



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

**NINA ROSA MELLO SOARES**

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ZINCO NA EXPRESSÃO GÊNICA DE  
METALOPROTEÍNAS E NA MODULAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS  
NA RETOCOLITE ULCERATIVA

TERESINA

2016

**NINA ROSA MELLO SOARES**

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ZINCO NA EXPRESSÃO GÊNICA DE  
METALOPROTEÍNAS E NA MODULAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS  
NA RETOCOLITE ULCERATIVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Piauí para obtenção do título de mestre.

**Orientadora:**

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

**Co-orientadora:**

Profa. Dra. Dilina do Nascimento Marreiro

TERESINA

2016

**NINA ROSA MELLO SOARES**

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ZINCO NA EXPRESSÃO GÊNICA DE  
METALOPROTEÍNAS E NA MODULAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS  
NA RETOCOLITE ULCERATIVA**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da  
Universidade Federal do Piauí para  
obtenção do título de mestre.

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

Banca examinadora:

---

Presidente: Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

---

1º Examinador: Dra. Maria Luísa Pereira de Melo

---

2º Examinador: Dra. Karoline de Macêdo Gonçalves Frota

---

Examinador Suplente: Dra. Flaviane Alves de Pinho

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

S876e Soares, Nina Rosa Mello.  
Efeito da suplementação com zinco na expressão gênica de metaloproteínas e na modulação de citocinas inflamatórias na retocolite ulcerativa / Nina Rosa Mello Soares. -- Teresina, 2016.  
69 f.

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

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

CDD 613.2

Aos pacientes com retocolite ulcerativa  
participantes desta pesquisa, por  
acreditarem que a ciência é capaz de trazer  
melhores perspectivas de vida.

## **AGRADECIMENTOS**

O desafio de encontrar, na ciência, respostas que possam melhorar a qualidade de vida de indivíduos com doença crônica envolve um caminho longo e difícil. Mas, quando essa trajetória é percorrida com a proteção divina e o apoio e torcida de familiares, amigos e colaboradores, as dificuldades se tornam pequenas diante das expectativas.

Agradeço a Nosso Senhor Jesus Cristo e a Nossa Senhora, por serem amigos diários, sempre presentes, enviando sinais e mensagens que me guiam e iluminam em cada passo da minha vida.

Aos meus pais, por tudo...pelos valores que hoje fazem de mim que eu sou, pelo incentivo, pelos exemplos...e pelo amor infinito.

Aos meus irmãos e sobrinhos, pela energia positiva repassada a mim e por me lembrarem a cada dia que é no presente que construímos um futuro melhor.

À minha orientadora, Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira, exemplo de dedicação. Obrigada pela confiança, apoio e orientações, que contribuíram bastante para o meu crescimento profissional.

À Universidade Federal do Piauí, especificamente ao programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, pela oportunidade de ampliar os conhecimentos na área da pesquisa científica.

A todas as professoras do Departamento de Nutrição da UFPI, pelos ensinamentos, desde a graduação, e, por acreditarem no meu potencial.

Aos funcionários do Departamento de Nutrição, pelo empenho em ajudar com detalhes diários que permitiram a realização desta pesquisa.

À turma de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, biênio 2014-2016, pelo companheirismo e troca de ensinamentos ao longo do curso.

À Profa. Dra. Dilina do Nascimento Marreiro e ao grupo de estudo que compõe o Laboratório de Nutrição Experimental (LANEX), pelos quais tenho carinho especial, por fazerem parte da minha trajetória na pesquisa científica, desde o início.

À Mayara Storel, pela presença diária em todas as etapas da pesquisa, sempre mostrando paciência, compreensão, otimismo, dedicação e companheirismo. Obrigada pela amizade e pelos importantes momentos de troca de informações que muito me fizeram crescer pessoalmente e profissionalmente. Obrigada também por me incluir no grupo de amigos Jumanji, aos quais agradeço pelos momentos de distração e diversão e pelas conversas acerca das perspectivas das pesquisas científicas.

Aos funcionários do Hospital Universitário da UFPI, pelo apoio no recrutamento e coleta de sangue dos pacientes.

Ao grupo GERATEC, da Universidade Estadual do Piauí (UESPI) e ao Laboratório de Química Analítica da UFPI, especificamente ao Tomas, pela disponibilidade e orientações no preparo de amostras e análises de zinco.

Ao Instituto de Doenças Tropicais Nathan Portella, por viabilizar as análises de citocinas.

Ao Laboratório de Sanidade Animal (Lasan), especificamente à Flaviane, pela disponibilidade em ensinar passo a passo as análises de biologia molecular, além de incentivar e apoiar durante todo o período de análises.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI), pelo apoio financeiro, que viabilizou economicamente esta pesquisa.

Aos pacientes participantes desta pesquisa.

E, a todos que contribuíram diretamente e indiretamente.

Muito Obrigada!!!

“Saber não basta; precisamos aplicar o conhecimento. Desejar não basta; é preciso realizar.”

(Leonardo Da Vinci)

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A Retocolite Ulcerativa (RCU) é caracterizada por repostas imunológicas contra o próprio trato gastrointestinal, causando inflamação crônica, com aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (EROs). Nesse sentido, destaca-se a importância do aporte adequado de zinco, mineral antioxidante, que atua na neutralização de EROs e na modulação da inflamação. **MÉTODOS:** Estudo de intervenção, cego, que envolveu 41 pacientes diagnosticados com RCU em remissão e atividade da doença, de ambos os sexos, e faixa etária entre 20 e 69 anos. Todos os pacientes foram avaliados no tempo inicial do estudo (T0), e com base nas concentrações de zinco plasmático, receberam suplementação com 35 mg de gluconato de zinco/dia durante 30 dias ou com amido de milho, por igual período, e, foram reavaliados no tempo final do estudo (T1). O consumo alimentar habitual foi avaliado com Registro Alimentar de 3 dias. As análises de zinco plasmático e eritrocitário foram realizadas por espectrofotometria de absorção atômica de chama. Os níveis séricos de IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ , foram determinados por citometria de fluxo. E a expressão dos genes codificadores da metalotioneína (MT1G) e da proteína transportadora de zinco Zip14 foi determinada pela reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real. **RESULTADOS:** Os percentuais de adequação de nutrientes revelaram consumo inadequado de calorias e zinco, sendo este estatisticamente menor no grupo suplementado ( $P < 0,05$ ). O consumo de proteínas, carboidratos e lipídios tiveram distribuição adequada em relação ao aporte calórico. E o percentual de probabilidade de adequação da ingestão de zinco foi significativamente menor no grupo suplementado. As médias de zinco no plasma e no eritrócito indicaram diferença significativa no T0 entre grupo suplementado e placebo, com aumento significativo após a suplementação tanto no plasma ( $P < 0,01$ ) como no eritrócito ( $P < 0,05$ ). Apesar do aumento significativo nos parâmetros sanguíneos de zinco, nem todos os pacientes conseguiram alcançar o valor mínimo de referência para zinco plasmático e a média das concentrações eritrocitárias de zinco ainda permaneceram abaixo do valor mínimo de referência. As concentrações séricas de citocinas não variaram significativamente do T0 para o T1. Observou-se que, no T0, a IL-10 foi significativamente maior no grupo placebo e correlacionou-se positivamente com TNF- $\alpha$  no T1. As médias da expressão gênica da MT1G e da ZIP 14 reduziram significativamente após a suplementação ( $P < 0,05$ ). Relacionaram-se positivamente as expressões da MT1G e da Zip 14 e as concentrações séricas de TNF- $\alpha$  com a expressão da MT1G no T0. Houve correlação negativa entre zinco plasmático e expressão da MT1G e entre adequação da ingestão alimentar de zinco e expressão da ZIP 14. **CONCLUSÃO:** A suplementação com zinco modula a expressão gênica de proteínas carreadoras deste mineral, refletindo na sua melhor distribuição nos compartimentos celulares e em importantes alterações na resposta imunológica de pacientes com RCU.

**Palavras-chave:** Retocolite Ulcerativa; Suplementação com Zinco; Inflamação; Metaloproteínas.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Ulcerative Colitis (UC) is characterized by immune responses against own gastrointestinal tract, causing chronic inflammation, with increase proinflammatory cytokines production and reactive oxygen species (ROS). In this sense, it highlights the importance of adequate intake of zinc, an antioxidant mineral that acts to neutralize ROS and modulate inflammation.

**METHODS:** Intervention study, blind, which involved 41 ulcerative colitis patients in remission and disease activity, of both sex and aged 20 and 69 years. All patients were evaluated at baseline (T0), and according to plasma zinc concentrations were supplemented with 35 mg zinc gluconate/day for 30 days or corn starch for the same period and were reassessed after intervention (T1). The usual dietary intake was assessed with 3 days Food Registration. Analyses of plasma and erythrocyte zinc were carried out by atomic absorption spectrophotometry flame. Serum IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  were determined by flow cytometry. And the expression of genes encoding metallothionein (MT1G) and carrier protein Zip14 zinc was determined by quantitative polymerase chain in real time reaction.**RESULTS:** Nutrient adequacy percentages have revealed inadequate intake of calories and zinc, which were statistically lower in the supplemented group ( $P < 0.05$ ). The consumption of protein, carbohydrates and lipids shown adequate distribution in relation to calorie intake. And adequacy of probability percentage of zinc intake was significantly lower in supplemented group. Plasma zinc and erythrocyte mean indicated significant difference between the 2 groups studied at T0 with a significant increase after supplementation in both, plasma ( $P < 0.01$ ) and erythrocyte ( $P < 0.05$ ). Despite the significant increase in blood zinc parameters, not all patients have achieved the minimum reference value for plasma zinc and mean of zinc erythrocyte concentrations remained below the minimum reference value. Serum concentrations of cytokines did not change significantly from T0 to T1. It was observed that, at T0, IL-10 was significantly higher in placebo group and is positively correlated with TNF- $\alpha$  at T1. The mean of MT1G and ZIP 14 gene expression reduced significantly after supplementation ( $P < 0.05$ ). There was positive relation between MT1G and Zip 14 expression and serum concentrations of TNF- $\alpha$  and MT1G expression at T0. There was a negative correlation between plasma zinc and MT1G expression and between adequate dietary intake of zinc and ZIP 14 expression **CONCLUSION:** Zinc supplementation modulates gene expression of zinc carrier proteins reflecting on their best distribution in cell compartments and on important changes in the immune response of patients with ulcerative colitis.

**Keywords:** Ulcerative Colitis; Zinc Supplementation; Inflammation; Metalloproteins.

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**DII:** Doenças Inflamatórias Intestinais

**DC:** Doença de Crohn

**RCU:** Retocolite Ulcerativa

**EROs:** Espécies Reativas de Oxigênio

**SOD:** Superóxido Dismutase

**MT:** Metalotioneína

**ZnT:** Zinc Transporters

**Zip:** ZRT and IRT-like proteins

**SLC39A:** Solute Carrier Family 39A

**SLC30A:** Solute Carrier Family 30A

**OMS:** Organização Mundial de Saúde

**DRI:** Dietary References Intake

**RDA:** Recomendado Dietary Allowance

**RNA<sub>m</sub>:** Ácido Ribonucléico mensageiro

**FTMR-1:** Fator de transcrição Metal Responsivo 1

**DNA:** Ácido Desoxirribonucléico

**TLR:** Receptores do tipo Toll like

**TNF- $\alpha$ :** Fator de Necrose Tumoral alfa

**IL:** Interleucina

**PMN:** Polimorfonucleares

**PCR:** Proteína C Reativa

**ACROHNN:** Associação dos Portadores de Doença de Crohn do Norte e Nordeste do Brasil

**HU:** Hospital universitário

**UFPI:** Universidade Federal do Piauí

**CNS:** Conselho Nacional de Saúde

**CEP:** Comitê de Ética em Pesquisa

**T0:** Tempo inicial do estudo

**T1:** Tempo final do estudo

**Zn:** Zinco

**TACO:** Tabela Brasileira de Composição de Alimentos

**EER:** Estimated Energy Requirements

**AMDR:** Acceptable Macronutrient Distribution Range

**EAR:** Estimated Average Requirement

**ACD:** Ácido cítrico; Citrato e Dextrose

**CBA:** Cytometric Bead Array

**DEPC:** Água bidestilada, tratada com 0,1% de dietilpirocarbonato

**cDNA:** DNA complementar

**qrt-PCR:** Reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real

**PRIMER:** Iniciador

**GAPDH:** Glyceraldehyde 3-phospate dehydrogenase

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – Condições de trabalho de forno microondas para digestão de amostras sanguíneas.....	28
<b>TABELA 2</b> – Números de acesso no GenBank e sequências de bases nitrogenadas de primers.....	30
<b>TABELA 3</b> – Características gerais dos pacientes com RCU, assistidos no Hospital Universitário da UFPI.....	32
<b>TABELA 4</b> – Características gerais dos pacientes com RCU, segundo o tipo de intervenção.....	33
<b>TABELA 5</b> – Valores médios e desvios padrão do consumo alimentar; e percentuais de adequação do consumo de calorias, macronutrientes e zinco, segundo as recomendações nutricionais.....	34
<b>TABELA 6</b> – Valores médios e desvios padrão das concentrações plasmática e eritrocitária de zinco dos pacientes com RCU nos diferentes grupos e tempos estudados.....	35
<b>TABELA 7</b> – Correlações entre o percentual de probabilidade de adequação da ingestão de zinco e as concentrações plasmática e eritrocitária do mineral.....	36
<b>TABELA 8</b> – Valores médios e desvios padrão das concentrações séricas das citocinas de pacientes com RCU, segundo os grupos de intervenção e tempos estudados.....	37
<b>TABELA 9</b> – Valores médios e desvio padrão da expressão de RNAm dos genes MT1G e ZIP14 de pacientes com RCU, de acordo com o grupo estudado nos tempos T0 e T1.....	38

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – Fluxograma de arrolamento dos pacientes com RCU, atendidos no Hospital Universitário da UFPI .....25
- FIGURA 2** – Distribuição de pacientes do grupo suplementado, segundo a classificação do estado nutricional relativo ao zinco.....35
- FIGURA 3** – Correlação entre TNF- $\alpha$  e IL-10 em pacientes com RCU do grupo placebo no T1.....37
- FIGURA 4** – Correlação entre a expressão gênica da ZIP 14 e da MT1G em pacientes com RCU no T0.....38
- FIGURA 5** – Correlação entre a expressão gênica da MT1G e a concentração plasmática de Zn em pacientes com RCU no T0.....39
- FIGURA 6** – Correlação entre a expressão gênica da MT1G e concentração sérica de TNF- $\alpha$  em pacientes com RCU do grupo placebo no T0.....39

## SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	14
2.REVISÃO DE LITERAURA .....	16
2.1. Aspectos metabólicos, fisiológicos e nutricionais do zinco.....	16
2.2. Expressão gênica de metaloproteínas .....	18
2.3. RCU, inflamação e zinco.....	20
3.OBJETIVOS .....	23
Geral .....	23
Específicos.....	23
4.METODOLOGIA.....	24
4.1. Protocolo Experimental.....	24
4.2. Avaliação do Consumo Alimentar .....	24
4.3. Determinação dos Parâmetros Bioquímicos e Moleculares.....	26
4.3.1. Controle de contaminação e preparo de reagentes.....	26
4.3.2. Coleta e separação dos componentes do sangue .....	26
4.3.3. Determinação de zinco plasmático e eritrocitário .....	27
4.3.4. Determinação de interleucinas séricas .....	28
4.3.5. Determinação da expressão gênica da MT e da ZIP 14 .....	29
4.4. Análises Estatísticas .....	31
5.RESULTADOS .....	32
6.DISSCUSSÃO .....	40
7.CONCLUSÕES .....	44
8.REFERÊNCIAS.....	45
9.ANEXOS .....	55
10.APÊNDICES.....	63

## 1. INTRODUÇÃO

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) são representadas pela Doença de Crohn (DC) e pela Retocolite Ulcerativa (RCU) e caracterizadas por reações imunes contra o próprio trato gastrointestinal que resultam em inflamação crônica, com quadros clínicos de recidiva ou remissão (THUKKANI; WILLIAMS; SONNENBER, 2011).

A RCU caracteriza-se por inflamação crônica que se restringe à superfície da mucosa, com início no reto e se estendendo, de forma contínua, ao longo do cólon, resultando em diarreia sanguinolenta como principal sintoma (BAUMGART; SANDBORN, 2012).

A etiologia da RCU não é totalmente compreendida, contudo, sabe-se que esta é multifatorial, pois tanto a dieta quanto fatores ambientais, genéticos, intraluminais, alterações na barreira do epitélio intestinal e resposta imunológica anormal da mucosa contribuem para a manifestação desta doença (TSIANOS; KATSANOS; TSIANOS, 2011).

Esse conjunto de fatores ativam uma cascata imunoinflamatória no intestino, com infiltração de neutrófilos na mucosa inflamada que, uma vez ativados, produzem espécies reativas de oxigênio (EROs), gerando danos aos tecidos e culminando no estresse oxidativo (NAITO; TAKAGI; YOSHIKAWA, 2007; MAOR et al., 2008).

Nesse contexto, destaca-se a importância de nutrientes com ação antioxidante, a exemplo de minerais. O zinco atua em vários mecanismos relacionados à neutralização de EROs e à modulação da inflamação, uma vez que é componente essencial da enzima superóxido dismutase (SOD), que converte superóxidos em peróxido de hidrogênio, e da metalotioneína (MT), que inibe a propagação de radicais livres por meio de ligações seletivas com íons pró-oxidantes (TAPIERO; TEW, 2003; KREZEL; MARET, 2007; LAITY; ANDREWS, 2007).

A carência nutricional em pacientes com RCU é comum devido à menor ingestão alimentar, má absorção, maiores perdas e interações de nutrientes com medicamentos, e a deficiência de zinco pode contribuir para a inflamação crônica e lesão oxidativa devido ao excesso de EROs (HO, 2004; POWELL, 2000; MARET, 2000).

As metalotioneínas são proteínas que normalmente encontram-se no meio intracelular, e por isso, atuam como citoprotetores celulares, participando ativamente da neutralização de radicais livres e desintoxicação de metais pesados. Além disso, essas proteínas exercem papel fundamental no controle homeostático das concentrações intracelulares de zinco (BLINDAUER; LESZCZYSZYN, 2010).

Da mesma forma, as proteínas transportadoras de zinco também regulam a homeostase deste mineral, sendo conhecidas como transportadoras ZnT (Zinc Transporters) e Zip (ZRT and IRT-like proteins) (DEVIRGILIIS et al., 2007; WIJESEKARA et al., 2010). Destacando-se que as proteínas transportadoras da família Zip (SLC39A - Solute carrier family 39A) favorecem o aumento das concentrações citoplasmáticas de zinco por meio do influxo deste oligoelemento. Contrariamente, a atividade da família ZnT (SLC30A - Solute carrier family 30A) reduz o conteúdo intracelular de zinco, promovendo o efluxo deste mineral do citoplasma para o meio extracelular (CHI STIAKOV; VORONOVA, 2009; WIJESEKARA et al., 2010).

Contudo, o estado inflamatório que ocorre na RCU não é resultado somente do estresse oxidativo. Associado a este, a disfunção na regulação da barreira intestinal provoca a perda da tolerância à microbiota intestinal pela mucosa, elevando a expressão de citocinas inflamatórias, o que leva ao desequilíbrio entre atividade das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (KORZENIK; PODOLSKY, 2006).

Nesse sentido, o estudo de Liuzzi et al., (2005), mostrou que elevadas concentrações de citocinas pró-inflamatórias estão relacionados à maior expressão de algumas proteínas transportadoras de zinco. Assim, sugere-se que a hipozincemia observada em pacientes com RCU pode ocorrer devido à elevada expressão gênica de metaloproteínas.

Com base no referencial teórico apresentado, fica evidente a necessidade de investigações que propiciem melhor entendimento sobre o efeito da suplementação com zinco na expressão de metaloproteínas, na modulação de citocinas inflamatórias e na homeostase do zinco em pacientes com RCU, visando à identificação de terapia nutricional que melhore o monitoramento da doença.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Aspectos metabólicos, fisiológicos e nutricionais do zinco

O zinco é o segundo oligoelemento mais abundante no organismo humano, e, desempenha papel fundamental no metabolismo, atuando em funções estruturais, enzimáticas e reguladoras (MEUNIER et al., 2005; FUKADA; KAMBE, 2011). É um estabilizador de estruturas moleculares e componente fundamental para a atividade de enzimas, além disso, participa do metabolismo de carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, atuando na regulação da expressão gênica e no crescimento e reparo celular (MCCALL; HUANG; FIERKE, 2000).

No adulto, há cerca de 2 a 3 g de zinco em todos os tecidos e fluidos corporais. Aproximadamente 95% deste está no compartimento intracelular, concentrando-se no músculo esquelético (57%), osso (29%) e na pele (6%) (MASON, 2006).

No sangue, cerca de 80% do zinco é encontrado nos eritrócitos e 16% no plasma, e, apesar de conter menos de 0,5% do conteúdo total de zinco, o sangue representa o compartimento corporal mais importante deste mineral para o metabolismo (YUYAMA et al., 2005).

A absorção de zinco ocorre principalmente no jejuno e depende de transportadores específicos localizados na borda em escova dos enterócitos, como a proteína transportadora de zinco Zip-4. A quantidade absorvida é regulada por um mecanismo homeostático dependente de MT, que regula sua absorção e liberação. Dessa forma, quando há elevada concentração de zinco no organismo este permanece ligado à MT, sendo excretado nas fezes, por descamação epitelial, após a morte dos enterócitos (PRASAD, 2009).

Após ser transportado dos enterócitos, o zinco chega ao plasma, onde se liga majoritariamente à albumina e pela veia porta é levado até o fígado, onde é temporariamente armazenado nos hepatócitos, até ser novamente liberado no sangue, para ser acoplado a moléculas transportadoras que o levarão até os tecidos (OVESEN et al., 2001). Nos tecidos, o *turnover* de zinco é lento, e como não existe reserva, quando o aporte deste mineral é insuficiente é necessário que este seja mobilizado (PRASAD, 2008).

A homeostase do zinco ocorre de acordo com a ingestão, absorção e excreção e é mediada pela MT e pelas proteínas transportadoras do mineral (DUFNER-BEATTIE et al., 2003; SEVE et al., 2004; WESSELLS et al., 2010).

A maior via de excreção de zinco é intestinal, por meio de secreções pancreáticas, descamação de células da mucosa para o lúmen e fluxo transepitelial de zinco na serosa intestinal. A excreção urinária é pequena e depende da ingestão deste mineral. Com consumo adequado de zinco, entre 7 e 15 mg/dia, a excreção total é de 3 a 4,6 mg/dia, podendo aumentar com uma maior ingestão (ZHENG et al., 2010).

Em 2011, o Institute of Medicine atualizou as DRI (Dietary References Intake) que estabeleceu a RDA (Recommended Dietary Allowance) para zinco de 8 mg/dia para mulheres e 11 mg/dia para homens.

Boas fontes alimentares de zinco são frutos do mar como ostras e camarão, carne bovina, frango, peixe, fígado, leite e queijos, gérmen de trigo, grãos integrais, castanhas, legumes e tubérculos (PEDROSA; COZZOLINO, 2001; BUENO; CZEPIELEWSKI, 2007).

A avaliação do estado nutricional relativo ao zinco é realizada por meio de vários marcadores bioquímicos. A concentração plasmática de zinco é bastante utilizada e reflete variações recentes deste mineral no organismo. Já a concentração eritrocitária, reflete alterações a médio e longo prazo, pois a meia vida dos eritrócitos é mais longa (HAMBIDGE, 2003; SEKLER et al., 2007).

A determinação de zinco na urina é também um parâmetro de avaliação deste mineral, além de sua determinação nas unhas e cabelos (LOWE; FEKETE; DECSI, 2009). Outros estudos apontam que as concentrações de zinco nos leucócitos, linfócitos e neutrófilos são importantes parâmetros bioquímicos por conterem grande quantidade deste mineral (HAMBIDGE, 2003; AYDEMIR et al., 2006).

A avaliação da atividade de metaloenzimas ligadas ao zinco também tem se mostrado como biomarcador do estado do mineral. Nesse sentido, a MT tem sido bastante utilizada, pois, suas concentrações séricas são marcadamente reduzidas em situações de restrição dietética de zinco e elevadas após a suplementação com o mineral (ANDREE et al., 2006).

Estudos que investigam o Ácido Ribonucléico mensageiro (RNAm) das proteínas transportadoras de zinco (ZnT e Zip) também vem se destacando nas investigações do estado nutricional relativo a este oligoelemento, como parâmetros

para avaliação da compartimentalização do zinco em situações de estresse e inflamação (EIDE, 2006; ROCHA, 2011).

## *2.2. Expressão gênica de metaloproteínas*

Com a clonagem de genes envolvidos no transporte de zinco foram identificadas duas famílias de genes de proteínas que participam do transporte desse mineral: SLC30A, conhecidas como transportadoras ZnT; e SLC39A, como transportadoras Zip. O gene para a transportadora ZnT-1 foi o primeiro a ser clonado e sua expressão é maior no duodeno e jejuno (PALMITER; FINDLEY, 1995). Esta proteína transportadora é encontrada em todos os tecidos, sendo que nos eritrócitos e nas células tubulares renais localiza-se, predominantemente, na membrana basolateral (EIDE, 2006; SEKLER et al., 2007).

A ZnT-2 está presente no intestino, rins, testículos, pâncreas e no interior de vesículas intracelulares, reduzindo a concentração de zinco no citoplasma, o que confere proteção celular contra toxicidade. A ZnT-3 está presente em elevadas concentrações no cérebro e nas vesículas sinápticas ricas em zinco. A ZnT-4 é encontrada também no cérebro e nas glândulas mamárias. Já as proteínas transportadoras ZnT-6 e ZnT-7 estão localizadas nas células do intestino delgado (SEVE et al., 2004; EIDE, 2006; SEKLER et al., 2007). A ZnT-5 e a ZnT-8 são expressas abundantemente nas células  $\beta$  pancreáticas. E a ZnT-9 não demonstrou papel estabelecido no transporte de zinco, não havendo evidências de que esta seja regulada por nutrientes (CHIMIENTI et al., 2006; SMIDT et al., 2007; OVERBECK et al., 2008).

Com relação às Zip, foi estabelecido que a Zip-1 é expressa na maioria dos tecidos humanos, sendo predominante no intestino delgado e no pâncreas, enquanto a Zip-2 é expressa em poucos tecidos e a Zip-3 apresenta uma elevada expressão na medula óssea e no baço e reduzida no intestino delgado e fígado (LIUZZI et al., 2004; LIUZZI; COUSINS, 2004).

A Zip-4 está localizada nas células intestinais e nos rins, sendo que qualquer alteração na síntese desta transportadora pode comprometer a absorção do mineral proveniente da dieta, favorecendo a sua deficiência sistêmica. A baixa ingestão de zinco leva ao aumento da expressão do RNAm da Zip-4, pois, nesta situação, essa

proteína transportadora localiza-se na porção apical dos enterócitos, contudo, em dietas ricas neste mineral, ocorre uma endocitose da Zip-4 (WEAVER et al., 2007). A Zip-5 é expressa na porção basolateral dos enterócitos e células acinares. Estudo de Dufner-Beattie et al., (2003) em ratos, mostrou que, na deficiência de zinco, as transportadoras Zip-5 migravam da superfície dos enterócitos para o seu interior, tendo a função oposta a da Zip-4 na homeostase do zinco. Assim, na deficiência de zinco, ocorre maior expressão da Zip-4, para que aumente a captação de zinco do lúmen. Ao contrário, a suplementação com o mineral eleva a expressão da Zip-5, para que ocorra captação de zinco do sangue para o interior dos enterócitos e ácidos, excretando-o.

Os genes das Zip-6 e Zip-7 apresentam elevada expressão nas células pancreáticas (LIUZZI et al., 2004). E o papel da Zip-11 na homeostase do zinco ainda é pouco conhecido. No seu estudo, Martin et al., (2013) investigaram a expressão da transportadora Zip-11 no trato gastrointestinal de ratos e concluíram que na deficiência de zinco há maior expressão dessa proteína no cólon, demonstrando sua atuação na homeostase do mineral. Por fim, a Zip-14 está localizada principalmente na membrana plasmática dos hepatócitos e tem maior expressão durante processo inflamatório crônico, o que favorece a manifestação da hipozincemia nos tecidos periféricos (LIUZZI et al., 2004).

Ao ligar-se ao Fator de Transcrição Metal Responsivo-1 (FTMR-1), o zinco se torna capaz de controlar a expressão gênica destas proteínas transportadoras. Quando acontece essa ligação, o zinco torna-se capaz de se ligar ao Ácido Desoxirribonucléico (DNA), adquire conformação DNA-ligante e desloca-se para o núcleo da célula, onde se liga a elementos metal-responsivos, em locais de leitura dos genes, aumentando a transcrição destes genes (SMIRNOVA et al., 2000).

A expressão gênica das metalotioneínas também vem sendo bastante estudada e revela alterações de acordo com a concentração plasmática de zinco (MARET, 2000; TAPIERO; TEW, 2003; LAHIRI; ABRAHAM, 2014). A MT-1 e MT-2 são isoformas expressas em variados tipos celulares e são responsáveis pela manutenção da homeostase do zinco (HAQ, MAHONEY; KOROPATNICK, 2003). As isoformas MT-3 e MT-4 tem expressão limitada, sendo mais observada nos neurônios e tecido epitelial escamoso, respectivamente (CARPENE; ANDREANI; ISANI, 2007). Vale mencionar que, em humanos, a MT-1 é codificada por 13 genes, 8 funcionais (MT1A, MT1B, MT1E, MT1F, MT1G, MT1H, MT1M e MT1X) e 5 inativos

(MT1LP, MT1JP, MT1DP, MT1CP, MT1IP). As outras isoformas tem apenas um gene codificante ativo (MOLEIRINHO et al., 2011).

A MT controla a distribuição de zinco do plasma para o fígado, e sua expressão gênica é modulada pelo consumo alimentar de zinco. Quando há aumento na ingestão, ocorre indução da síntese de tioneína, por meio de sua ação sobre fatores de transcrição zinco-dependentes, formando a MT que ligada ao zinco, armazena este mineral no fígado. Por outro lado, em situações de baixa disponibilidade, o zinco é liberado da MT, sendo então incorporado a outras proteínas (DUFNER-BEATTIE et al., 2003; SEVE et al., 2004; WESSELLS et al., 2010).

### 2.3. RCU, inflamação e zinco

No que diz respeito à fisiopatologia da RCU, observa-se que o reto sempre é afetado por uma inflamação que pode estender-se até o ceco em um padrão contínuo. Essa inflamação ocorre devido à resposta imunológica exacerbada na mucosa intestinal em conjunto com fatores ambientais e genéticos que levam à disfunção na regulação da barreira fazendo com que ocorra aumento da permeabilidade da mucosa intestinal deixando-a mais susceptível à infiltração de antígenos (PODOLSKY, 2002).

Na RCU ocorre também perda da tolerância da microbiota intestinal pela mucosa. Assim, as bactérias da microbiota se ligam a receptores do tipo *Toll like* (TLR) presentes na mucosa intestinal emitindo estímulos quimiotáticos que resultam em infiltração de neutrófilos e macrófagos na mucosa com ativação de uma cascata de reações imunoinflamatórias no intestino. Uma vez ativados, os macrófagos e neutrófilos aumentam a transcrição de citocinas pró-inflamatórias como o *Fator de Necrose Tumoral alfa* (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina-6 (IL-6), e produzem espécies reativas de oxigênio (EROs), gerando danos aos tecidos e culminando no estresse oxidativo. Vale ressaltar que esse dano celular também desencadeia reações imunológicas fazendo com que a inflamação se agrave e se torne crônica (DAVE et al., 2014; ORDÁS et al., 2012).

Sendo assim, a inflamação da RCU é um processo que ocorre em resposta a diversos agentes lesivos, como por exemplo, eventos de natureza autoimune e perda da permeabilidade da barreira intestinal. E é caracterizada por alterações na

microcirculação, tais como os fenômenos angiogênicos, liberação de moléculas solúveis, acúmulo de leucócitos *polimorfonucleares* (PMN), seguido pelos monócitos, que se diferenciam localmente em macrófagos (NATHAN et al., 2002; NORLING; SERHAN, 2010).

Entre as citocinas com atividade anti-inflamatória, destaca-se a IL-10, que possui também atividade imunossupressora. A mucosa de pacientes com DII expressa de forma elevada a IL-10 (AUTSCHBACH et al., 1998). Essa citocina é a principal contra reguladora da resposta imunológica inata, pois atua como anti-inflamatória agindo por “feedback” negativo, ou seja, inibindo a síntese de citocinas pró inflamatórias. Elevadas concentrações de IL-10 reduzem a produção de TNF- $\alpha$ ; IL-6 e IL-8 pelos monócitos. A supressão de IL-10 resulta em aumento dos níveis séricos circulantes de TNF- $\alpha$  e IL-6, o que sugere que esta citocina possua grande poder anti-inflamatório (ZEITOUN et al., 2010; FEDORAK et al., 2000).

Elevadas concentrações de mediadores pró-inflamatórios e EROs parecem aumentar a expressão de metalotioneínas, pois TNF- $\alpha$  e IL-6 estão relacionados a uma nova síntese de MT no fígado, o que vai afetar diretamente as concentrações plasmáticas de zinco. Ao mesmo tempo, essas citocinas pró-inflamatórias elevam a expressão da Zip 14, que, por sua vez, aumenta o transporte de zinco para as células do fígado, onde é armazenado na forma de MT (ANDREWS, 2000; OVERBECK et al., 2008).

Nesse sentido, Vasto et al., (2006) confirmou que a elevação sérica de citocinas pró inflamatórias provoca variações na concentração plasmática de zinco. E Liuzzi et al., (2005), mostraram que a interleucina-6 está relacionada à maior expressão da metalotioneína e da Zip-14, na deficiência de zinco.

Mocchegiani et al., (2006) sugerem que quando há doença crônica, o zinco tende a se manter ligado a MT, sendo frequentemente sequestrado por esta e dificilmente desligado da mesma para ser transferido para outras proteínas, caracterizando uma compartimentalização do zinco no meio intracelular. Da mesma forma, quando o processo inflamatório é reduzido, observa-se uma menor expressão da MT associada à maior disponibilidade do zinco e melhora da resposta imunológica (MOCCHEGIANI, 2002).

Bao et al., (2003) indicam o uso do zinco como terapia associada no tratamento de doenças crônicas e inflamatórias após concluir que a suplementação com este mineral é capaz de reduzir TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-8. Outros estudos, em

humanos saudáveis, demonstraram que a suplementação com zinco modifica a expressão dos transportadores de zinco e da MT em células brancas do sangue, enfatizando a importância desse micronutriente na transcrição gênica e metabolismo celular (AYDEMIR et al., 2006; ANDREE et al., 2006).

Pesquisas que associam a inflamação crônica da obesidade com marcadores inflamatórios e transportadoras de zinco, demonstram que ZnT-4, Zip-1 e Zip-6 nos leucócitos foram inversamente correlacionadas à proteína C reativa (PCR) e ZnT-4 e ZnT-5 estavam inversamente correlacionados ao TNF- $\alpha$  (NOH et al., 2014). A suplementação com 30 mg de gluconato de zinco/dia durante 8 semanas elevou a expressão de ZnT-1 e ZnT-5 nos leucócitos de obesos (NOH et al., 2014a). Assim, sugere-se que a inflamação e a ingestão de zinco alteram a homeostase do mineral.

Considerando os aspectos clínicos da RCU e a participação do zinco no contexto da inflamação na gravidade e evolução da doença, julga-se importante a realização desse estudo na perspectiva da identificação de intervenções nutricionais que melhorem o monitoramento da RCU.

### 3. OBJETIVOS

*Geral:*

Avaliar o efeito da suplementação com zinco na expressão gênica de metaloproteínas e na resposta inflamatória em pacientes com retocolite ulcerativa.

*Específicos:*

- Analisar o consumo alimentar de macronutrientes e zinco, e sua adequação nutricional;
- Determinar as concentrações plasmáticas e eritrocitárias de zinco, antes e após a suplementação com este mineral;
- Analisar a expressão dos genes codificadores da proteína transportadora de zinco: Zip-14, e da metalotioneína 1G (MT1G), antes e após a suplementação com zinco;
- Quantificar as concentrações séricas de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 nos pacientes, antes e após a suplementação com zinco;
- Analisar a relação entre a resposta inflamatória e a expressão dos genes da Zip14 e da MT1G, mediante a suplementação com zinco na RCU.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. *Protocolo Experimental*

O estudo de intervenção, cego, envolveu 41 pacientes diagnosticados com RCU em remissão e atividade da doença, de ambos os sexos, e faixa etária entre 20 e 69 anos, que fazem parte da Associação dos Portadores da Doença de Crohn do Norte e Nordeste do Brasil (ACROHNN) e são assistidos no Hospital Universitário (HU) da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

Foram incluídos na pesquisa pacientes com RCU, adultos, de ambos os sexos que não faziam uso de suplemento vitamínico-mineral e/ou medicamentos que pudessem interferir no metabolismo do zinco; que não possuíam doenças coexistentes como diabetes, obesidade, hipercolesterolemia, hipertensão e doença renal; não etilistas e não tabagistas atuais; e, concordaram em participar e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO A), conforme prevê a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

O projeto foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPI (CEP/UFPI) sob o número CAAE 32479814.2.0000.5214 (ANEXO B) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da UFPI sob o número 41/15 (ANEXO C)

O fluxograma de arrolamento dos pacientes é demonstrado na FIGURA 1. Todos os pacientes foram avaliados no tempo inicial do estudo, antes da suplementação (T0) com preenchimento de ficha de acompanhamento individual (APÊNDICE A) e reavaliados no tempo final do estudo, após a suplementação (T1) em relação aos parâmetros bioquímicos e moleculares estudados.

Com base nas concentrações de zinco (Zn) plasmático no T0, os pacientes foram alocados em dois grupos: suplementado (pacientes com Zn plasmático < 70  $\mu\text{Zn/dL}$ ) (GIBSON, 2005), suplementados com 35mg de gluconato de Zn por 30 dias e placebo (pacientes com Zn plasmático > 70  $\mu\text{Zn/dL}$ ), que receberam cápsula de amido de milho por igual período.

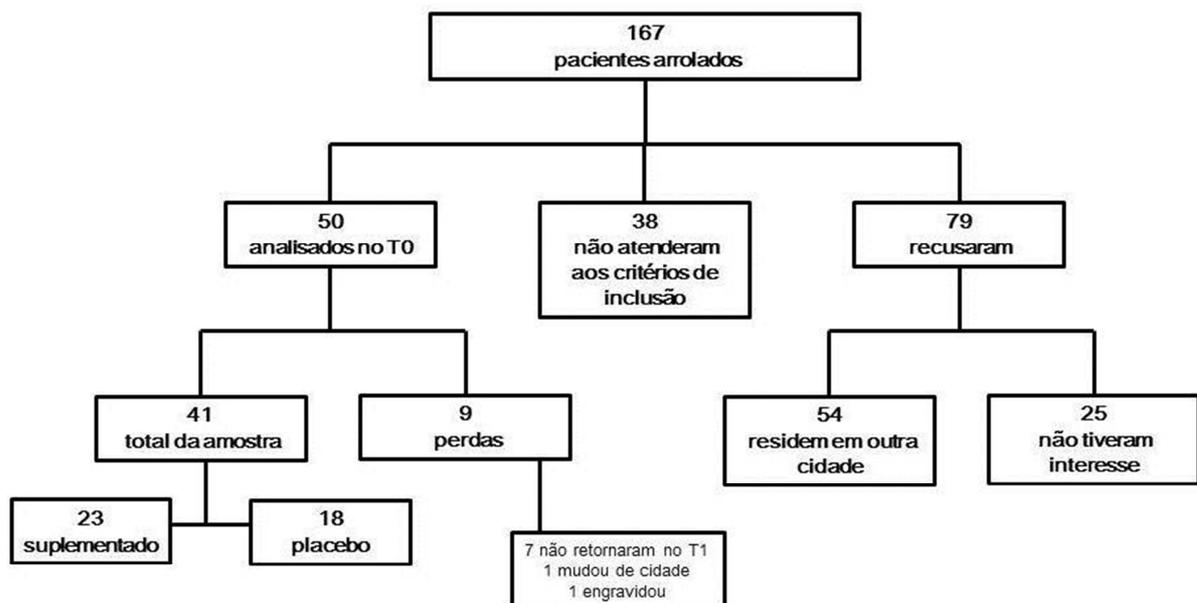
### 4.2. *Avaliação do Consumo Alimentar*

Foi aplicado o Registro Alimentar de 3 dias (APÊNDICE B), a fim de se conhecer o consumo alimentar habitual dos pacientes. Os pacientes foram orientados a preencher o registro em dias alternados, sendo dois dias durante a semana e um dia no final de semana.

As concentrações de macro e micronutrientes foram calculadas com uso do software Nutwin versão 1.5.2.51 do Departamento de Informática da Escola Paulista de Medicina/ UNIFESP, tendo os alimentos consumidos sido acrescentados no banco de dados deste software segundo a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) (NEPA/UNICAMP, 2011).

Os cálculos dos percentuais de adequação do consumo alimentar foram feitos com base nos valores de recomendação das DRI (INSTITUTE OF MEDICINE, 2011) e seguiram a metodologia de Soares; Penha e Moura (2013), de forma que a adequação do consumo calórico foi calculada com base na estimativa de energia requerida (Estimated Energy Requirements - EER) de cada grupo estudado, considerando sexo, idade, peso, altura e nível de atividade física.

FIGURA 1 - Fluxograma de arrolamento dos pacientes com RCU, atendidos no Hospital Universitário da UFPI.



A adequação do consumo de macronutrientes foi feita mediante comparação dos dados médios de ingestão com os valores de distribuição aceitável para macronutrientes (Acceptable Macronutrient Distribution Range - AMDR), cujos valores são: 10 - 35% para proteínas, 45 - 65% para carboidratos e 20 - 35% de lipídios (INSTITUTE OF MEDICINE, 2011).

Por fim, a adequação do consumo de Zn foi calculada pelo método probabilístico, que leva em consideração a necessidade média estimada (Estimated Average Requirement - EAR) de acordo com o sexo de cada indivíduo e variação intrapessoal da ingestão.

### *4.3. Determinação dos Parâmetros Bioquímicos e Moleculares*

#### *4.3.1. Controle de contaminação e preparo de reagentes*

A vidraria e o material de polipropileno utilizado na coleta e análise do Zn foram todos desmineralizados antes do uso, em banho de solução de ácido nítrico a 30%, por no mínimo 12 horas. Posteriormente foram enxaguados em água deionizada, no mínimo 10 vezes, secos em estufa e mantidos em recipientes hermeticamente fechados, até o momento da utilização, com o objetivo de minimizar a contaminação por minerais (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Todos os reagentes foram preparados e diluídos em água ultrapura.

#### *4.3.2. Coleta e separação dos componentes do sangue*

Foram coletadas amostras de 20 mL de sangue venoso de cada paciente, no período da manhã, de 7:30 às 9:30 horas, estando o participante em jejum de no mínimo 12 horas, e utilizando-se seringas plásticas descartáveis e agulha de aço inoxidável estéreis. O sangue coletado foi distribuído em 3 tubos distintos: 8 mL em um tubo de vidro contendo citrato de sódio a 30%, como anticoagulante (10 µL de citrato de sódio/mL de sangue) para a análise de Zn; 4 mL em um tubo de plástico sem anticoagulante para determinação sérica das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10; e 8 mL distribuídos em um tubo de vidro contendo solução ACD (Ácido Cítrico; Citrato e Dextrose) para determinação da expressão gênica de MT1G e Zip-14.

Para análise do Zn, o plasma foi separado do sangue total por centrifugação a 1831x g, durante 15 minutos, em centrífuga da marca SIGMA 4K15. Em seguida, o plasma foi extraído com pipeta automática e acondicionado em microtubos de polipropileno, sendo posteriormente conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até o momento da análise.

A preparação dos eritrócitos para a determinação do mineral foi realizada segundo o método proposto por Whitehouse et al., (1982). O sedimento do sangue total foi lavado com 5 mL de solução salina isotônica, a 0,9%, cuidadosamente homogeneizado por inversão e centrifugado a 2493x g durante 10 minutos. Ao final, o sobrenadante foi descartado. Este procedimento foi repetido 3 vezes, para remover outros tipos celulares do eritrócito (plaquetas e leucócitos). Após a última centrifugação, a solução salina aspirada foi descartada, e a massa eritrocitária extraída, com o auxílio de uma pipeta automática, e então transferida para microtubos que foram mantidos à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise de Zn e hemoglobina.

#### 4.3.3. Determinação de zinco plasmático e eritrocitário

A determinação de Zn plasmático e eritrocitário foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica de chama, utilizando o equipamento FAAS 240FS, Varian, calibrado nas seguintes condições de trabalho: comprimento de onda ( $\lambda$ ) 213,9 nm, fenda espectral 0,7 nm, chama oxidante com mistura de acetileno, ar, e leituras com tempo de integração de 3 segundos. Como padrão de Zn foi utilizado o Tritizol® (MERCK), com os pontos da curva preparados com água ultrapura, 1% de ácido nítrico e seguindo as concentrações de 0,00 (branco); 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,75; 1,0 e 1,5  $\mu\text{gZn/mL}$ .

O preparo e diluição das amostras foi realizado segundo o método proposto por Massocatto et al., (2013); Menezes (2010); e Sisti (2001), que inclui uma prévia digestão da amostra em forno microondas da marca Anton Paar, modelo Multiwave 3000, nas condições descritas na TABELA 1. Esta digestão tem por finalidade reduzir a viscosidade da amostra pela decomposição de resíduos orgânicos, deixando-a com viscosidade semelhante à da solução padrão e evitando depreciação do espectrofotômetro de absorção atômica. As amostras foram diluídas

nas proporções de 1:5 (análise do Zn plasmático) e de 1:10 (análise do Zn eritrocitário), em água ultrapura, 40% de ácido nítrico e 10% de peróxido.

Após a digestão, as amostras foram diretamente aspiradas pelo espectrofotômetro de absorção atômica e lidas em triplicata. Os resultados foram calculados a partir das absorbâncias médias obtidas e expressos em  $\mu\text{gZn/dL}$ . A classificação do estado nutricional relativo ao Zn no plasma e nos eritrócitos foi realizada utilizando como referência os respectivos valores: 70-110  $\mu\text{gZn/dL}$  (GIBSON, 2005), e 40-44  $\mu\text{gZn/gHb}$  (GUTHRIE; PICCIANO, 1994).

TABELA 1 – Condições de trabalho de forno microondas para digestão de amostras sanguíneas.

Temperatura	Rampa	Aquecimento	Ventilação
80°C	7 minutos	5 minutos	1
120°C	8 minutos	5 minutos	1
180°C	7 minutos	15 minutos	1
0°C	-	20 minutos	3

Para expressar os resultados de Zn eritrocitário na unidade zinco/massa de hemoglobina, foram preparadas amostras para análise da concentração de hemoglobina, pelo método da cianometahemoglobina (VAN ASSENDELFT, 1972). Foi preparado o lisado 1 com diluição dos eritrócitos em água ultrapura na proporção de 1:5. Uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  do lisado 1 dos eritrócitos foi diluída em 5 mL de solução de Drabkin. Para leitura da hemoglobina foi utilizado espectrofotômetro UV visível da marca BELPHOTONICS, modelo SP 1102, em comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 540 nm.

#### 4.3.4. Determinação de citocinas séricas

Para determinação dos níveis séricos do TNF- $\alpha$ , da IL-6, e da IL-10, o sangue sem anticoagulante, foi centrifugado a 1831x g durante 15 minutos em centrífuga da marca SIGMA 4K15. Em seguida, o soro foi devidamente aspirado e armazenado em microtubos a -35°C até análise. Foi adotada a técnica de citometria de fluxo com a utilização de kit comercial BD<sup>TM</sup> Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 da

BD Bioscience seguindo as instruções do fabricante. Sendo cada tubo preparado com 25 µL da amostra, 25 µL da mistura de beads e 25 µL do reagente de detecção Th1/Th2 PE. O mesmo procedimento foi utilizado para preparação da curva padrão. Em uma mesma amostra, três populações de beads com distintas intensidades de fluorescência foram conjugadas com um anticorpo de captura específico para cada citocina, formando o CBA, em seguida, foram lidas no citômetro de fluxo FACSCantoll.

#### 4.3.5. Determinação da expressão gênica da MT e da ZIP 14

Para as análises moleculares, as amostras de sangue coletadas foram centrifugadas a 1831x g durante 30 minutos em centrífuga da marca SIGMA 4K15, para separação da fase fluida do sangue e retirada de células leucomonocíticas, que constituem o buffy coat. Este, foi armazenado em microtubos estéreis livres de RNase em freezer -80°C. Em seguida, realizou-se a extração de RNA pelo método TRIzol<sup>®</sup> Reagent, de acordo com instruções do fabricante (Invitrogen). Sendo utilizado 400 µL de amostra, 800 µL de trizol para dissociação do complexo de nucleoproteínas, 160 µL de clorofórmio para separação em fases, 400 µL de isopropanol para precipitação do RNA e 800 µL de etanol a 75% para lavagem do pellet. Em seguida, o RNA foi ressuspense em 50 µL de água DEPC (água bidestilada, tratada com 0,1% de dietilpirocarbonato) (Invitrogen).

A pureza e a concentração do RNA extraído foram verificadas a partir de uma alíquota de 2 µL de cada amostra, que foi transferida para nanoespectrofotômetro (NanoDropTechnology Inc., Wilmington, USA), para leitura das absorbâncias nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. O padrão gráfico e o valor da razão das densidades ópticas entre os comprimentos de onda 260 e 280nm, foram consideradas ideais quando a razão das absorbâncias apresentou-se entre 1,8 e 2,1 determinando a pureza das amostras. Posteriormente, as amostras de RNA foram normalizadas para que todas ficassem na concentração de 100 ng/µL.

O RNA extraído das amostras foi, então, submetido a tratamento para digestão de DNA com DNase Deoxyribonuclease I, Amplification Grade, de acordo com instruções do fabricante (Invitrogen), sendo utilizado 200 ng de RNA (2 µL), 2 µL de 10x DNase I Reaction Buffer, 2 µL de DNase I, Amp Grade, 1 U/µL, água DEPC

suficiente para completar o volume final de 20  $\mu\text{L}$ , e por fim, foi adicionado 2  $\mu\text{L}$  de 25 mM EDTA.

A síntese de cDNA (DNA complementar) a partir de RNA tratado, foi realizada utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription, de acordo com instruções do fabricante (Applied Biosystems), cujo “mix” para a reação continha 10  $\mu\text{L}$  de RNA tratado, 2  $\mu\text{L}$  de 10x Reverse Transcriptase Buffer, 0,8  $\mu\text{L}$  de 25x dNTP Mix (100mM), 2  $\mu\text{L}$  de 10x Reverse Transcriptase Random Primers, 1  $\mu\text{L}$  de RNase Inhibitor, 1  $\mu\text{L}$  de MultiScribe™ Reverse Transcriptase e água DEPC para o volume final de 20  $\mu\text{L}$ . Por fim, a pureza e concentração de cDNA foram também verificadas em nanoespectrofotômetro e todas as amostras foram normalizadas para a concentração de 1000 ng/ $\mu\text{L}$  e estocadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento de sua utilização.

Para amplificação pela reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (qrt-PCR) foram utilizados os iniciadores (PRIMERS) específicos para cada gene de interesse (TABELA 2), e como genes de referência, utilizou-se o (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) GAPDH e a  $\beta$ -actina.

TABELA 2 – Números de acesso no GenBank e sequências de bases nitrogenadas de primers.

Gene/ Número de acesso	Sequência de primer
<b>MT1G<sup>c</sup></b> <b>(NM_005950.2)</b>	F <sup>a</sup> : 5' GCACCTCCTGCAAGAAGAGCT 3' R <sup>b</sup> : 5' GCAGCCCTGGGCACACTT 3'
<b>ZIP 14<sup>d</sup></b> <b>(NM_001128431.2)</b>	F <sup>a</sup> : 5' ACTTAGGGCATCGCAGATGTTT 3' R <sup>b</sup> : 5' GCAGTAACCTAGACGGGTCATTTAA 3'
<b><math>\beta</math>-actina<sup>c</sup></b> <b>(NM_001101.3)</b>	F <sup>a</sup> : 5' CCACACTGTGCCCATCTACG 3' R <sup>b</sup> : 5' AGGATCTTCATGAGGTAGTCAGTCAG 3'
<b>GAPDH<sup>e</sup></b> <b>(NM_002046.5)</b>	F <sup>a</sup> : 5' CTCTGCTCCTCCTGTTCGAC 3' R <sup>b</sup> : 5' ACGACCAAATCCGTTGACTC 3'

<sup>a</sup> primer forward <sup>b</sup> primer reverse

Fonte: <sup>c</sup>Rocha et al. (2011) <sup>d</sup>Batista (2009) <sup>e</sup>Chang et al. (2016).

As reações foram preparadas em placas de polipropileno contendo 96 poços e específicas para reação. Utilizou-se 1  $\mu\text{g}$  de cDNA, 10  $\mu\text{L}$  de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,8  $\mu\text{L}$  dos primers forward e reverse, na

concentração de 200 nM água ultrapura para um volume final de 20  $\mu$ L. Todas as reações foram realizadas em triplicata, com controle negativo da reação.

As amostras foram submetidas à seguinte termociclagem: 95<sup>o</sup>C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95<sup>o</sup>C por 15 segundos e 60<sup>o</sup>C por 1 minuto, em equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (applied Biosystems). Ao final, foram considerados válidos apenas os resultados cuja reação apresentou curva de dissociação com apenas um pico, referente à temperatura de melting do primer utilizado em cada reação.

Optou-se por utilizar a  $\beta$ -actina como gene de referência, por mostrar maior estabilidade na expressão em relação ao GAPDH, conforme cálculo no software GENORM (<https://genorm.cmgg.be/>). Assim, a medida da expressão do RNAm da MT1G e da ZIP 14 foram obtidas em relação ao gene de referência  $\beta$ -actina, pela diferença entre o Ct do gene alvo e o Ct do gene constitutivo:  $\Delta$ Ct = (Ct gene alvo – Ct gene endógeno). Por fim, os dados de  $\Delta$ Ct foram transformados em escala logarítmica ( $2^{-\Delta$ Ct}) para posterior cálculos estatísticos.

#### *4.4. Análises Estatísticas*

Na análise estatística, os resultados foram demonstrados como média e desvio padrão. Para comparação entre os grupos suplementado e placebo, utilizou-se o teste T de Student Independente para as variáveis paramétricas e o teste de Mann-Whitney para as não paramétricas. Para comparar os resultados encontrados no T0 com os do T1 fez-se o teste T de Student Pareado para as variáveis paramétricas e o teste de Wilcoxon para as variáveis não paramétricas. A normalidade dos parâmetros foi avaliada pelo teste Kolmogorov-smirnov. As relações entre as variáveis foram testadas usando Correlação de Spearman. Os dados foram processados em programa estatístico SPSS for Windows 10.0, adotando-se  $P < 0,05$  como nível de significância.

## 5. RESULTADOS

Foram estudados 41 pacientes com RCU, com predominância do sexo feminino (61%) e com média de idade de  $46 \pm 12$  anos. Quanto à escolaridade, 36,6% possuíam ensino médio completo. Destaca-se que 78% dos pacientes estudados não possuíam histórico familiar de DII, demonstrando que essa doença tem etiologia multifatorial, podendo o fator genético influenciar ou não no seu aparecimento (TABELA 3).

TABELA 3 – Características gerais dos pacientes com RCU, assistidos no Hospital Universitário da UFPI.

Características	n	%
<b>Sexo</b>		
Masculino	16	<b>39,0</b>
Feminino	25	<b>61,0</b>
<b>Escolaridade</b>		
Fundamental Incompleto	10	<b>24,4</b>
Fundamental Completo	7	<b>17,1</b>
Médio Incompleto	4	<b>9,8</b>
Médio Completo	15	<b>36,6</b>
Superior Incompleto	2	<b>4,9</b>
Superior Completo	2	<b>4,9</b>
Pós Graduação	1	<b>2,4</b>
<b>Histórico de DII na família</b>		
Sim	9	<b>22</b>
Não	32	<b>78</b>

Do total de indivíduos estudados, 56,1% (n=23) apresentaram Zn plasmático abaixo do valor de referência ( $<70 \mu\text{gZn/dL}$ ) no T0, sendo alocados no grupo suplementado (35 mg de gluconato de zinco/dia). O grupo placebo (Zn plasmático  $>70 \mu\text{gZn/dL}$ ) constituiu 43,9% (n=18) da amostra total, que receberam (35 mg de amido de milho/dia).

Caracterizando os pacientes segundo o tipo de intervenção, observou-se para o grupo suplementado média de idade de  $47 \pm 12$  anos, com predominância do sexo

feminino (69,6%), ensino médio completo (39,1%), e 87% dos pacientes não tinha histórico familiar para DII.

O grupo placebo tinha média de idade de  $45 \pm 12$  anos, igual distribuição para o sexo e escolaridade (fundamental completo - 33,3%; médio completo - 33,3%), e maior prevalência de pacientes sem história familiar para DII (66,7%). A TABELA 4 demonstra as características dos pacientes segundo o tipo de intervenção.

TABELA 4 – Características gerais dos pacientes com RCU, segundo o tipo de intervenção.

Características	Grupos			
	Suplementado		Placebo	
	n	%	n	%
Sexo				
<b>Masculino</b>	7	30,4	9	50
<b>Feminino</b>	16	69,6	9	50
Escolaridade				
<b>Fundamental Incompleto</b>	7	30,4	3	16,7
<b>Fundamental Completo</b>	1	4,3	6	33,3
<b>Médio Incompleto</b>	4	17,4	0	00,0
<b>Médio Completo</b>	9	39,1	6	33,3
<b>Superior Incompleto</b>	1	4,3	1	5,6
<b>Superior Completo</b>	1	4,3	1	5,6
<b>Pós Graduação</b>	0	0	1	5,6
Histórico de DII na família				
<b>Sim</b>	3	13,1	6	33,3
<b>Não</b>	20	86,9	12	66,7

Os resultados da análise do consumo alimentar habitual dos pacientes estão apresentados na TABELA 5.

Com base nas recomendações nutricionais e nos percentuais de adequação de calorias, macronutrientes e Zn, a dieta habitual estava adequada quanto ao aporte de proteínas, carboidratos e lipídios e abaixo do recomendado para ingestão de calorias e de Zn, em ambos os grupos estudados.

TABELA 5 – Valores médios e desvios padrão do consumo alimentar; e percentuais de adequação do consumo de calorias, macronutrientes e zinco, segundo as recomendações nutricionais.

Consumo Alimentar	Adequação			
	Suplementado N=22 <sup>a</sup>		Placebo N=18	
	Média ± DP	%	Média ± DP	%
Energia (kcal/dia)	1521 ± 439	76,9 <sup>b</sup>	1838 ± 431	84,2 <sup>b</sup>
Proteínas (g)	78 ± 25	20,7 <sup>c</sup>	97 ± 26	21,2 <sup>c</sup>
Carboidratos (g)	203 ± 65	53,2 <sup>c</sup>	233 ± 82	50,1 <sup>c</sup>
Lipídios (g)	44 ± 18	25,8 <sup>c</sup>	60 ± 19	29,7 <sup>c</sup>
Zinco (mg)	9 ± 3	64,8 <sup>d*</sup>	14 ± 6	87,0 <sup>d*</sup>

Valores de referência: calorias 100%; proteínas 10 - 35%; carboidratos 45 - 65%; lipídios 20 - 35%; zinco 100% <sup>a</sup> 1 paciente não preencheu o registro alimentar <sup>b</sup> Percentual de adequação média <sup>c</sup> Percentual de distribuição em relação ao aporte calórico <sup>d</sup> Percentual de probabilidade de adequação média \* Teste T de Student Independente (p<0,05)

Ainda com relação ao Zn, os pacientes do grupo suplementado tiveram percentual de probabilidade de adequação da ingestão de Zn significativamente menor (p= 0,032) do que os pacientes do grupo placebo.

Na TABELA 6 encontram-se demonstrados os valores médios e desvios padrão das concentrações de Zn plasmático e eritrocitário, segundo os grupos estudados, nos tempos T0 e T1. Os resultados revelam que no T0 houve diferença significativa (p<0,01) nas concentrações plasmáticas e eritrocitárias de Zn no grupo suplementado, em relação ao grupo placebo.

Analisando o efeito da suplementação com Zn, o estudo revelou que a intervenção foi eficaz, com aumento significativo nos parâmetros de Zn plasmático (p<0,01) e eritrocitário (p=0,04). Avaliando o grupo placebo, observou-se diminuição significativa nas concentrações de Zn plasmático (p=0,02) e eritrocitário (p<0,01) do T0 para o T1.

Apesar do aumento significativo nas concentrações de Zn plasmático, o estudo mostrou que 48% dos pacientes não alcançaram o limite inferior de normalidade para esse parâmetro. Da mesma forma, o aumento nas concentrações

eritrocitárias de Zn, após a suplementação não atingiu o valor mínimo de referência para 83% dos pacientes (FIGURA 2).

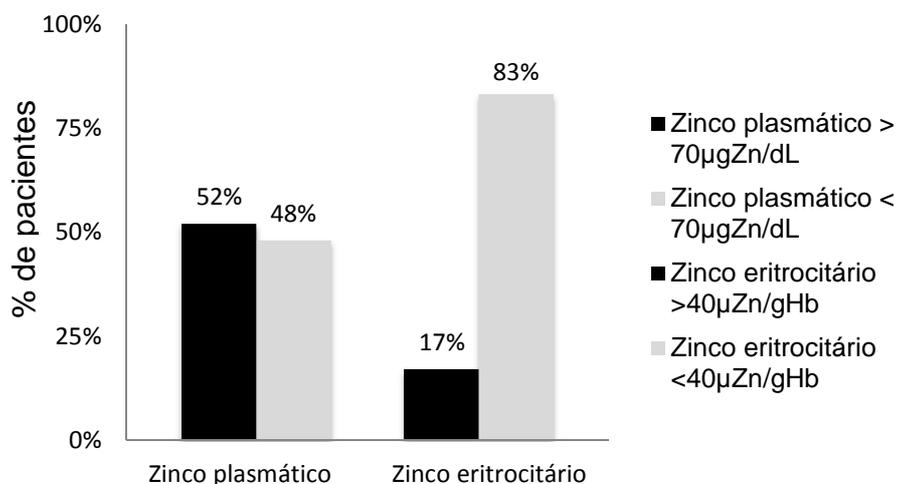
TABELA 6 – Valores médios e desvios padrão das concentrações plasmática e eritrocitária de zinco dos pacientes com RCU nos diferentes grupos e tempos estudados.

Biomarcadores	Média ± DP		p <sup>a</sup>
	T0	T1	
<b>Zinco Plasmático (µgZn/dL)</b>			
Suplementado (N=23)	53,2 ± 11	74,8 ± 21	<0,01
Placebo (N=18)	82,3 ± 11	71,7 ± 22	0,02
p <sup>b</sup>	<0,01 <sup>c</sup>	0,65 <sup>d</sup>	
<b>Zinco Eritrocitário (µgZn/gHb)</b>			
Suplementado (N=23)	27,8 ± 10	32,8 ± 7	0,04
Placebo (N=18)	34,9 ± 8	26,0 ± 4	<0,01
p <sup>b</sup>	<0,01 <sup>d</sup>	0,02 <sup>d</sup>	

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

<sup>a</sup> Comparação entre os tempos estudados - Teste de Wilcoxon <sup>b</sup> Comparação entre os grupos estudados <sup>c</sup> Teste T de Student Independente <sup>d</sup> Teste de Mann-Whitney

FIGURA 2 – Distribuição de pacientes do grupo suplementado, segundo a classificação do estado nutricional relativo ao zinco.



Correlacionando-se os parâmetros bioquímicos de Zn no T0 com o percentual de probabilidade de adequação da ingestão deste mineral e entre Zn plasmático e

eritrocitário, observou-se que houve correlação positiva e significativa entre essas variáveis (TABELA 7).

TABELA 7 – Correlações entre o percentual de probabilidade de adequação da ingestão de zinco e as concentrações plasmática e eritrocitária do mineral.

Correlação de Spearman	p	r
% de probabilidade de adequação de Zn x Concentração plasmática de Zn T0	<b>0,01</b>	0,405
% de probabilidade de adequação de Zn x Concentração eritrocitária de Zn T0	<b>&lt;0,01</b>	0,517
Concentração plasmática de Zn T0 x Concentração eritrocitária de Zn T0	<b>&lt;0,01</b>	0,448

A TABELA 8 mostra os valores médios e desvios padrão das concentrações séricas de citocinas, de acordo com os grupos de intervenção e tempos estudados. Os resultados revelam que, no T0, a IL-10 estava significativamente maior no grupo placebo, em relação ao grupo suplementado ( $p=0,01$ ).

Analisando o efeito da suplementação nas citocinas estudadas, nos diferentes tempos, observou-se que as variações dos valores não foram estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ).

O estudo de correlação entre o percentual de probabilidade de adequação da ingestão de Zn e parâmetros bioquímicos de Zn com as citocinas não mostrou correlações significativas.

Houve correlação positiva ( $r=0,614$ ) entre TNF- $\alpha$  e IL-10 ( $p<0,01$ ) no grupo placebo, no tempo T1, significando que, nos pacientes com valores plasmáticos de Zn adequado, os que apresentaram maiores níveis séricos de TNF- $\alpha$ , também tinham níveis séricos de IL-10 mais elevados (FIGURA 3).

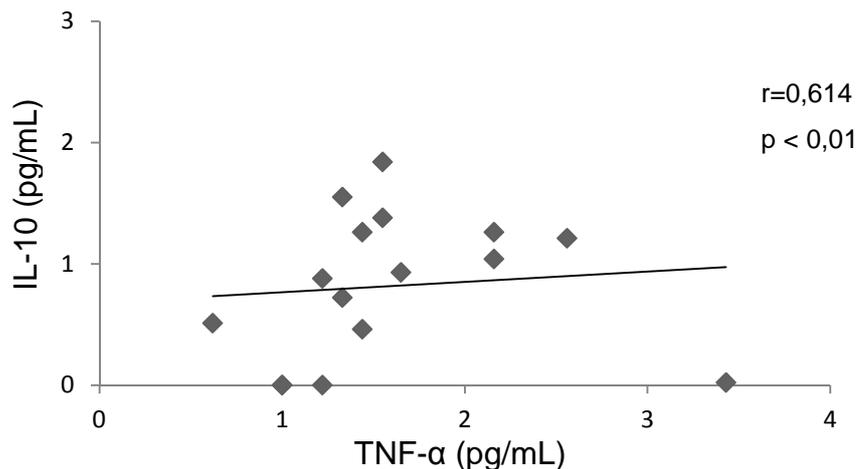
TABELA 8 – Valores médios e desvios padrão das concentrações séricas das citocinas de pacientes com RCU, segundo os grupos de intervenção e tempos estudados.

TABELA 8 – Valores médios e desvios padrão das concentrações séricas das citocinas de pacientes com RCU, segundo os grupos de intervenção e tempos estudados.

Citocinas	Média ± DP		p <sup>a</sup>
	T0	T1	
<b>IL-6 (pg/mL)</b>			
Suplementado (n=23)	4,24 ± 4,42	3,47 ± 3,73	0,74
Placebo (n=18)	4,12 ± 2,59	3,46 ± 2,89	0,16
p <sup>b</sup>	0,36	0,52	
<b>IL-10 (pg/mL)</b>			
Suplementado (n=23)	2,21 ± 2,25	1,92 ± 4,15	0,08
Placebo (n=18)	6,77 ± 21,64	6,00 ± 19,33	0,91
p <sup>b</sup>	0,01	0,85	
<b>TNF-α (pg/mL)</b>			
Suplementado (n=23)	4,04 ± 4,96	4,16 ± 7,21	0,54
Placebo (n=18)	1,74 ± 1,72	2,56 ± 3,51	0,65
p <sup>b</sup>	0,14	0,22	

<sup>a</sup> Comparação entre os tempos estudados - Teste de Wilcoxon <sup>b</sup> Comparação entre os grupos estudados - Teste de Mann-Whitney

FIGURA 3 – Correlação entre TNF-α e IL-10 em pacientes com RCU do grupo placebo no T1.



Conforme demonstrado na TABELA 9, o resultado da expressão gênica da MT1G e da ZIP 14 revela que, no T0, não houve diferença significativa entre os grupos estudados. Após a suplementação, no T1, houve diminuição significativa da expressão do RNAm da MT1G ( $p=0,04$ ) e da ZIP 14 ( $p=0,04$ ).

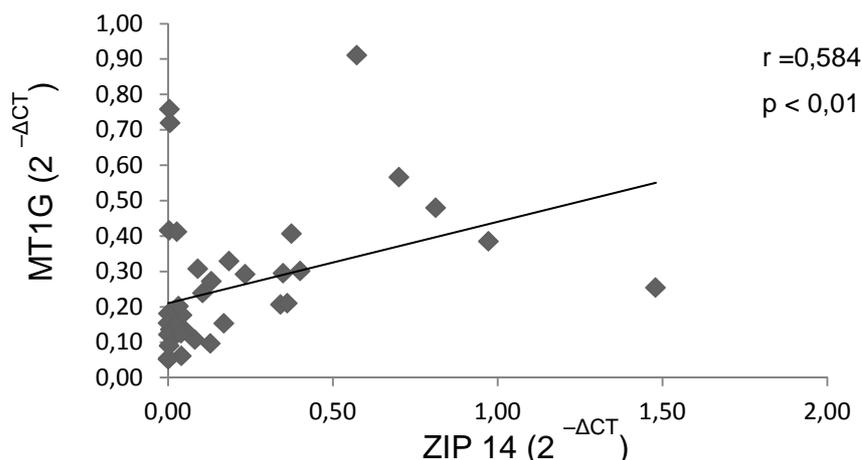
TABELA 9 – Valores médios e desvio padrão da expressão de RNAm dos genes MT1G e ZIP14 de pacientes com RCU, de acordo com o grupo estudado nos tempos T0 e T1.

Marcadores Moleculares	Média ± DP		p <sup>a</sup>
	T0	T1	
<b>MT1G</b> ( $2^{-\Delta CT}$ )			
Suplementado (n=23)	0,28 ± 0,20	0,18 ± 0,19	0,045
Placebo (n=18)	0,23 ± 0,20	0,13 ± 0,90	0,094
p <sup>b</sup>	0,306	0,599	
<b>ZIP 14</b> ( $2^{-\Delta CT}$ )			
Suplementado (n=23)	0,22 ± 0,36	0,05 ± 0,09	0,045
Placebo (n=18)	0,16 ± 0,25	0,03 ± 0,05	0,039
p <sup>b</sup>	0,478	0,618	

<sup>a</sup> Comparação entre os tempos estudados - Teste de Wilcoxon <sup>b</sup> Comparação entre os grupos estudados - Teste de Mann-Whitney

Observou-se correlação positiva ( $r=0,548$ ) entre a expressão da ZIP 14 e da MT1G no T0 ( $p<0,01$ ) (FIGURA 4).

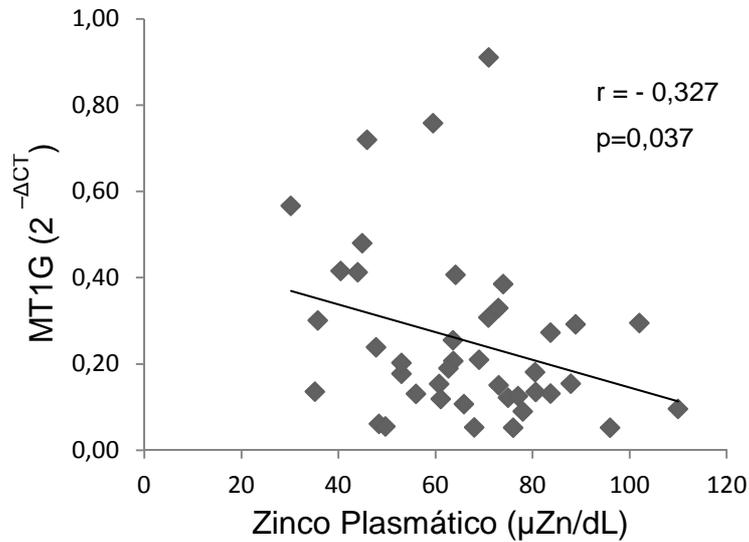
FIGURA 4 - Correlação entre a expressão gênica da ZIP 14 e da MT1G em pacientes com RCU no T0.



Relacionaram-se negativamente ( $r= - 0,327$ ) o Zn plasmático e a expressão do mRNA da MT1G no T0 ( $p=0,037$ ) (FIGURA 5).

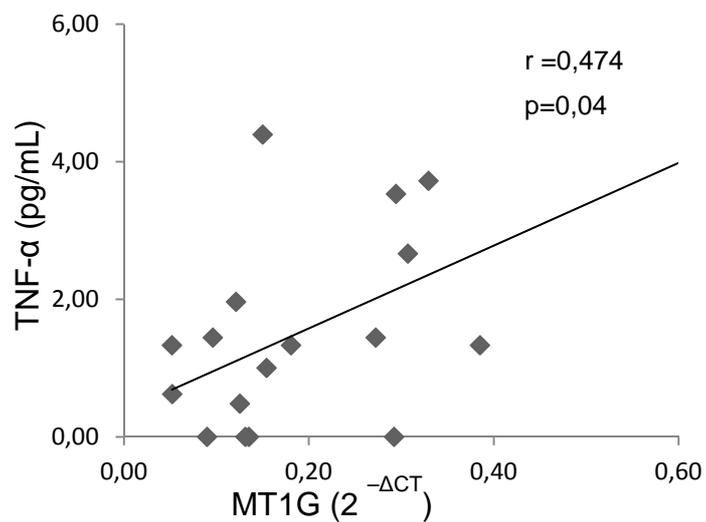
O percentual de probabilidade de adequação da ingestão alimentar de Zn mostrou relação inversa ( $r= - 0,323$ ) com a expressão da ZIP 14 ( $p=0,04$ ) no T1.

FIGURA 5 – Correlação entre a expressão gênica da MT1G e a concentração plasmática de Zn em pacientes com RCU no T0.



Por fim, a expressão do RNAm da MT1G correlacionou-se positivamente ( $r=0,474$ ) com a concentração sérica de TNF- $\alpha$  ( $p=0,04$ ) no grupo placebo, no T0 (FIGURA 6).

FIGURA 6 – Correlação entre a expressão gênica da MT1G e a concentração sérica de TNF- $\alpha$  em pacientes com RCU do grupo placebo no T0.



## 6. DISCUSSÃO

Neste estudo foram avaliados parâmetros relativos ao consumo alimentar, e o efeito da suplementação com Zn em marcadores bioquímicos e moleculares em relação a este mineral.

Para fins de caracterização dos pacientes investigados, o estudo demonstrou que há maior incidência de RCU em adultos, relativamente jovens, do sexo feminino, com nível de escolaridade no ensino médio, com poucos relatos de histórico de DII na família, dados que estão em conformidade com a literatura nacional e internacional (PARENTE et al., 2015; BARROS; SILVA; LINS NETO, 2014; THUKKANI; WILLIAMS; SONENBER, 2011; KLEINUBING JÚNIOR et al., 2011).

No que diz respeito ao consumo alimentar, verificou-se que os pacientes estudados apresentaram, em média, aporte energético e percentual médio de probabilidade de adequação da ingestão de Zn inferior ao recomendado, que pode ser justificado pela menor ingestão alimentar, devido ao quadro clínico da doença, caracterizado por diarreias recorrentes e pelo receio do paciente em alimentar-se (HO, 2004), resultado também encontrado por Silva et al., (2015).

Aliado a esses aspectos, vale ressaltar que a análise do padrão dietético foi feita com uso de inquérito preenchido pelo próprio paciente, portanto, sujeito a sub-relatos, em relação ao tamanho das porções ou omissão de algum alimento, esse fato, é mais comum entre mulheres, maioria da amostra estudada nesta pesquisa (SCAGLIUSI; LANCHÁ JÚNIOR, 2003).

Os pacientes submetidos à intervenção com Zn apresentaram menor percentual de probabilidade de adequação de Zn quando comparados aos pacientes do grupo placebo, comprovando que o consumo dietético do Zn influencia diretamente no controle homeostático deste oligoelemento (YUYAMA et al., 2005).

Com relação à ingestão de macronutrientes, o estudo mostrou que os pacientes consumiram quantidades adequadas em relação às faixas de distribuição aceitável, o que corrobora com os resultados de Silva et al., (2015) e indica que a dieta habitual desses pacientes caracteriza-se pelo baixo volume alimentar, equilíbrio de distribuição de macronutrientes e restrição de alimentos fonte de Zn, principalmente os de origem animal.

Quanto aos dados referentes aos parâmetros bioquímicos de Zn, o estudo revelou que, a intervenção com o gluconato de Zn promoveu aumento significativo

na concentração plasmática do mineral. No grupo placebo, houve redução nas concentrações de Zn plasmático, verificando-se diferença significativa entre os grupos e tempos pesquisados.

Com relação ao Zn plasmático, esses dados, corroboram com os achados de Matias et al., (2015), cujo aumento é justificado pelo mecanismo homeostático do Zn, que responde a intervenções nutricionais a curto prazo, mantendo as concentrações deste mineral dentro dos padrões fisiológicos (LOWE; FEKETE; DECSI, 2009; GIBSON et al., 2008).

No que diz respeito ao Zn eritrocitário, observou-se aumento significativo em suas concentrações após a suplementação, porém, a média se manteve abaixo do valor de referência para a normalidade. Esse resultado é justificado pelo baixo *turnover* de Zn neste compartimento, o que reflete mudanças discretas, porém de alta confiabilidade, em suas concentrações (SANDSTROM, 2001).

Contrariando os nossos achados, Matias et al., (2015), em estudo conduzido nesta mesma instituição encontraram diminuição significativa nas concentrações eritrocitárias de pacientes com RCU após suplementação com Zn, condição atribuída à inflamação e quantidade de Zn suplementado.

Ainda com relação aos parâmetros bioquímicos de Zn, vale destacar que 48% dos pacientes suplementados não alcançaram o valor mínimo de normalidade e a média da concentração de Zn eritrocitário se manteve abaixo do valor de referência, mesmo após a suplementação.

A suplementação com gluconato de Zn é a opção mais utilizada e mais acessível economicamente no controle e reestabelecimento do estado nutricional relativo ao mineral (IZINCG et al., 2004) Entretanto, vale ressaltar que esta formulação contém somente 14% de Zn disponível (WHO, 2006), portanto, a intervenção atendeu somente a 52% e 72% da EAR para homens e mulheres, respectivamente. Esse fato pode justificar, em parte, o aumento discreto dos parâmetros bioquímicos relacionados ao Zn.

A análise do estudo de correlações entre o percentual de adequação da ingestão de Zn e as concentrações de Zn plasmática e eritrocitárias foi positiva comprovando que variações na ingestão deste nutriente provocam um ajuste interno na absorção, distribuição e excreção deste mineral, melhorando sua disponibilidade para atuar nas diversas funções metabólicas (ZHENG et al., 2010).

Os resultados relacionados às citocinas revelam que no tempo inicial do estudo, o grupo placebo apresentou maior concentração sérica de IL-10, que por sua vez, relacionou-se positivamente com o TNF- $\alpha$  no mesmo grupo, no T1. O mesmo achado foi descrito por Liu et al., 2016, Wang et al., 2016 e Tao et al., 2015. Níveis elevados de citocinas inflamatórias como o TNF- $\alpha$  sinalizam maior síntese de IL-10 como resposta imunológica, pois a IL-10 é capaz de reduzir danos celulares na barreira intestinal causados pelo TNF- $\alpha$ , contribuindo para a recuperação do epitélio intestinal e reduzindo o contato de antígenos no lúmen intestinal (LORÉN et al., 2015).

Os resultados desta pesquisa demonstram que esse mecanismo possivelmente esteja preservado em pacientes com RCU que apresentam níveis adequados de Zn plasmático, relação não encontrada no grupo suplementado no T0, sugerindo que a deficiência de Zn afeta a resposta imunológica e desta forma, contribui para o estado inflamatório e oxidativo.

Por outro lado, a suplementação com 35 mg de gluconato de Zn/dia não melhorou o quadro inflamatório dos pacientes com RCU. Até o momento, não foram encontrados estudos que relacionam suplementação com Zn, citocinas séricas e RCU em humanos, contudo, ao contrário dos resultados descritos nesta pesquisa, estudos experimentais, com ratos, demonstram melhora na resposta imunológica após dieta adequada em relação ao Zn (PRASAD et al., 2004; SUWENDI et al., 2012).

As alterações metabólicas encontradas nesse estudo sugerem que o aumento na oferta de Zn, por meio da suplementação em doses que atinjam 100% da EAR, provavelmente resultará em diminuição significativa das concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, deve-se considerar que investigações de base molecular, como a expressão gênica dessas citocinas, possivelmente demonstrem resultados mais sensíveis, frente à suplementação.

Com relação à expressão gênica da MT1G e da ZIP 14, o estudo não mostrou diferença estatística entre o grupo suplementado e o placebo, no T0, demonstrando semelhança entre os grupos no início do estudo (T0). Além disso, observou-se correlação positiva entre a expressão da MT1G e da ZIP 14, revelando que os pacientes com maior expressão de ZIP 14 eram também os que tinham maior expressão de MT1G.

O efeito da suplementação com Zn na expressão gênica de proteínas que controlam a homeostase deste mineral na RCU representa uma área de interesse até o momento não explorado, o que certifica a originalidade e relevância deste estudo. Por outro lado, estudos que envolvem outras doenças, como obesidade, diabetes e aterosclerose, também caracterizadas por inflamação crônica e estresse oxidativo, descrevem resultados semelhantes aos encontrados nesta pesquisa (ROCHA et al., 2011; LAIS et al., 2016; DIAS et al., 2014).

Correlacionaram-se positivamente a expressão do RNAm da MT1G e a concentração sérica de TNF- $\alpha$  no grupo placebo, no T0, demonstrando que a inflamação exerce influência significativa na expressão da MT1G. Em situações de inflamação crônica, o aumento de citocinas pró-inflamatórias levam à maior síntese de MT e de proteínas transportadoras de Zn, especialmente, as da família Zip, como a ZIP 14. Sendo esta, uma proteína responsável pelo aumento das concentrações de Zn no meio intracelular, ocorrerá maior influxo deste mineral em células do fígado, onde o mesmo é mantido ligado à MT (NEURATH et al., 2014; OVERBECK et al., 2008).

A suplementação foi comprovadamente eficaz, havendo diminuição significativa da expressão do RNAm da MT1G e da ZIP 14 quando comparadas no T0 e no T1. Em paralelo à redução da expressão da MT1G, houve aumento significativo das concentrações de Zn plasmático. Da mesma forma, o percentual de probabilidade de adequação da ingestão alimentar de Zn mostrou relação inversa com a expressão da ZIP 14, demonstrando que os pacientes com ingestão de zinco mais próxima da EAR tinham menor expressão do RNAm da ZIP 14. Nesse contexto, estudos apontam menor expressão de MT quando o processo inflamatório é diminuído, sendo associado à melhor disponibilidade de Zn e resposta imunológica (MOCHEGANI, 2002; AYDEMIR et al. 2006; DIAS et al., 2014).

Os resultados deste estudo evidenciam a relação entre inflamação e controle homeostático do Zn, ressaltando a importância do consumo adequado deste mineral na melhoria dos parâmetros bioquímicos e moleculares e, conseqüente efeito na modulação de citocinas pró-inflamatórias.

## 7. CONCLUSÕES

Os pacientes com RCU tem ingestão insuficiente de Zn e calorias, e apresentam consumo com adequada distribuição de macronutrientes.

A suplementação com 35 mg de gluconato de Zn/dia durante 30 dias promoveu aumento significativo nas concentrações de Zn plasmático e eritrocitário, e reduziu de forma significativa a expressão dos genes codificadores da MT1G e da ZIP 14. Porém, não provocou alteração significativa nas citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- $\alpha$ ), e anti-inflamatória (IL-10).

A expressão gênica da MT1G foi maior em pacientes com concentrações séricas de TNF- $\alpha$  mais elevadas, e com baixas concentrações plasmáticas de Zn, demonstrando que a inflamação crônica característica da RCU está associada à deficiência de Zn e altera o controle homeostático deste nutriente.

A suplementação com Zn modula a expressão gênica de proteínas carreadoras deste mineral, refletindo em melhoras na distribuição de Zn nos compartimentos celulares e em importantes alterações na resposta imunológica de pacientes com RCU.

## 8. REFERÊNCIAS

ANDREE, K. B. et al. Investigation of lymphocyte gene expression for use as biomarkers for zinc status in humans. **Journal of Nutrition**, v.134, n. 7, p. 1716-1723, 2004.

ANDREWS, G. K. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, n. 1, p. 95-104, 2000.

AUTSCHBACH, R. et al. S-shaped in comparison to L-shaped partial sternotomy for less invasive aortic valve replacement. **European Journal Cardio-Thoracic Surgery**, v. 14, suppl I, p. 117-121, 1998.

AYDEMIR, T. B. et al. Zinc supplementation of young men alters metallothionein, zinc transporter, and cytokine gene expression in leukocyte populations. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v.103, n. 6, p. 1699-1704, 2006.

BAO, B. et al. Zinc modulates mRNA levels of cytokines. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 285, n. 5, p.1095-1102, 2003.

BARROS, P. A. C.; SILVA, A. M. R.; LINS NETO, M. A. F. The epidemiological profile of inflammatory bowel disease patients on biologic therapy at a public hospital in Alagoas. **Journal of Colproctology**, v. 34, n. 3, p. 131-35, 2014.

BATISTA, L. M. B. B. **Determinação do zinco, da proteína C Reativa e da expressão de genes codificantes de proteínas transportadoras de zinco e metalotioneína em pacientes hemolisados**. 2009. 54 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Saúde) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2009.

BAUMGART, D. C; SANDBORN, W. J. Crohn's disease. **The Lancet**, v. 380, n. 9853, p.1590-1605, 2012.

BLINDAUER, C. A.; LESZCZYSZYN, O. I. Metallothioneins: unparalleled diversity in structures and functions for metal ion homeostasis and more. **Natural Product Reports Articles**, v. 27, n. 5, p. 720-41, 2010.

BUENO, A. L.; CZEPIELEWSKI, M. A. Micronutrientes envolvidos no crescimento. **Revista HCPA**, v. 27, n. 3, p. 47-56, 2007.

CARPENE, E.; ANDREANI, G.; ISANI, G. Metallothionein functions and structural characteristics. **Journal of Trace Elements in medicine and Biology**, v. 21, suppl 1, p. 35-9, 2007.

CHANG, C. C. et al. Data on clinical significance of GAS2 in colorectal cancer cells. **Data in brief**, v. 8, p.82-86, 2016.

CHI STIAKOV, D. A.; VORONOVA, N. V. Zn<sup>2+</sup>-transporters-8: a dual role in diabetes. **Biofactors**, Oxford, v. 35, n. 4, p. 356-363, 2009.

CHIMIANT, F. et al. In vivo expression and functional characterization of the zinc transporter ZnT-8 in glucose-induced insulin secretion. **Journal of Cell Science**, London, v. 119, n. 20, p. 4199-4206, 2006.

DAVE, M. et al. Immunology of Inflammatory Bowel Disease and Molecular Targets for Biologics. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 43, n. 3, p. 405-24, 2014.

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.

DIAS, P. C. S. et al. The beneficial effects of rosuvastatin are independent of zinc supplementation in patients with atherosclerosis. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 28, p. 194-99, 2014.

DUFNER-BEATIE, J. et al. Structure, function, and regulation of a subfamily of mouse zinc transporter genes. **The Journal of Biological Chemistry**, USA, v. 278, n. 50, p. 50142-50150, 2003.

EIDE, D. J. Zinc Transporters and the cellular trafficking of zinc. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1763, n. 7, p. 711-722, 2006.

FEDORAK, R. N. et al. Recombinant human interleukin 10 in the treatment of patients with mild to moderately severe active Crohns disease. The Interleukin 10 Inflammatory Bowel Disease Cooperative Study Group. **Gastroenterology**, v. 119, n. 6, p. 1473-82, 2000.

FUKADA, T.; KAMBE, T. Molecular and genetic features of zinc transporters in physiology and pathogenesis. **Metallomics-Royal Society of Chemistry**, v. 3, n. 7, p. 662-674, 2011.

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

GIBSON, R. S. et al. Indicators of zinc status at the population level: a review of the evidence. **British Journal of Nutrition**, v. 99, suppl 3, p. S14-S23, 2008.

GUTHRIE, H. A.; PICCIANO, M. F. Micronutrient Minerals. In: \_\_\_\_\_. (Org.). **Human Nutrition**. St. Louis: Mosby, 1994. p. 351-357.

HAMBIDGE, M. Biomarkers of trace mineral intake and status. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 133, suppl 3, p. 948S-955S, 2003.

HAQ, F.; MAHONEY, M.; KOROPATNICK, J. Signaling events for metallothionein induction. **Mutation Research**, v. 10, n. 533, p. 211-26, 2003.

HO, E. Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. **The Journal of Nutrition Biochemistry**, v. 15, n. 10, p. 572-578, 2004.

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.

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

IZiNCG et al. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 25, n. 1, suppl 2, p. S99-203, 2004.

KLEINUBING JÚNIOR, H. et al. Perfil dos pacientes ambulatoriais com doenças inflamatórias intestinais. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 24, n. 3, p. 200-3, 2011.

KORZENIK, J. R.; PODOLSKY, D. K. Evolving knowledge and therapy of inflammatory bowel disease. **Nature Reviews**, v. 5, n. 3, p. 197-209, 2006.

KREZEL, A.; MARET, W. Dual nanomolar and picomolar Zinco(II) binding properties

of metallothionein. **Journal of the American Chemical Society**, v.129, n. 35, p 10911-21, 2007.

LAHIRI, A.; ABRAHAM, C. Activation of Pattern Recognition Receptors Up-Regulates Metallothioneins, Thereby Increasing Intracellular Accumulation of Zinc, Autophagy, and Bacterial Clearance by Macrophages. **Gastroenterology**, v. 147, n. 4, p. 835-46, 2014.

LAIS, L. L. et al. Effect of A One-Week Balanced Diet on Expression of Genes Related to Zinc metabolism and Inflammation in Type 2 Diabetic Patients. **Clinical Nutrition Research**, v. 5, n. 1, p. 26-32, 2016.

LAITY, J. H.; ANDREWS, G. K. Understanding the mechanisms of zinc-sensing by metal-response element binding transcription factor-1 (MTF-1). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 463, n. 3, p. 201-10, 2007.

LIU, Q. L. et al. Relationship between serum interleukin-17 level and inflammatory bowel disease. **Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents**, v. 30, n. 1, p. 181-8, 2016.

LIUZZI, J. P. et al. Responsive transporter genes within the murine intestinal-pancreatic axis form a basis of zinc homeostasis. **Proceedings of The National Academy of Science**, v. 101, n. 40, p. 14355-60, 2004.

LIUZZI, J. P.; COUSINS, R. J. Mammalian zinc transporters. **Annual Review of Nutrition**, v. 24, p. 151-72, 2004.

LIUZZI, J. P. et al. Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 19, p. 6843-68438, 2005.

LORÉN, V. et al. Interleukin-10 Enhances the Intestinal Epithelial Barrier in the Presence of Corticosteroids through p38 MAPK Activity in Caco-2 Monolayers: A Possible Mechanism for Steroid Responsiveness in Ulcerative Colitis. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0130921, 2015.

LOWE, N. M.; FEKETE, K.; DECSI, T. Methods of assessment of zinc status in humans: a systematic review. **The American Journal of Clinical Nutrition**, USA, v. 89, n.6, p. 2040S- 2051S, 2009.

MAOR, I. et al. Oxidative Stress, Inflammation and Neutrophil Superoxide Release in Patients with Crohn's Disease: Distinction Between Active and Non-active Disease. **Digestive Disease Science**, v. 53, n. 8, p.2208–2214, 2008.

MARET, W. The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. **Journal of Nutrition**, v. 130, suppl 5S, p.1455S-8S, 2000.

MARTIN, A. B. et al. Gastric and Colonic Zinc Transporter ZIP11 (Slc39a11) in Mice Responds to Dietary Zinc and Exhibits Nuclear Localization. **Journal of Nutrition**, v. 143, n. 12, p. 1882-8, 2013.

MASON, P. Physiological and medicinal zinc. **The Pharmaceutical Journal**, v. 276, p. 217-274, 2006.

MASSOCATTO, C. L. et al. Quantificação de elementos potencialmente tóxicos presentes em diferentes cultivares de grãos de soja e de milho comercializados na região Noroeste do Paraná. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 3, p. 182-92, 2013.

MATIAS, J. P. et al. Effect of zinc supplementation on superoxide dismutase activity in patients with ulcerative rectocolitis. **Nutrición Hospitalaria**, v. 31, n. 3, p. 1434-37, 2015.

MCCALL, K. A.; HUANG, C.; FIERKE, C. A. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. **The Journal of Nutrition**, v. 130, suppl 5S, p. 1437S-46S, 2000.

MENEZES, E. A. **Determinação da disponibilidade de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn em Amostras de Carnes Bovinas, Suínas e de Frango In natura e Processadas Termicamente**. 2010. 108 p. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2010.

MEUNIER, N. et al. Importance of zinc in the elderly: The ZENITH study. **European Journal of Nutrition**, London, v. 59, suppl 2, p. 1S-4S, 2005.

MOCCHEGIANI, E. MT mRNA gene expression via IL-6 and glucocorticoids, as potential genetic marker of immunosenescence: lessons from very old mice and humans. **Experimental Gerontology**, v. 37, p. 349-357, 2002.

MOCCHIGIANI, E. et al. Zinc-binding proteins (metallothionein and  $\alpha$ -2 macroglobulin) and immunosenescence. **Experimental Gerontology**, v. 41, p. 1094-1107, 2006.

MOLEIRINHO, A. et al. Gains, losses and changes of function after gene duplication: study of the metallothionein family. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e18487, 2011.

NAITO, Y.; TAKAGI, T.; YOSHIKAWA, T. Molecular fingerprints of neutrophil dependent oxidative stress in inflammatory bowel disease. **Journal of Gastroenterology**, v. 42, n. 10, p. 787–798, 2007.

NATHAN, C. et al. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 846-52, 2002.

NEPA/UNICAMP. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO**, 4ª edição. Campinas: BookEditora, 2011. 161 p.

NEURATH, M. F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 5, p. 329-42, 2014.

NOH, H. et al. The Alteration of Zinc Transporter Gene Expression Is Associated with Inflammatory Markers in Obese Women. **Biological Trace Element Research**, v. 158, n. 1, p. 1-8, 2014.

NOH, H. et al. The Changes of Zinc Transporter ZnT Gene Expression in Response to Zinc Supplementation in Obese Women. **Biological Trace Element Research**, v. 162, n. 1-3, p. 38-45, 2014a.

NORLING, L. V., SERHAN, C. N. Profiling in resolving inflammatory exudates identifies novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators and signals for termination. **Journal of Internal Medicine**, v. 268, n. 1, p. 15-24, 2010.

ORDÁS, I. et al. Ulcerative colitis. **The Lancet**, v. 380, n. 9853, p. 1606-1619, 2012.

OVERBECK, S. et al. Intracellular zinc homeostasis in leukocyte subsets is regulated by different expression of zinc exporters ZnT-1 to ZnT-9. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 83, n. 2, p. 368-380, 2008.

OVESEN, J. et al. The positive effects of zinc on skeletal strength in growing rats. **Bone**, v. 29, n. 6, p. 565-70, 2001.

PALMITER, R. D.; FINDLEY, S.D. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. **The Embo Journal**, Oxford, v. 14, n.4, p. 639-649, 1995.

PARENTE, J. M. L. et al. Inflammatory bowel disease in an underdeveloped region of Northeastern Brazil. **World Journal of Gastroenterology**, v. 28, n. 21, p. 1197-1206, 2015.

PEDROSA, L. F. C.; COZZOLINO, S. M. F. Composição centesimal e de minerais de mariscos crus e cozidos da cidade de Natal/RN. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n. 2, p. 154-57, 2001.

PODOLSKY, D. K. Inflammatory bowel disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 6, p. 417-29, 2002.

POWELL, S. R. The antioxidant properties of zinc. **Journal of Nutrition**, v. 130, suppl 5S, p. 1447S-54S, 2000.

PRASAD, A. S. et al. Anti-oxidant effect of zinc humans. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 37, n. 8, p. 1182-90, 2004.

PRASAD, A. S. Zinc in Human Health: Effect of Zinc on Immune Cells. **Journal of Molecular Medicine**, v. 14, n. 5-6, p. 353-357, 2008.

PRASAD, A. S. Impact of the discovery of human zinc deficiency on health. **The Journal of the American College of Nutrition**, v. 28, n. 3, p. 257-65, 2009.

ROCHA, P. B.K. et al. Expression of the Zinc Transporters Genes and Metallothionein in Obese Women. **Biological Trace Elements Research**, v. 143, n. 2, p. 603-11, 2011.

SANDSTROM, B. Diagnosis of zinc deficiency and excess in individuals and populations. **Food and Nutrition Bulletin**, v.22, n.2, p.133-37, 2001.

SCAGLIUSI, F. B.; LANCHA JÚNIOR, A. H. Subnotificação da ingestão energética na avaliação do consumo alimentar. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 471-81, 2003.

SEKLER, I. et al. Mechanism and regulation of cellular zinc transport. **Molecular Medicine**, Cambridge, v. 13, n. 7-8, p. 337-343, 2007.

SEVE, M. et al. In silico identification and expression of SLC30 family genes: Na expressed sequence tag data mining strategy for the characterization of zinc transporters tissue expression. **BMC Genomics**, London, v. 5, n. 1, p.32, 2004.

SILVA, B. C. et al. Deficiência na ingestão de nutrientes por pacientes com retocolite ulcerativa. In: XIV SEMANA BRASILEIRA DO APARELHO DIGESTIVO, n. 14, 2015, Curitiba. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva Express**. Curitiba, v. 1, n. 2, p. 237, nov., 2015.

SISTI, C. **Aplicação de diferentes metodologias na preparação de matrizes orgânicas para a determinação voltamétrica de elementos traço**. 2001. 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Reatores Nucleares de Potência e Tecnologia do Combustível Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SMIRNOVA, I. V. et al. Zinc and cadmium can promote the rapid nuclear translocation of MTF-1. **Journal of Cellular Physiology and Chemistry**, v. 275, n. 13, p.9377-9384, 2000.

SMIDT, K. et al. Zinc transporter genes in human visceral and subcutaneous adipocytes: lean versus obese. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 264, n. 1-2, p. 68-73, 2007.

SOARES, N. T.; PENHA, E. D. S.; MOURA, P.S. Análise da Adequação do Consumo Alimentar de Grupos. In: SOARES, N. T.; MAIA, F. M. M. (Org.). **Avaliação do Consumo Alimentar**: recursos teórico e aplicação das DRIs. Rio de Janeiro: Medbook, 2013. p. 151-176.

SUWENDI, E. et al. Zinc deficiency induces dysregulation of cytokine productions in an experimental colitis of rats. **Biomedical Research**, v. 33, n. 6, p. 329-336, 2012.

TAO, M. et al. Effect of Jiaweiwumei decoction on regulatory T cells and interleukin-10 in a rat model of ulcerative colitis. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, v. 35, n. 3, p. 312-25, 2015.

TAPIERO, H.; TEW, K. D. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. **Biomedicine Pharmacother**, v. 57, n. 9, p. 399-411, 2003.

THUKKANI, N.; WILLIAMS J. D.; SONNENBER, A. Epidemiologic characteristics of patients with inflammatory bowel disease undergoing colonoscopy. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 17, n. 6, p. 1333-7, 2011.

TSIANOS, E. V.; KATSANOS, K. H.; TSIANOS, V. E. Role of genetics in the diagnosis and prognosis of Crohn's disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 48, p. 5246-59, 2011.

VAN ASSENDELFT, O. W. The measure of hemoglobin. In: IZACK, G.; LEWIS, S. M. (Org.). **Modern concept in hematology**. New York: Academic Press, 1972. p. 14-25.

VASTO, S. et al. Inflammation, genes and zinc in ageing and age-related diseases. **Biogerontology**, v. 7, n. 5-6, p. 315-27, 2006.

WANG, X. et al. **Ulcerative Colitis Is Characterized by a Decrease in Regulatory B Cells**. Journal of Crohn's and Colitis, 2016. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26980839>>. Acesso em 15 jul. 2016. Epub ahead of print 15-mar-2016. <http://dx.doi.org/10.1093/ecco-icc/jjw074>

WEAVER, B. P. et al. Novel zinc-responsive post-transcriptional mechanisms reciprocally regulate expression of the mouse Slc39a4 and Slc39a5 zinc transporters( Zip4 and Zip5). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 388, n. 12, p. 1301-1312, 2007.

WESSELLS, K. R. et al. Plasma zinc concentration responds rapidly to the initiation and discontinuation of short-term zinc supplementation in healthy men. **Journal of Nutrition**, v. 140, n. 12, p. 2128-33, 2010.

WHITEHOUSE, R. C. et al. T. Zinc in plasma, neutrophil, lymphocytes and erythrocytes as determined by flameless atomic absorption spectrophotometry. **Clinical Chemistry**, v. 23, n. 3, p. 457-480, 1982.

WHO. **Implementing the new recommendations on the clinical management of diarrhoea**: guidelines for policy makers and programme managers. Geneva: World Health Organization, 2006. 34 p.

WIJESEKARA, N. et al. Beta cell-specific Znt8 deletion in mice causes marked defects in insulin processing, crystallization and secretion. **Diabetologia**, Berlin, v. 53, n. 8, p.1656-1668, 2010.

YUYAMA, L. K. O. et al. Zinco. In: COZZOLINO. S. M. F (Org.). **Biodisponibilidade de nutrientes**. Barueri: Manole, 2005. p. 513-36.

ZEITOUN. A. A. et al. Evaluation of neutrophilic CD64, interleukin 10 and procalcitonin as diagnostic markers of early- and late-onset neonatal sepsis. **Scandinavian Journal of Infectious Disease**, v. 42, n. 4, p. 299, 2010.

ZHENG, D. et al. Dynamic transcriptomic profiles of zebrafish gills in response to zinc depletion. **BMC Genomics**, v. 11, n. 548, p. 1-17, 2010.

## 9. ANEXOS

### Anexo 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*

#### 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 participar, como voluntário, 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 e Susy Érika de Lima Barros, sob orientação da Prof<sup>ª</sup>. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira. Após ser esclarecida sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine este documento, que

está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, você não será penalizada. Em caso de dúvida, você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí pelo telefone (086) 3215 5437.

#### *DESCRIÇÃO DA PESQUISA*

Esta pesquisa tem por objetivo analisar “O perfil nutricional relativo a minerais e marcadores do estresse oxidativo e inflamatório em pacientes com doença inflamatória intestinal”. Para tanto, o voluntário (a) será submetido à coleta de sangue venoso para análise do zinco, selênio, citocinas pró e anti- inflamatórias, 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, variação momentânea da pressão arterial, tonturas, desmaio ou formação de hematoma, devido ao jejum e à coleta sanguínea. Para contornar estas situações, a coleta será realizada utilizando materiais descartáveis e ocorrerá no Hospital Universitário, portanto, uma equipe multidisciplinar de apoio à saúde estará à disposição para contornar essas situações. Dessa forma, como alguns procedimentos realizar-se-ão junto à Universidade Federal do Piauí, cabe ao voluntário e/ou responsável comparecer à mesma quando for solicitado, em dia e hora a serem estabelecidos de acordo com a disponibilidade de ambas as partes (pesquisador e voluntária).

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 primeiro semestre de 2016.

Nomes e assinaturas dos pesquisadores:

Mayara Storel Beserra de Moura

Nina Rosa Mello Soares

Susy Érika de Lima Barros

Nadir do Nascimento Nogueira

#### **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: \_\_\_\_\_

Observações complementares \_\_\_\_\_

## 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 glutatona 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



UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PIAÚÍ - UFPI



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

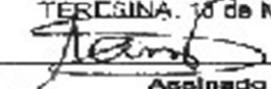


UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PIAUÍ - UFPI



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 Propeq nº 102014

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 DO HU/UFPI

**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 Lourival Lopes Filho**  
Presidente da CAAP- HUPI

## 10. APÊNDICES

### Apêndice A - FICHA DE ACOMPANHAMENTO INDIVIDUAL



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

**Subprojeto 1:** Efeito da Suplementação com Zinco na Expressão Gênica de Metaloproteínas e na Modulação de Citocinas Inflamatórias na Retocolite Ulcerativa.

**Subprojeto 2 :** Efeito da Suplementação com Zinco na Resposta Inflamatória em Pacientes com Retocolite Ulcerativa.

#### PROTOCOLO DA PESQUISA

Nº do Formulário: \_\_\_\_\_

Iniciais \_\_\_\_\_

Nº do Prontuário: \_\_\_\_\_

<b>DADOS SOCIO-ECONÔMICO-EDUCACIONAL</b>	
Iniciais:	
Endereço:	
Ponto de referência:	
Onde você mora é: ( ) zona rural ou ( ) zona urbana	
Cidade:	Estado:
Telefones:	
Data de nascimento: ____/____/____	Idade: _____
Qual cidade você nasceu?	Estado:
Sexo: ( ) masculino ( ) feminino	
<b>Se mulher:</b> Está grávida? ( ) sim ( ) não	
Está amamentando? ( ) sim ( ) não	
<b>Qual seu estado civil?</b> (IBGE, 2010)	
( ) Casado(a) ( ) Desquitado(a) ou separado(a) judicialmente	
( ) Divorciado(a) ( ) Viúvo(a) ( ) Solteiro(a)	
<b>Ou conjugal?</b>	
( ) Vive em união ( ) Não vivie, mas já viveu ( ) Nunca viveu em união	

<p><b>Qual a sua escolaridade?</b>  <input type="checkbox"/> Analfabeto <input type="checkbox"/> fundamental incompleto <input type="checkbox"/> fundamental completo  <input type="checkbox"/> ensino médio incompleto <input type="checkbox"/> ensino médio completo  <input type="checkbox"/> superior incompleto <input type="checkbox"/> superior completo  <input type="checkbox"/> pós-graduação _____</p>
<b>HÁBITOS DE VIDA</b>
<p>Você <b>fuma?</b> <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> parou  Há quanto tempo parou? _____  Em sua casa, alguém fuma? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não</p>
<p>Você consome alguma <b>bebida alcoólica?</b> <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não  Qual? <input type="checkbox"/> cerveja <input type="checkbox"/> cachaça <input type="checkbox"/> vinho  Quantos dias na semana? <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6 <input type="checkbox"/> 7 <input type="checkbox"/> raro/social  Qual a quantidade? _____</p>
<p>Você pratica alguma <b>atividade física/exercícios?</b> <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> parou  Qual? _____  Quantas vezes na semana? _____  Quantas horas por dia? _____  Há quanto tempo você começou a praticar? _____  Motivo de parar a atividade _____  Há quanto tempo parou? _____  Nível de atividade física <input type="checkbox"/> sedentário <input type="checkbox"/> leve <input type="checkbox"/> moderada <input type="checkbox"/> intensa</p>
<b>HISTÓRICO CLÍNICO FAMILIAR</b>
<p>Entre seus pais e irmãos, alguém também tem DII? <input type="checkbox"/> sim _____ <input type="checkbox"/> não</p>
<p>Quando descobriu a doença?</p>
<p>Você faz uso de algum <b>suplemento vitamínico</b> mineral ou pró e pré- bióticos  <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não  Se <b>SIM</b>, qual? _____  Há quanto tempo você usa? _____</p>
<p>Além da DII, você tem outra doença?  <input type="checkbox"/> DCV <input type="checkbox"/> DM <input type="checkbox"/> Hepatopatia <input type="checkbox"/> Nefropatias <input type="checkbox"/> Câncer <input type="checkbox"/> AIDS <input type="checkbox"/> SP <input type="checkbox"/> Ob  <input type="checkbox"/> Outra _____</p>
<p>Você faz uso de <b>medicamentos?</b> <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não  <input type="checkbox"/> Mesalazina ou sulfalazina <input type="checkbox"/> Azatioprina <input type="checkbox"/> corticosteróides - _____  <input type="checkbox"/> Outros _____</p> <p><b>Você usa ou já usou medicamentos biológicos?</b>  <input type="checkbox"/> Infliximabe <input type="checkbox"/> Adalimumabe <input type="checkbox"/> outros _____  Se terapia biológica, quanto tempo faz uso _____ <input type="checkbox"/> parou – tempo _____</p>



## Apêndice B - REGISTRO ALIMENTAR DE 3 DIAS

### Registro diário de sua alimentação



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: \_\_\_\_\_

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

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

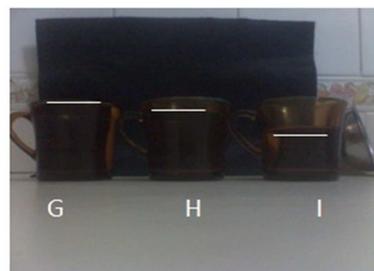
Consumo mensal de açúcar da família: \_\_\_\_\_



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



Copo americano



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





Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Dia: ( ) Sábado ( ) Domingo

<b>Horário</b>	<b>Alimento</b>	<b>Medida Caseira</b>