type="checkbox"/> Indeterminada Quando você descobriu a sua doença? _____ Você já fez cirurgia para retirada de parte do intestino? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não Tempo _____ Se sim, qual parte _____ Quantos cm _____ <input type="checkbox"/> ressecção ileocecal – ano: _____ <input type="checkbox"/> strictuloplastia – ano: _____ <input type="checkbox"/> ressecção de delgado – ano: _____ <input type="checkbox"/> proctocolectomia – ano: _____ <input type="checkbox"/> colectomia subtotal – ano: _____ <input type="checkbox"/> hemicolectomia E - ano: _____ <input type="checkbox"/> disf. de ileostomia – ano: _____ <input type="checkbox"/> disf. de colostomia – ano: _____ A doença está: <input type="checkbox"/> ativa <input type="checkbox"/> remissão			
CLASSIFICAÇÃO PARA RCU			
Score de Mayo para avaliação da atividade da RCU			
<b>1. Frequência das dejeções</b>			
Número habitual de dejeções/dia -----			0
1 a 2 dejeções a mais que o habitual -----			1
3 a 4 dejeções a mais que o habitual -----			2
5 ou mais dejeções a mais que o habitual -----			3
<b>2. Hemorragia retal</b>			
Ausência de hemorragia retal -----			0
Raios de sangue nas fezes menos do que a metade das dejeções -----			1
Sangue vivo com as fezes na maioria das dejeções -----			2
Dejeções apenas de sangue -----			3
<b>3. Achados endoscópicos</b>			
Ausência de doença ou doença inativa -----			0
Diminuição do padrão vascular, leve friabilidade e eritema -----			1
Perda do padrão vascular, marcada friabilidade, erosões -----			2
Hemorragia espontânea, ulcerações -----			3
<b>4. Avaliação médica global</b>			
Normal -----			1
Doença leve -----			2
Doença moderada -----			3
Doença grave -----			4
<b>Total de pontos</b> _____			
DADOS ANTROPOMÉTRICOS			
Peso usual			
Peso Atual			
Altura	(altura) <sup>2</sup>	IMC	
%G	%MG	%Móssea	
Cbraco		Ccintura	
DADOS BIOQUÍMICOS			
Proteína C-reativa			
Contagem de plaquetas			
Albumina			
VHS			



## APÊNDICE C

### Diário alimentar

Nº Formulário: \_\_\_\_\_  
 Iniciais: \_\_\_\_\_

❖ Nós vamos avaliar sua alimentação. Pedimos que anote neste registro alimentar tudo que você comer e beber durante todo o dia e à noite. Você deverá anotar todos os alimentos consumidos, sendo 2 dias durante a semana e um dia no final de semana, totalizando 3 dias.

❖ Durante o preenchimento deste registro alimentar, alguns aspectos são importantes:

- 1 Preencher logo após o consumo do alimento;
- 2 Especificar as marcas dos alimentos industrializados;
- 3 Procurar identificar o tamanho das frutas, vegetais, pedaços de carne, ou a quantidade que cada alimento é consumido, bem como o tipo de preparação (frito, cozido, assado) e caso haja molho, que tipo foi utilizado.
- 4 Diferenciar qual o utensílio é usado, por exemplo:
  - 1 Colher – de chá, de sobremesa, de sopa, de servir ou concha
  - 2 Xícara – de chá ou de café
  - 3 Copo – grande ou de requeijão (americano)
  - 4 Prato de sobremesa

Nº de pessoas na casa: \_\_\_\_\_

5 Consumo mensal de óleo da família: \_\_\_\_\_

6 Consumo mensal de sal da família: \_\_\_\_\_



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



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







## ANEXO A

### Escore de Mayo

#### Mayo Score ou Escore de atividade da atividade da Colite Ulcerativa

##### 1. Frequência das Evacuações\*

**Pontos**

0 = Número habitual de evacuações ao dia para o paciente

1 = Uma a duas evacuações a mais que o habitual

2 = Três a quatro evacuações a mais que o habitual

3 = Cinco ou mais evacuações a mais que o habitual

Subscore de 0 a 3

##### 2. Sangramento Retal

**Pontos**

0 = ausência de sangramento.

1 = raias de sangue com as fezes em menos do que a metade das evacuações.

2 = sangue vivo com as fezes na maioria das evacuações.

3 = evacuações contendo apenas sangue.

Subscore de 0 a 3

##### 3. Achados Endoscópicos

**Pontos**

0 = ausência de doença ou doença inativa.

1 = doença leve (enanema, diminuição do padrão vascular, leve friabilidade).

2 = doença moderada (enanema evidente, perda do padrão vascular, friabilidade, erosões)

3 = doença grave (sangramento espontâneo, ulcerações).

Subscore de 0 a 3

##### 4. Avaliação Médica Global \*\*

**Pontos**

0 = normal.

1 = doença leve.

2 = doença moderada.

3 = doença grave.

Subscore de 0 a 3

O *Mayo score* é a soma dos quatro subscores, totalizando um máximo de 12 pontos.

\* Cada paciente serve como controle para si mesmo no estabelecimento do grau de anormalidade da frequência das evacuações.

\*\* a avaliação médica global leva em consideração a queixa diária do paciente de desconforto abdominal, a sensação geral de bem-estar, achados do exame físico e a performance do paciente para atividades diárias.

## ANEXO B

## Parecer Consubstanciado do CEP



UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PIAÚÍ - UFPI



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Estresse oxidativo e atividade de citocinas na doença inflamatória intestinal.

**Pesquisador:** Nadir do Nascimento Nogueira

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 32479814.2.0000.5214

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

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 985.361

**Data da Relatoria:** 12/02/2015

**Apresentação do Projeto:**

Estudo de natureza transversal envolverá 188 pacientes que apresentam doença inflamatória intestinal (Doença de Crohn ou Colite Ulcerativa), de ambos os sexos, faixa etária entre 20 e 59 anos, que fazem parte da Associação dos Portadores da Doença de Crohn do Norte e Nordeste do Brasil (ACROHNN), assistidos no Hospital Universitário (HU) da Universidade Federal do Piauí – UFPI.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Analisar o perfil nutricional relativo a minerais e vitaminas do complexo B, de marcadores do estresse oxidativo e inflamatório em pacientes com doença inflamatória intestinal.

**Objetivo Secundário:**

Analisar o consumo alimentar de macronutrientes e micronutrientes e sua adequação nutricional; Determinar as concentrações plasmáticas de zinco, selênio, vitamina B12 e folato e homocisteína; Analisar as concentrações plasmáticas de malondialdeído, isoprostano e grupos carbonila; Determinar a atividade da enzima superóxido dismutase e glutathione peroxidase; Quantificar interleucinas com ação pró e antiinflamatórias nos pacientes; Analisar a expressão de genes codificadores das proteínas transportadores de zinco ZnT e Zip; Identificar biomarcadores de estresse oxidativo e inflamatórios para o diagnóstico

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



## ANEXO B (continuação)

### Parecer Consubstanciado do CEP



Continuação do Parecer: 985.361

precoce e monitoramento da DII.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

"Riscos:

Dentre as dificuldades que poderão interferir na execução do estudo está a adesão dos pacientes que irão compor a amostra. Para contornar essa dificuldade, pode-se adotar como estratégia a sensibilização dos mesmos, mostrando os benefícios que o estudo poderá trazer, além de aumentar o tempo de coleta de dados, a fim de garantir um número suficiente de pacientes para o alcance dos objetivos.

Benefícios:

Com base na contextualização do problema, é importante a realização de estudos que propiciem melhor entendimento sobre aspectos metabólicos envolvidos na defesa antioxidante, com participação de vitaminas e oligominerais, e na resposta inflamatória, para que ocorra melhorias no diagnóstico e tratamento de pacientes com DII."

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa de tema relevante pois com base na contextualização do problema, é importante a realização de estudos que propiciem melhor entendimento sobre aspectos metabólicos envolvidos na defesa antioxidante, com participação de vitaminas e oligominerais, e na resposta inflamatória de pacientes com DII.

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

Todos os termos obrigatórios foram apresentados.

#### **Recomendações:**

Sem recomendações.

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

Projeto apto para aprovação.

#### **Situação do Parecer:**

Aprovado

#### **Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

#### **Considerações Finais a critério do CEP:**

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

**ANEXO B (continuação)**  
**Parecer Consubstanciado do CEP**



Continuação do Parecer: 985.361

TERESINA, 10 de Março de 2015

  
Assinado por:  
Adriana de Alencar Setubal Santos  
(Coordenadora)

Profª Adriana de Alencar Setubal Santos  
Coordenadora CEP-UFPI  
Portaria Pesquisa nº 162014

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

**ANEXO C****CARTA DE APROVAÇÃO DO CEP / HU****EBSER**

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS HOSPITALARES  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO / UFPI  
CAMPUS UNIVERSITÁRIO PETRÔNIO PORTELLA S/N – BAIRRO ININGA  
CEP: 64049-550 – TERESINA-PI**

**CARTA DE APROVAÇÃO Nº 41/15**

Após análise do protocolo de pesquisa n. 41/15, intitulado “ESTADO NUTRICIONAL E MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO E EXPRESSÃO GÊNICA DE METALOPRÓTEINAS NA DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL” comunicamos que o mesmo recebeu parecer **favorável** para realização da referida pesquisa, sendo realizada junto a Unidade de Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário.

Teresina, 01 de Abril de 2015

**Dr. Lauro Loureiral Lopes Filho  
Presidente da CAAP- HUPI**