

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS E SAÚDE

LORENA MARIA BARROS BRITO BATISTA

**DETERMINAÇÃO DO ZINCO, DA PROTEÍNA C REATIVA E DA
EXPRESSÃO DE GENES CODIFICANTES DE PROTEÍNAS
TRANSPORTADORAS DE ZINCO E METALOTIONEÍNA EM PACIENTES
HEMODIALISADOS**

TERESINA
2009

LORENA MARIA BARROS BRITO BATISTA

DETERMINAÇÃO DO ZINCO, DA PROTEÍNA C REATIVA E DA
EXPRESSÃO DE GENES CODIFICANTES DE PROTEÍNAS
TRANSPORTADORAS DE ZINCO E METALOTIONEÍNA EM PACIENTES
HEMODIALISADOS

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências e Saúde como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências e Saúde. Área de concentração: Métodos Diagnósticos e Análise das Condições de Saúde.

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Nadir do Nascimento Nogueira.

Co-orientadora:

Prof.^a Dr.^a Semiramis Jamil Hadad do Monte

TERESINA
2009

FICHA CATALOGRÁFICA
Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

B326d Batista, Lorena Maria Barros Brito.
 Determinação do zinco, da proteína c reativa e da expressão
 de genes codificantes de proteínas transportadoras de zinco e
 metalotioneína em pacientes hemodialisados [manuscrito] /
 Lorena Maria Barros Brito Batista. – 2009.
 53 f.

 Impresso por computador (printout).
 Dissertação (Mestrado) – Programa de Mestrado em Ciências
 e Saúde, Universidade Federal do Piauí, 2009.
 “Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nadir do Nascimento Nogueira”
 “Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Semiramis Jamil Hadad do Monte”

 1. Doença Renal Crônica. 2. Hemodiálise. 3. Expressão
 Gênica. 4. Zinco. I. Título.

CDD 616.614

LORENA MARIA BARROS BRITO BATISTA

DETERMINAÇÃO DO ZINCO, DA PROTEÍNA C REATIVA E DA EXPRESSÃO DE GENES CODIFICANTES DE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE ZINCO E METALOTIONEÍNA EM PACIENTES HEMODIALISADOS

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí para obtenção do título de Mestre em Ciências e Saúde

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora:

Presidente - Prof.^a Dr.^a Nadir do Nascimento Nogueira
Universidade Federal do Piauí

1º Examinador - Prof.^a Dr.^a Lúcia de Fátima Campos Pedrosa Schwarzschild
Universidade Federal de Rio Grande do Norte

2º Examinador - Prof. Dr. Adalberto Socorro da Silva
Faculdade de Saúde, Ciências Humanas e Tecnológicas do Piauí

Aos meus pais, pelo incentivo
e apoio em todas as etapas
da minha vida.

Ao meu marido, pelo amor e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois, sem sua ajuda, nada teria sido possível.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Nadir do Nascimento Nogueira, pela confiança, paciência; exemplo de seriedade científica e entusiasmo no ensino dos fundamentos para execução deste estudo.

À Prof.^a Dr.^a Semiramis Jamil Hadad do Monte, pela importante participação em todas as etapas desta pesquisa.

Aos Profs. Drs. José Machado Moita Neto e Adalberto Socorro da Silva pela amizade e disponibilidade.

Ao Mestre e amigo Prof. José Tibúrcio do Monte Neto, pela motivação e confiança.

Aos colegas, Amanda de Castro Amorim, do Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular (LIB); Kaluce Soares Gonçalves Almondes; Danilla Michelle Costa e Silva; Daniele Rodrigues Carvalho Caldas do Laboratório de Nutrição Experimental da UFPI, e ao Bioquímico Erasmo Oliveira pela disponibilidade, ensinamentos e realização das técnicas de determinação do zinco no plasma, determinação da concentração da proteína C reativa, extração de DNA e PCR em tempo real.

A todos os funcionários e técnicos do LIB e da CLINEFRO pela disposição em colaborar com esta pesquisa.

Aos meus pais, Pedro e Maria do Carmo, por sempre terem me incentivado.

Ao meu marido, Júnior, pela eterna compreensão e pelo apoio nas horas difíceis.

Aos amigos Joaquim Xavier de Sousa Júnior e Ana Maria Pearce Brito de Área Leão, pelo companheirismo e amizade.

RESUMO

O zinco é um micro-elemento essencial que tem despertado interesse devido à sua importância para os seres humanos, tornando relevante a compreensão de sua homeostase. Estudos realizados neste sentido destacam as proteínas transportadoras do mineral como chave para o processo homeostático. Distúrbios na homeostase do Zn têm sido associados a inúmeras doenças crônicas como a Doença Renal Crônica (DRC) e têm-se discutido, dentre as possíveis causas deste desequilíbrio, as alterações nas funções das proteínas transportadoras desse elemento. Esse estudo objetivou determinar a concentração de Zn plasmático, a proteína C reativa, e a expressão de genes codificantes das proteínas Znt1, Zip1, Zip3, Zip4, Zip14 e metalotioneína em pacientes hemodialisados com DRC. O estudo foi realizado em 25 pacientes com DRC, em terapia de hemodiálise, que atendiam aos seguintes critérios: tempo de hemodiálise maior ou igual a 6 meses, fístula artéreo-venosa funcional, ausência de doenças crônicas, sem retransplante, com Kt/V \geq 1,2, sem intercorrências clínicas ou cirúrgicas. A determinação do Zn foi feita por espectrofotometria de absorção atômica; a análise da proteína C reativa pelo teste de Quimioluminescência, e reação de PCR quantitativo e em tempo real (qPCR) para determinação da expressão dos genes codificantes das proteínas transportadoras ZnT1, Zip1, Zip3, Zip4, Zip14 e metalotioneína. Os dados foram analisados utilizando-se o teste "t" de Student e análise de variância para comparações entre os grupos, com nível de significância de 95%. Dos 25 pacientes estudados, 12 eram do sexo masculino e 13 do sexo feminino. A idade variou entre 18 – 78 anos, com média de 53 anos. A média do zinco plasmático foi de 61,27 μ g/dL, e intervalo de 43,32-89,6; a proteína C reativa apresentou média de 0,228 \pm 0,139mg/dL, variando de 0,024 a 0,515mg/dL. A média e desvio padrão da expressão dos genes codificantes do Znt1 foi de 10,00252 \pm 0,001401; A Zip1 teve expressão média de 0,00402 \pm 0,002694, a Zip3 0,00013 \pm 0,000180; Zip4 0,00638 \pm 0,002682; Zip14 de 0,00371 \pm 0,002234 e Znt1, 0,00252 \pm 0,001401. A expressão do gene da metalotioneína foi de 0,03122 \pm 0,0014. A concentração de zinco no plasma diminuiu de forma significativa, enquanto os níveis de proteína C reativa permaneceram elevados, sugerindo persistência da atividade inflamatória dos pacientes, com a compartimentalização do zinco. A expressão dos genes da Metalotioneína, ZnT1 e Zip14 se mostraram alterados de forma significativa. No entanto, as alterações foram contrárias ao esperado, frente às modificações do zinco e Proteína C reativa, fortalecendo a idéia de que outros fatores não controlados podem interferir na expressão de tais genes. O RNAm da Zip1, Zip3 e Zip4 não apresentou modificação na sua expressão, de forma significativa, nos dois períodos do estudo.

Palavras-chave: Zinco. Expressão Gênica. Hemodiálise. Doença renal crônica.

ABSTRACT

Zinc is an essential micro-element which has attracted attention due to its importance for humans, making relevant the understanding its homeostasis. Studies in this regard highlight the effect of mineral transporter proteins as key to the homeostatic process. Disturbances in the homeostasis of zinc have been associated with many chronic diseases such as chronic kidney disease (CKD) and have discussed the following possible causes of this imbalance, changes in the functions of transport protein that element. This study aimed to determine the concentration of plasma Zn, C-reactive protein and the expression of genes coding proteins Znt1, Zip1, Zip3, Zip4, Zip14 and metallothionein in hemodialysis patients with CKD. The study was conducted with 25 patients with CKD on hemodialysis therapy, who met the following criteria: duration of hemodialysis equals or greater than 6 months, artery-venous fistula functioning, absence of chronic diseases, no retransplantation, with $Kt / V \geq 1.2$, without clinical or surgical complications. The determination of Zn was made through atomic absorption spectrophotometry, the analysis of C-reactive protein by chemiluminescence test, and PCR reaction and quantitative real-time (qPCR) to determine the expression of coding genes from the transporter protein ZnT1, Zip1, Zip3, Zip4, Zip14 and metallothionein. The data were analyzed using the "t" test of Student and analysis of variance for comparisons between groups, with a significance level of 95%. From the 25 patients studied, 12 were male and 13 were female. The age ranged from 18 to 78 years, averaging 53 years. The average of plasma zinc was 61,27mg/dL, and it ranged from 43,32 to 89,6; The C-reactive protein had an average of $2,28 \pm 1,39$, ranging from 0.24 to 5.15. The average and the standard deviation of the expression of coding genes of the Znt1 was 10.00252 ± 0.001401 ; The Zip1 had an average expression of 0.00402 ± 0.002694 , the Zip3 0.00013 ± 0.000180 , the Zip4 $0,00,638 \pm 0.002682$; the Zip14 of 0.002234 ± 0.00371 , the Znt10, 00252 ± 0.001401 . The expression of the metallothionein gene was 0.03122 ± 0.0014 . The concentration of zinc in the patients' plasma has significantly (the levels of C-reactive protein remained elevated, suggesting of the inflammatory activity of patients and therefore, the compartmentalization of zinc. In the expression of metallothionein genes, ZnT1 and Zip14 were significantly altered. However, the changes were contrary to expectations, related to the changes of zinc and C-reactive protein, reinforcing the idea that other unmeasured factors may interfere in the expression of such genes. The mRNA of Zip1, Zip3 and Zip4 showed no significant change in expression, in both periods of study.

Keywords: Zinc. Gene expression. Hemodialysis. Chronic kidney disease

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA-DNA complementar

CLINEFRO- Clínica Nefrológica do Piauí

DNTP- Deoxyribonucleoside Triphosphate

DRC- Doença Renal Crônica

DTT- Dithiothreitol

IL- Interleucina

Kt/V- Medida de adequação da diálise

LIB- Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular

MT- Metalotioneína

MTF-1- Fator de transcrição metal responsivo -1

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

PCRus- Proteína C Reativa ultrasensível

qPCR- Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa

RNA- Ácido Ribonucléico

RNA^m-Ácido ribonucléico mensageiro

RNase- Ribonuclease

RnASIN- Inibitor da ribonuclease

rpm- rotação por minuto

RT-PCR- Reação em cadeia da polymerase com transcriptase reversa

SCL- Família Carreadora de Solutos

TPEN- N,N,N', N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine

T₀- Tempo inicial

T₃- Tempo após 3 anos

Zip- ZRT/IRT like protein

ZnT- Transportador de zinco

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Expressão de genes codificantes de proteínas transportadores de zinco no início do estudo e após 3 anos..... 34**
- Figura 2 – Expressão do gene codificante da Zip 14 no início do estudo e 3 anos após, conforme os níveis de zinco dos pacientes 35**
- Figura 3 – Expressão do gene codificante da metalotionaína segundo a zincemia plasmática nos dois tempos do estudo 37**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Perfil dos pacientes participantes do estudo quanto ao sexo, idade e renda média	33
Tabela 2 – Média e desvio padrão das concentrações plasmáticas do zinco e proteína C reativa nos tempos T0 e T3.....	34

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Aspectos metabólicos do zinco	10
1.2	Zinco e a nutrigenômica	13
1.3	Metalotioneína	14
1.4	Proteínas transportadoras de zinco	15
1.4.1	Família carreadora de soluto (SCL) 30A	16
1.4.2	Família carreadora de soluto (SCL) 39A	19
1.5	Zinco e inflamação	22
1.6	Doença renal crônica e inflamação	23
2	OBJETIVOS	26
2.1	Geral	26
2.2	Específicos	26
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Caracterização do estudo	27
3.2	Etapa 1	27
3.3	Etapa 2	28
3.3.1	Avaliação bioquímica do zinco	28
3.3.1.1	Controle de contaminação	28
3.3.1.2	Reagentes	28
3.3.1.3	Coleta das amostras de sangue	28
3.3.1.4	Separação dos componentes do sangue	29
3.3.1.5	Determinação do zinco no plasma	29
3.4	Determinação da proteína C reativa (PCR)	30
3.5	Métodos moleculares	30
3.5.1	Extração do RNA	30
3.5.2	Quantificação e pureza da amostra	30
3.5.3	Síntese de cDNA	31
3.5.4	Reação de PCR quantitativo e em tempo real (qPCR)	31
3.6	Análise estatística	32
3.7	Aspectos éticos	32
4	RESULTADOS	33
4.1	Zinco plasmático	33
4.2	Expressão gênica das proteínas transportadoras de zinco	34
4.3	Proteína c reativa	36
4.4	Expressão gênica da metalotioneína	36
5	DISCUSSÃO	38
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
	REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos metabólicos do zinco

O zinco é um micro-elemento fundamental para os organismos vivos. A ele têm sido atribuídas funções no crescimento e desenvolvimento dos organismos, proliferação, diferenciação e apoptose celular. Possui funções catalítica, estrutural e regulatória, fazendo parte da estrutura de grande número de proteínas, garantindo estabilidade às suas conformações e, muitas vezes, facilitando interações entre essas proteínas e outras macro-moléculas como, por exemplo, o DNA (BERG; SHI, 1996). Andreini et al. (2006) realizaram um estudo de bioinformática para avaliar quantas e quais proteínas codificadas pelo genoma humano requerem zinco para suas funções fisiológicas e encontraram que atualmente 2.800 proteínas humanas são ligadas ao zinco, equivalente aproximadamente a 10% do que o genoma humano produz.

Esse mineral age como antioxidante, destruindo radicais livres pela redução de radicais superóxido a peróxido de hidrogênio, por meio da catalização da enzima superóxido dismutase. A redução eficiente desses radicais livres de superóxido mantém a integridade de membranas, reduz o risco de câncer e diminui o processo de envelhecimento (BRAY; BETTER, 1990; HO; COURTEMANCHE; AMES, 2003; SONG et al., 2009).

A deficiência de zinco está associada a manifestações adversas já na embriogênese dos organismos vivos. Dvergsten et al. (1993) demonstraram em animais que a carência do mineral no período pré-natal e pós-natal estava associada a prejuízos na maturação e diferenciação dos neurônios cerebelares. Em crianças e adolescentes, a carência de zinco promove deficiência no crescimento e retardo no desenvolvimento, podendo, ainda, identificar-se anorexia, apatia, depressão, diarreia, alopecia, distúrbios do paladar e do olfato, dermatite e hipogonadismo. A acrodermatite enteropática, doença auto-sômica recessiva, caracterizada pela mal-absorção intestinal do micro-elemento, leva crianças a apresentarem sintomas como acrodermatite periorifical, placas crostosas descamativas, irritabilidade e alterações

emocionais por comprometimento do córtex cerebral (OMS, 1998; ACKLAND; MICHALCZYK, 2006). Diante dos diferentes papéis biológicos do zinco, fica evidente sua importância no organismo humano.

A recomendação diária deste nutriente para a população sadia é de 8 mg para mulheres e 11 mg para os homens (FOOD AND NUTRITION BOARD, 2001). Mariscos, ostras, carnes vermelhas, fígado, miúdos e ovos são as melhores fontes alimentares de zinco, sendo que seu conteúdo varia entre os alimentos e outros fatores podem afetar sua biodisponibilidade. De acordo com Sandstead e Smith (1996), alguns constituintes químicos ingeridos simultaneamente nas dietas podem inibir a absorção do zinco, como o fitato, presente em cereais, e outros, como os aminoácidos cisteína e histidina, aumentar a absorção do mineral, melhorando sua solubilidade.

Por outro lado, o excesso de zinco pode ser tóxico para as células, tendo em vista sua união a ligantes intracelulares inapropriados, competição com outros metais por locais de ligação em enzimas e transportadores, causando prejuízos ao funcionamento normal da célula (KOH et al., 1996; GAITHER; EIDE, 2001).

É necessário, então, um controle rigoroso dos níveis intracelulares de zinco. Para isso, vários mecanismos de quelação, efluxo e influxo de zinco do interior das células para o plasma e organelas intracelulares foram desenvolvidos nos organismos superiores. Por meio de sua ligação a proteínas intra e extracelulares, sequestração no interior de vesículas e organelas e sua excreção pelos rins, intestino e pele, o zinco é mantido de maneira estável no organismo e variações bruscas em suas concentrações são evitadas. Um dos principais instrumentos de manutenção da homeostase do zinco são as proteínas que coordenam a entrada e a saída do mineral nas células e as que promovem quelação intracelular deste mineral (COUSINS; MCMAHON, 2000; SEKLER et al., 2007).

O zinco é absorvido, principalmente, no intestino delgado, pela borda em escova dos enterócitos, mediante processos de difusão passiva e processo mediado por carreadores. Em situações de baixa ingestão, ocorre aumento da capacidade de transporte mediada por carreadores e, quando há aumento da oferta alimentar, o mecanismo de difusão passiva se sobressai. O mineral absorvido é transportado para o fígado ligado à albumina e daí para outros

tecidos ligados aos aminoácidos ou à alfa-2-macroglobulina (VALLEE; FALCHUK, 1993). O zinco é excretado do organismo por meio dos rins, da pele e do intestino. As perdas urinárias variam de 300-600 mg/dia, influenciadas por mecanismos de secreção no túbulo proximal do néfron.

Diferentemente do ferro, o zinco não possui forma de estoque no organismo para mobilização em situações de deficiências, tornando necessário um eficiente mecanismo homeostático para o zinco, visando a minimizar os efeitos das variações na ingestão do mineral (KING et al., 2001).

Com relação à sua distribuição no organismo humano, 80% do zinco estão nos ossos, músculos, fígado e pele. A circulação representa a menor parte do total de zinco do organismo e o *turnover* plasmático é o mais elevado. No sangue, 80% deste encontra-se no eritrócito e 16%, no plasma, ligado principalmente à albumina (SANDSTRÖM, 1997). Como se observa, sua distribuição no organismo ocorre de forma heterogênea, tornando a avaliação nutricional do zinco um processo difícil, agravada pela escassez de parâmetros bioquímicos sensíveis, validados como critério diagnóstico (COZZOLINO, 2005).

Segundo Whitaker (1998), a dosagem do zinco plasmático não reflete claramente o estado nutricional do elemento no indivíduo. Isso ocorre devido à redistribuição tissular do elemento após sua absorção e ao fato de algumas doenças infecciosas e inflamatórias, o estado de gravidez e algumas medicações promoverem a compartimentalização do mineral, gerando quadros de hipozincemia relativa. Mesmo considerado um parâmetro limitado na avaliação do zinco corpóreo, a literatura traz valores de referência para esse elemento no plasma, cujo ponto de corte para se determinar o risco de deficiência é 70 µg/dL (GIBSON, 1990).

A dosagem do zinco eritrocitário é também utilizada para avaliação do estado nutricional relativo a esse micro-elemento. Esse é um parâmetro que reflete os níveis de zinco em um período de tempo mais longo, não traduzindo mudanças recentes em seu conteúdo no organismo, devido à meia vida prolongada das hemáceas (GIBSON, 1990). Este método possui limitações, como dificuldade no processo de análise, na separação da amostra, interferência de matriz, problemas relacionados ao conteúdo de hemoglobina

no eritrócito, importante na determinação da quantidade de zinco, que pode estar alterado devido a patologias crônicas ou agudas associadas.

A atividade enzimática das metaloenzimas zinco dependentes tem sido proposta como um indicador do estado nutricional do mineral. Esse método é criticado pelo fato de uma única enzima não poder refletir o estado nutricional do zinco. Assim, surgem problemas como falta de sensibilidade do método e dificuldade de acesso aos tecidos para análise. Dentre as enzimas potencialmente utilizáveis tem-se a 5-nucleotidase, a superóxido dismutase e a fosfatase alcalina (SALGUEIRO, 2000; YUYAMA, 2005; LOWE; FEKETE; DESCI, 2009).

Outros parâmetros têm sido utilizados para a determinação da situação nutricional relativa ao elemento nos indivíduos, como concentração de zinco nos cabelos, refletindo estado nutricional crônico de deficiência, na urina, nas células mononucleares, nas plaquetas (LOWE; FEKETE; DESCI, 2009).

A metanálise publicada por Lowe, Fekete e Desci (2009) teve como objetivo identificar biomarcadores úteis na avaliação do estado nutricional relativo ao zinco, determinando quais respondiam apropriadamente a alterações no estado nutricional relativo ao micro-elemento frente a terapias de suplementação ou depleção deste. Segundo esta mesma metanálise, a maioria dos trabalhos utilizava a dosagem plasmática do zinco como marcador do estado nutricional relativo ao mineral e concluiu que o zinco plasmático alterava-se significativamente, de acordo com as intervenções realizadas, sugerindo-o como bom marcador para o estado nutricional do zinco.

1.2 Zinco e a nutrigenômica

A nutrigenômica é a ciência que estuda a interação entre os constituintes da dieta e os genes e seus produtos, alterando fenótipos (KAPUT, 2007) e nos é apresentada com grandes possibilidades de ter nessa ferramenta respostas confiáveis relativas ao comportamento metabólico do zinco.

As interações entre os nutrientes e os genes podem ocorrer de várias formas e uma delas é a interação direta, na qual o nutriente, após interagir com um receptor, age como fator de transcrição, ligando-se ao DNA e induzindo a

expressão gênica (ZEISEL, 2007). O zinco age modificando a expressão gênica por meio de sua ligação ao fator de transcrição metal responsivo 1 (MTF-1) (MULLER; KERSTEN, 2003). O MTF-1 funciona como um sensor intracelular de zinco, ligando-se direta e reversivelmente ao mineral, adotando uma conformação ligante-DNA e transferindo-se para o núcleo da célula, onde se liga aos elementos metal-responsivos em locais de leitura dos genes, promovendo o aumento da transcrição destes genes (SMIRNOVA et al., 2000). O papel deste fator como segundo mensageiro e transdutor de sinais na expressão gênica tem se destacado, sendo objeto de interesse de pesquisadores. Dentre os genes que têm sua expressão gênica modificada pelas concentrações de zinco, pode-se citar os genes codificantes das proteínas transportadoras de zinco e os genes codificantes da metalotioneína, cujo trabalho realizado por Liuzzi, Blanchard e Cousins (2001) demonstraram alterações em suas expressões, após suplementação da dieta de ratos com este mineral (McCORMICK; MENARD; COUSINS, 1981).

Cousins, Liuzzi e Lichten (2006) realizaram um estudo em humanos e suplementaram com 15 mg de zinco/dia homens jovens, constatando alterações nas expressões gênicas de metalotioneínas, proteínas transportadoras de zinco e citocinas, em populações de leucócitos. Observaram que algumas proteínas aumentaram sua expressão com a suplementação do mineral na dieta, enquanto outras responderam de forma negativa, e ainda que, esses mesmos genes alteram suas expressões em resposta a fatores, como citocinas e outros mediadores de resposta inflamatória.

1.3 Metalotioneína

A metalotioneína (MT) é uma proteína citosólica de baixo peso molecular (6.000-7.000 KDa) descoberta em 1957 em rim de cavalo por Margoshes e Valle. Possui alto conteúdo de cisteína (25-30%) que se liga ao zinco, com capacidade de ligação de 5-7 átomos deste metal por molécula, assim como a outros metais, com alta afinidade. Seus resíduos de cisteína seriam os responsáveis pela função de detoxificação de metais, já que esses radicais

captariam os metais (ANDREWS, 2000; SATO; KONDOH, 2002). É assim chamada de proteína ligante-metal, presente abundantemente nas células.

Está relacionada com a manutenção da homeostase do zinco (ANDREWS, 2000) e tem sua expressão gênica induzida pela administração desse mineral, que regula a síntese de metalotioneína através do fator de transcrição metal responsivo 1 (KOURY, 2004). Estudos em roedores e humanos têm revelado que os níveis de RNAm das metalotioneínas são responsivos ao aumento do zinco oferecido na dieta (SULLIVAN; BURNETT; COUSINS, 1998; CAO et al., 2000; COUSINS; LIUZZI; LICHTEN, 2006; AYDEMIR; BLANCHARD; COUSINS, 2005), havendo aumento da expressão da proteína quando há um aumento na oferta do micro-elemento.

Estudo onde administraram-se lipopolissacarídeos a ratos com (MT) e sem (MT-null) a expressão do gene da metalotioneína observaram-se aumento nas concentrações hepáticas de zinco em ratos normais (MT), mas não em ratos MT-null, fato que sugeriu que a metalotioneína seria responsável pelo acúmulo de zinco no fígado durante reações inflamatórias (PHILCOX et al., 1995). Esses resultados sugeriram que a metalotioneína tem capacidade de reter zinco em condições fisiológicas, tendo grande importância no metabolismo deste elemento.

Está associada à resistência ao estresse oxidativo e foi a primeira proteína envolvida na homeostase do zinco a ser identificada e estudada. É responsável pela regulação da concentração intracelular do zinco e, em situações de baixa concentração de zinco na célula, a metalotioneína libera o zinco, mantendo os níveis intracelulares desse elemento. Sob condições de elevado estresse oxidativo, a liberação do zinco ligado à MT resultaria em maior disponibilidade de agrupamentos sulfidrilas prontos para atuar na proteção antioxidante. Por sua vez, o zinco liberado seria redistribuído na célula, podendo ser utilizado em outros mecanismos de proteção antioxidante (SATO, 1992).

1.4 Proteínas transportadoras de zinco

As proteínas transportadoras de zinco dividem-se em duas famílias responsáveis pelo controle do efluxo e influxo do mineral nas células,

garantindo a homeostase do micronutriente nos meios intra e extracelular. São elas: Famílias Carreadoras de Solutos (SCL) 39A e Famílias Carreadoras de Solutos (SCL) 30A (LIUZZI; COUSINS, 2004).

1.4.1 Família carreadora de soluto (SCL) 30A

A família SCL30A, também conhecida como família ZnT, compreende dez membros (ZnT1-10) que realizam o transporte de zinco removendo-o do citoplasma das células para o plasma e interior das organelas citoplasmáticas (PALMITER; HUANG, 2004). Teve seu primeiro membro descoberto em 1995, quando Palmiter e Findley decodificaram o cDNA do transportador de zinco ZnT1 em experiência com células de rim de ratos. Essas células puderam crescer em ambientes extracelulares muito ricos em zinco e suas concentrações intracelulares permaneceram baixas mesmo nessas condições. Baseados nisso, uma função de exportação de zinco para o ZnT-1 foi proposta. Sua importância para os organismos vivos foi estudada por Tsuda et al (1997), que verificaram aumento da expressão gênica dessa proteína durante isquemia cerebral transitória em ratos, fato seguido por morte neuronal e influxo de zinco para o interior da célula. Koh et al., em 1996, aprofundaram o estudo observando que neurônios do hipocampo de ratos quando expostos a altas concentrações do mineral, elevavam os níveis de mRNA da ZnT1, sugerindo um papel de defesa neuronal da ZnT1, evitando grandes aumentos dos níveis do elemento no interior do neurônio.

A atividade transportadora de zinco de outros membros desta família (ZnT 2, 4-8) tem sido comprovada mediante a sobrevivência de células em meios com média e alta concentração em zinco. Esses transportadores promovem a diminuição do zinco intracelular mediante o efluxo do mineral das células e influxo em vesículas intracelulares. O mecanismo de transporte mediado pelos ZnTs é desconhecido e ocorre contra um gradiente de concentração. A maioria dessas proteínas tem sido encontrada associada a endossomos, sistema de Golgi e retículo endoplasmático.

Estruturalmente, as proteínas da família ZnT têm uma homologia considerável entre si. Dos quatro membros caracterizados por Liuzzi, Blanchard e Cousins (2001), que foram ZnT 1, 2, 3 e 4, todos possuíam um

polo hidrofóbico, composto por seis domínios transmembrana, com nitrogênio e carbono terminais, localizados no intracelular. Foram detectadas, também, alças intracelulares ricas em resíduos de histidina, que serviriam para se ligar ao zinco, possuindo um canal anfipático por meio do qual o zinco é transportado (PAULSEN; SAIER, 1997).

Os transportadores da família ZnT são encontrados principalmente no intracelular. A proteína ZnT1 parece ser o único ligado à membrana plasmática, encontrando-se distribuído de forma difusa nos tecidos. Localiza-se nos enterócitos em sua porção basolateral (McMAHON; COUSINS, 1998; YU et al., 2007) de acordo com sua função em reduzir o zinco do citosol, promovendo seu efluxo para o interior da circulação porta, permitindo a absorção do zinco da dieta.

McMahon e Cousins, em 1998, realizaram experimento alimentando ratos com dietas com níveis variáveis de zinco e observaram que as dietas com elevadas concentrações de zinco aumentaram a expressão do gene codificante da ZnT1 no intestino dos ratos mas não alteraram sua expressão no fígado desses animais. Observaram, também, que apesar da elevação dos níveis da expressão gênica do mRNA da ZnT1 no intestino dos ratos, os níveis dessa proteína aumentaram modestamente. Liuzzi, Blanchard e Cousins (2001) observaram em ratos que a expressão da ZnT1 foi mais alta na placenta, no rim e no intestino delgado, seguidos pelo tecido adiposo e fígado. Quando foi realizada a suplementação de zinco na dieta, a expressão do RNAm da ZnT1 aumentou significativamente. Em humanos, os níveis do RNAm da ZnT1 nos leucócitos aumentaram marcadamente com a suplementação de zinco na dieta e foi mais abundante em monócitos que em linfócitos T e neutrófilos (PALMITER; FINDLEY, 1995). Aydemir, Blanchard e Cousins (2006) suplementaram seres humanos 16 dias com zinco e observaram aumento na expressão do gene da ZnT1.

A expressão do mRNA da ZnT2 é mais localizada, sendo encontrado em células do intestino delgado, testículos e rim. Nessas células, concentra-se em compartimentos intracelulares, associados a endossomos, sistema de Golgi ou retículo endoplasmático. Nas células acinares do pâncreas, encontra-se em vesículas e, dessa forma, realiza o transporte do zinco para o interior de vesículas e organelas citoplasmáticas, reduzindo sua concentração no

citoplasma das células (LIUZZI et al., 2004). A expressão intestinal em ratos do ZnT2 mRNA reflete muito estritamente a ingestão de zinco na dieta, não sendo detectável quando os ratos são alimentados com dietas pobres em zinco. Em condições basais, o ZnT2 não foi detectado no fígado, mas quando os ratos foram submetidos à privação alimentar, algum nível de expressão foi detectado, sugerindo que os hormônios associados com a resposta ao jejum têm uma influência regulatória sobre estes transportadores (LIUZZI; BLANCHARD; COUSINS, 2001).

Como se observou, o nível de mRNA ZnT2 reflete muito fielmente a ingestão de zinco no intestino delgado. Essa resposta diferencial sugere que os genes deste transportador são estritamente regulados pelo suplemento de zinco. A expressão dos transportadores ZnT1, ZnT2 e ZnT4 mRNA foi ótima nas células dos vilos do intestino delgado, mais que nas células das criptas, fato que reflete sua função, relacionada à absorção do zinco (COUSINS; LIUZZI; LICHTEN, 2006).

Outra proteína transportadora de zinco é a ZnT3, ainda em caracterização, presente principalmente nas vesículas intracelulares em tecidos do cérebro e testículos. Os últimos estudos envolvendo esta proteína focaram seu papel nas desordens cerebrais, como isquemias, epilepsias (COLE et al., 2000; DANSCHER et al., 2003).

Estudo anterior realizado por Cousins et al. (2003) em ratos revelou que o ZnT4 está distribuído em todos os tecidos, sendo maior sua expressão no intestino delgado e na glândula mamária. Os níveis de ZnT4 mRNA foram significativamente diminuídos com a dieta deficiente em zinco. É a proteína responsável pela síndrome letal do leite em ratos (PILETZ; GANCHOW, 1978), caracterizada pela morte dos ratos em período de lactação, quando os filhotes de mães com mutações no gene da ZnT4 eram amamentados exclusivamente pelo leite dessas ratas. Os filhotes sobreviviam quando alimentados por ratas normais ou quando suplementados oralmente com zinco.

A ZnT5 encontra-se em abundância nas vesículas das células beta pancreática, que contêm insulina (KAMBE et al., 2002). É a única proteína transportadora da família com 12 domínios transmembrana, ao contrário das outras, que possuem seis domínios. Possui também papel relevante em reações alérgicas e é requerido na hipersensibilidade de contato e na resposta

alérgica mastócito mediada (NISHIDA et al., 2009). Em experiência com células derivadas de linfócitos de ave, observou-se que a ZnT5 poderia formar complexos heterodímeros com a ZnT6, podendo ativar a enzima zinco dependente fosfatase alcalina (NISHIDA et al., 2009). Estudos relativos à doença de Alzheimer revelam que há um aumento das proteínas ZnT6 no cérebro de indivíduos com a patologia. A distribuição da ZnT6 foi posteriormente estudada em cérebro de pacientes com doença de Alzheimer e identificou-se que neurônios degenerados apresentavam altos níveis de ZnT6 (LOVELL; SMITH; MARKESBERY, 2006).

A ZnT7 é também expressada no pâncreas e seu homodímero também pode ativar a enzima zinco dependente fosfatase alcalina. A ZnT8 foi mais recentemente descrita e é específica das células do pâncreas, estando presente nas células beta e alfa em ratos (CHIMIENI et al., 2006). Estudos observaram a expressão da ZnT8 e sua relação com diabetes tipo 2, revelando que em ratos Knockout os níveis de insulina plasmática foram reduzidos em machos e fêmeas e que a concentração de zinco, bem como a secreção de insulina glicose-dependente, estavam marcadamente reduzidos quando observados cortes nas ilhas pancreáticas desses ratos (POUND et al., 2009). Ao contrário, o aumento na expressão da ZnT8 nas células da ilha leva ao acúmulo de zinco e ao aumento da secreção de insulina glicose-dependente (CHIMIENI et al., 2004).

A ZnT9 foi isolada inicialmente de células pulmonares embriológicas humanas, localizando-se no citoplasma e núcleo (SIM; CHOW, 1999) e a ZnT10 pode ser encontrada no fígado e no cérebro do feto, acreditando-se que desempenhe papel importante durante o desenvolvimento fetal e tenha uma expressão restrita à vida fetal (HUANG, 2005).

1.4.2 Família carreadora de soluto (SCL) 39A

A outra família de transportadores é a Zip, composta de 14 membros com atividade transportadora de zinco confirmada para Zip de 1 a 8 e Zip14 (GAITHER, 2001). A atividade de transporte de zinco tem sido confirmada através da mensuração da captação de zinco ou por meio de probes que

produzem emissões fluorescentes ligando-se ao zinco intracelular lábil (MATHEWS et al., 2006).

O mecanismo de ação desta família não é conhecido e seu processo de transporte ocorre a favor de um gradiente de concentração. Atuam elevando os níveis intracelulares de zinco, promovendo o influxo deste do meio extracelular para o intracelular e o seu efluxo do interior das organelas intracelulares (LIUZZI; COUSINS, 2004). A maior parte das proteínas Zip estão localizadas nas membranas plasmáticas das células, fato que, no intestino, corrobora sua função de captação do zinco extracelular. Outro fator que fortalece a teoria refere-se à sua posição polarizada nas células intestinais, quando assumem localização mais basolateral durante dietas com suprimento adequado de zinco.

A Zip1 é expressa em grande variedade de tecidos e tipos celulares, estando presentes na membrana plasmática e no retículo endoplasmático das células (GAITHER; EIDE, 2001; MILON et al., 2001). Tem sua expressão gênica alterada pelos níveis de zinco, sendo regulada negativamente pela suplementação do mineral (CAO et al., 2001) e por determinados tipos de hormônios, como a prolactina e a testosterona, utilizadas no tratamento de certos tipos de câncer prostático, promovendo o aumento na concentração intracelular de zinco (COSTELLO et al., 1999). Sua expressão gênica é sugerida como biomarcador do estado nutricional relativo ao zinco no organismo humano (ANDREE et al., 2004).

A Zip2 é expressa em menor proporção e em poucos tecidos e como a Zip1, ela também está relacionada com o transporte do zinco do extracelular e do interior de organelas para o citosol das células, tendo sua expressão alterada pelos níveis de zinco. Cao et al. (2001) realizam um estudo avaliando a responsividade da metalotioneína e da expressão gênica do RNA mensageiro da Zip2 à adição de N,N,N', N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine (TPEN), um quelante intracelular de zinco que reduz os seus níveis, observando-se um aumento na expressão do RNAm da Zip2.

Dentre as proteínas transportadoras de zinco da família Zip, a Zip3 é a que possui menos informações, mas em estudos que avaliaram sua expressão em tecido da próstata, observou-se que a mesma é encontrada em tecido

prostático normal, tendo sua expressão aumentada pela prolactina, localizando-se principalmente na membrana apical das células do epitélio secretor. Já nas células cancerígenas da próstata, a expressão da Zip3 encontra-se reduzida (DESOUKI et al., 2007).

Estudo avaliando a expressão da Zip3 em células epiteliais mamárias observou que esta proteína tem um importante papel na importação do zinco no tecido mamário. Constatou também que a referida proteína não tem, nos níveis de zinco, a única forma de regulação de sua expressão, sendo responsiva a prolactina (KELLEHER; LONNERDAL, 2002). Outro estudo sugere que a Zip3 não é um transportador específico para o zinco, já que outros metais podem inibir o transporte deste mineral por essa proteína (DUFNER-BEATTIE et al., 2003). A Zip3 está presente em organelas intracelulares em concentrações médias de zinco, mas, quando há carência do mineral, essa proteína situa-se principalmente na superfície das células (WANG et al., 2004).

A Zip4 é um dos transportadores mais estudados em humanos. Sua deficiência funcional leva à acrodermatite enteropática, situação em que o Zip 4 não é capaz de captar o zinco no intestino, causando deficiência orgânica do metal (WANG, 2002). Estudos em ratos com dietas restritas em zinco aumentaram a concentração do Zip4 e sua localização na membrana plasmática dos enterócitos, enquanto a suplementação de zinco rapidamente reverte esta situação.

Em dietas com suplementação de zinco, a Zip5 não tem sua expressão alterada. No entanto, sua localização sofre modificação de acordo com a quantidade de zinco ingerido. Ela é diferentemente internalizada em resposta à concentração de zinco da dieta, contribuindo para homeostase do metal (DUFNER-BEATTIE et al., 2004).

Dentre outras proteínas transportadoras pertencentes à família Zip, Taylor (2000) identificou o gene da Zip6, como estrogênio responsivo em células de câncer do pulmão. A Zip8 é identificada como transportador expresso nos monócitos, que tem sua expressão marcadamente aumentada com a resposta inflamatória aguda, sendo seu gene induzido pelo fator de necrose tumoral alfa e endotoxinas (COUSINS, 2006). Análises de *microarray*

DNA em humanos demonstraram aumento na expressão da Zip8 na inflamação sistêmica aguda induzida pela infusão de endotoxina.

Por outro lado, a Zip14 está presente nos hepatócitos de ratos durante resposta de fase aguda, da sépsis e da inflamação, promovendo um aumento na captação hepática de zinco e produzindo uma hipozincemia transitória. Liuzzi et al. (2005) realizaram estudo em ratos, observando que a interleucina-6 (IL-6) produziu aumento significativo na expressão do gene codificante da Zip14 em cultura de hepatócitos de ratos, considerando-a o principal transportador de zinco responsivo a citocinas.

1.5 Zinco e inflamação

Uma das alterações observadas na resposta inflamatória são as alterações nas concentrações dos micronutrientes plasmáticos (FILTEAU; TOMKINS, 1994). Estudos têm documentado alterações no metabolismo do zinco em modelos experimentais com animais, de inflamação aguda e crônica, e mesmo em humanos com condições inflamatórias crônicas (MOSHAGE, 1997; GABAY; KUSHNER, 1999; VASTO, 2006; CVIJANOVICH et al., 2009). Wieringa et al. (2002) realizaram um estudo com 418 crianças da Indonésia onde dosaram proteínas de fase aguda, dentre elas a proteína C reativa e as concentrações plasmáticas de zinco e ferro, e concluíram que o estado inflamatório afetou significativamente os níveis de zinco, promovendo hipozincemia plasmática nos pacientes.

Na resposta inflamatória, inúmeras citocinas e proteínas são produzidas, dentre elas a IL-6 e a proteína C reativa (PCR). A IL-6 é uma citocina produzida por macrófagos ativados e induz a expressão de outros genes que levam a alterações no organismo (MOSHAGE, 1997).

Dentre os genes que têm sua expressão induzida pela interleucina-6, tem-se o gene codificante da Zip14 e da metalotioneína (SCHROEDER; COUSINS, 1990; LIUZZI et al., 2006). Com o aumento da transcrição desses genes e da síntese destas proteínas, há uma tendência em ocorrer uma compartimentalização do zinco, tendo em vista que a Zip14 promove a captação do zinco do extracelular para o intracelular e a metalotioneína, por ser um quelante intracelular de zinco, promove o acúmulo intracelular de zinco

durante reação inflamatória (PHILCOX et al., 1995). Assim, a hipozincemia é uma das alterações encontradas na resposta inflamatória, devido ao acúmulo do zinco no citosol das células.

Um dos marcadores utilizados para caracterizar o estado inflamatório é a proteína C reativa, que possui grande sensibilidade em estados inflamatórios agudos e crônicos, podendo permanecer com concentrações elevadas durante estes estados (THOMPSON et al., 1995).

1.6 Doença renal crônica e inflamação

A doença renal crônica é uma patologia determinada pela perda progressiva da função renal, acompanhada pelos mais variados desequilíbrios de metais, eletrólitos e nutrientes. A perda da função renal é avaliada pelo ritmo de filtração glomerular que, quando atinge valores muito baixos, inferiores a 15 ml/min, tem-se o que se denomina falência funcional renal, estágio mais avançado da perda funcional do rim, correspondente ao estágio 5. Nesta fase, as terapias de substituição renal, dentre elas, a hemodiálise, fazem-se necessárias (BRENNER; LAZARUS, 1992; ROMÃO JUNIOR, 2004).

Pacientes submetidos à hemodiálise caracterizam-se, ainda, por um estado de inflamação crônica (KIMMEL et al., 1998; YAO; LINDHOLM; STENVINKEL, 2004; VIDT, 2006). Sethi et al. (1988) foram os primeiros pesquisadores a demonstrar que um terço dos pacientes em hemodiálise apresentava níveis elevados de proteína C reativa. Vários outros estudos confirmaram que a inflamação crônica tem prevalência aumentada nesta população, com 30% a 50% dos pacientes exibindo evidências de resposta inflamatória exacerbada (ZIMMERMANN et al., 1999; PANICHI et al., 2000; BAYES et al., 2003).

Dentre os fatores que explicam o estado de inflamação crônica, têm-se a potencial contaminação do sangue por endotoxinas no fluido de diálise e o repetido contato do sangue com materiais artificiais no circuito extra corpóreo, com ativação de sistemas biológicos como o sistema imunológico e coagulação. A própria fisiopatologia da insuficiência renal promove diminuição da eliminação renal das citocinas, associados a um aumento na sua produção (YAO; LINDHOLM; STENVINKEL, 2004). Poole et al. (1990) demonstraram

que a diminuição da função renal pode afetar o *clearance* do fator de necrose tumoral alfa e da interleucina-1 (IL-1) em ratos nefrectomizados, ocorrendo também o acúmulo de substâncias urêmicas tóxicas, que estimulam a síntese de citocinas inflamatórias nestes pacientes.

O estado inflamatório crônico promove um estado de má nutrição progressiva. Os elevados níveis de citocinas proinflamatórias resultam em catabolismo por ação direta no sistema gastrointestinal, ou por ação indireta mediada por citocinas no sistema nervoso central, resultando em anorexia (BERGSTROM, 1999). Acchiardo, Moore e Latour (1983) associaram a má nutrição com o aumento da mortalidade em pacientes dialisados. Desde então, estudos têm demonstrado a importância do estado nutricional no prognóstico dos pacientes hemodialisados (MARCKMANN, 1989).

O estado inflamatório crônico promove alterações na concentração de zinco. Estudos realizados por Mendes et al. (1988), avaliando a frequência de hipozincemia em pacientes hemodialisados e comparando-os a um grupo controle de pacientes normais, observaram valores de zinco sérico significativamente inferiores no grupo de pacientes hemodialisados.

A hipozincemia encontrada nesses pacientes possui várias justificativas. A diminuição da oferta de zinco, pela diminuição da ingestão; o aumento na excreção urinária e fecal do metal encontrada na insuficiência renal crônica (CABRAL; DINIZ, 2003); o processo de hemodiálise, que compromete a excreção dos elementos podendo tanto retê-los no organismo, quanto espoliá-los. A redistribuição do zinco corporal pode ser considerada outro fator responsável pela hipozincemia, como observaram Kimmel et al. (1988), níveis eritrocitários de zinco elevados nos pacientes com doença renal crônica, enquanto os níveis plasmáticos estavam diminuídos. Atribuiu, assim, a hipozincemia a uma redistribuição tissular do zinco com o aumento de sua concentração em alguns tecidos e redução em outros. Dentre as hipóteses que explicariam essa redistribuição estaria uma alteração na expressão das proteínas transportadoras do zinco em função de uma modificação nos próprios níveis plasmáticos do elemento ou do estado inflamatório crônico do paciente.

Neste contexto, a nutrigenômica se apresenta como alternativa na avaliação do estado nutricional referente ao zinco. A expressão gênica das

proteínas transportadoras de zinco seria um dos caminhos que levariam ao entendimento do metabolismo e à homeostase do mineral.

Os sintomas da deficiência de zinco confundem-se com os da doença renal, dificultando o dimensionamento da importância da hipozincemia no paciente portador de insuficiência renal crônica. Manifestações como anorexia, disfunção gonadal, deficiência na resposta imunocelular estão presentes em ambas as situações. A reposição de zinco nestes pacientes não é consensual.

Existem controvérsias, principalmente, na determinação do estado nutricional do zinco nestes pacientes, que conforme exposto, não possui um método com sensibilidade e acurácia satisfatória (MENDES et al., 1988), acrescidos, da escassez de estudos que interpretem o comportamento do zinco nos pacientes portadores de doença renal, submetidos ao processo de hemodiálise. Nesta investigação, acredita-se que os resultados poderão contribuir para a compreensão do comportamento do zinco nos pacientes em questão.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Analisar a expressão de genes codificantes de proteínas transportadoras de zinco e metalotioneína em portadores de doença renal crônica, submetidos à hemodiálise nos tempos inicial do estudo e após três anos.

2.2 Específicos

- Quantificar a expressão do RNAm da proteína transportadora de zinco pertencente à família SCL 30A, ZnT1 nos tempos T0 e após três anos (T3).
- Quantificar a expressão do RNAm das proteínas transportadoras de zinco pertencentes à família SCL 39A: Zip1, Zip3, Zip4 e Zip14 nos tempos T0 e três anos após (T3).
- Quantificar a expressão do RNAm da metalotioneína nos tempos T0 e três anos após (T3).
- Analisar a concentração plasmática de zinco nos tempos T0 e T3.
- Avaliar o estado inflamatório dos pacientes mediante a dosagem da proteína C reativa nos tempos T0 e T3.
- Avaliar as alterações na expressão dos genes codificantes das proteínas em análise, diante das modificações nas concentrações plasmáticas de zinco e do estado inflamatório dos pacientes ocorridas no intervalo de três anos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização do estudo

Realizou-se um estudo experimental em pacientes portadores de doença renal crônica (DRC), estágio 5, em programa de hemodiálise na Clínica Nefrológica do Piauí (CLINEFRO), em Teresina-PI, no período de 2005 a 2008. O estudo foi dividido em duas etapas.

3.2 Etapa 1

No primeiro momento do estudo, tempo 0 (T0), as amostras de sangue dos pacientes eram provenientes do Biobanco do Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular da Universidade federal do Piauí (LIB/UFPI). Obteve-se o RNA de 43 amostras de sangue, que foram retrotranscritas em cDNA, para realização de estudo prévio, cujo objetivo era, também, avaliar a expressão gênica das proteínas transportadoras de zinco, dando origem a este banco de amostras.

Os critérios de inclusão utilizados para seleção dos pacientes nesta etapa do estudo foram:

- tempo de hemodiálise maior ou igual a seis meses;
- fístula artéreo-venosa funcionante;
- ausência de doenças crônicas como diabetes e alterações na tireóide;
- sem retransplante;
- com $Kt/V \geq 1,2$;
- sem intercorrências clínicas e/ou cirúrgicas.

O cDNA resultante foi estocado em *freezer* a -80°C . Posteriormente, essas amostras foram submetidos à reação em cadeia da polimerase em tempo real e os resultados analisados pelo programa *Sequence Detection System* (Applied-Biosystems), podendo-se obter a quantidade relativa de cópias do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) dos genes codificantes da

metalotioneína, Zip1, Zip3, Zip4, Zip14, ZnT1. Nas amostras de sangue também foram realizadas análise de zinco plasmático e da proteína C reativa. A metodologia descrita se refere à empregada em estudo prévio cujos resultados foram utilizados neste trabalho, correspondendo ao tempo T0, que consta no protocolo experimental do presente estudo.

3.3 Etapa 2

Três anos após o início do estudo (T3), novas amostras foram coletadas de pacientes que participaram da primeira fase, havendo uma redução no número dos mesmos, sendo o motivo das perdas o óbito, devido à elevada morbimortalidade identificadas em pacientes em hemodiálise, tendo a amostra final da pesquisa sido constituída de 25 pacientes. Nesta etapa, além da coleta de amostras sanguíneas, foram obtidas informações relativas a dados como idade, sexo, renda familiar, tempo de hemodiálise, mediante consulta nos prontuários dos pacientes.

3.3.1 Avaliação bioquímica do zinco

3.3.1.1 Controle de contaminação

Todo o material de vidro e polipropileno utilizados no estudo foram desmineralizados por meio de banho em solução de ácido cítrico a 30% por, no mínimo, 12 horas, seguido de enxágüe com água *MILLIQ® Water System* por dez vezes, com a finalidade de se reduzir a contaminação com metais (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

3.3.1.2 Reagentes

Para o preparo das soluções e a diluição das amostras, utilizou-se água livre de íons, processada pelo *MILLIQ® Water System* (Continental Water System Corp. El Paso, Texas).

3.3.1.3 Coleta das amostras de sangue

Foram coletadas amostras de sangue dos 25 pacientes que fizeram parte da primeira etapa do estudo e permaneciam em hemodiálise, atendendo aos critérios de inclusão previamente determinados.

As amostras sanguíneas (10 ml) foram obtidas por meio de punção venosa, em tubos de ensaio desmineralizados contendo citrato de sódio a 30% (6 mg/ml de sangue total), por técnicos de enfermagem treinados para este fim. No momento da coleta, os pacientes se encontravam em jejum mínimo de 10 horas, sendo realizadas antes do início das sessões de hemodiálise.

3.3.1.4 Separação dos componentes do sangue

Realizou-se a centrifugação do sangue total a 3.000 rpm durante 15 minutos (centrífuga Sigma[®] 2K15), em até 2 horas após a coleta. O plasma foi, então, extraído com pipeta automática, acondicionados em tubos de polipropileno desmineralizados e estocados à temperatura de -20 °C até o momento da análise.

3.3.1.5 Determinação do zinco no plasma

Para determinação do zinco no plasma, as amostras foram enviadas por Sedex 10[®] para o Laboratório de Nutrição e Minerais da Universidade de São Paulo, mantidas congeladas a -20 °C. A análise do mineral foi realizada por espectrofotometria de absorção atômica de chama, segundo método proposto por Rodriguez; Narizano; Cid (1989). Três alíquotas de cada amostra de plasma foram preparadas, diluindo-se em água de *MILLIQ[®] Water System*, na proporção de 1:5 e aspiradas diretamente no espectrofotômetro.

Utilizou-se aparelho de espectrofotometria de absorção atômica de chama, da marca VARIAN SS 220, adotando-se as seguintes condições de trabalho:

- a. Comprimento de onda: 213,9 nm;
- b. Fenda: 1 nm
- c. Chama oxidante acetileno/ar, com fluxo de 2,5: 15 l/min, respectivamente;
- d. Sistema de atomização: queimador com cabeça de uma fenda de 10 cm de largura e nebulizador munido de pérola de impacto;
- e. Leitura feita em triplicata, com tempo de integração de 3 segundos.

O equipamento foi calibrado com soluções aquosas de glicerol a 3% e ácido nítrico a 1%, preparadas por diluição de padrão de zinco *Tritisol*[®] (MERCK[®]), nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1,0 µg/ml, sendo os resultados fornecidos em absorbância.

Para verificar a exatidão das leituras das amostras, utilizou-se o padrão certificado de *Zinc-Atomic Spectroscopy Standard Solution Fluka* 1,0000 g/l (*Sigma Aldrich*[®]) e o padrão certificado de referência Seronorm[®].

3.4 Determinação da proteína C reativa

O método utilizado para quantificação da proteína C reativa (PCR) foi o de Quimioluminescência, lido no aparelho Immulite 2000, realizada em laboratório privado de análises clínicas de Teresina. Considerou-se como inflamados pacientes cujos valores da proteína C reativa foram superiores a 0,1 mg/dL.

3.5 Métodos moleculares

Para a realização dos métodos moleculares empregados neste estudo, uma segunda amostra sanguínea foi coletada obedecendo à mesma técnica adotada na primeira etapa para obtenção do RNA mensageiro e, posterior, obtenção do cDNA, para realização da reação de polimerase em cadeia em tempo real, realizada no Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular (LIB) da Universidade Federal do Piauí.

3.5.1 Extração do RNA

As amostras de sangue para extração de RNA foram centrifugadas a 4.000 rpm durante 20 minutos, para separação da fase fluida do sangue e retirada da camada referente às células leucomonocíticas, constituindo o *buffer coat*. Este foi transferido para um tubo *ependorf*, estéril e livre de RNase. A extração de RNA foi realizada pelo método Trizol, de acordo com instruções do fabricante (Invitrogen). O RNA foi ressuscendido em 30 µL de água bidestilada, tratada com 0,1% de dietilpirocarbonato-DEPC (Invitrogen) e logo, em seguida, determinou-se a pureza da amostra em nanoespectrofotômetro (NanoDrop Technology Inc., Wilmington, USA).

3.5.2 Quantificação e pureza da amostra

Para a determinação da concentração e pureza do RNA extraído, uma alíquota de 2 µL de cada amostra foi transferida para o NanoDrop, sendo realizada e registrada a leitura 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 entre 1,8 e 2, determinando a pureza das amostras. Em seguida, as amostras foram acondicionadas a -80 °C, para posterior síntese de cDNA.

3.5.3 Síntese de cDNA

O RNA extraído das amostras foi submetido à síntese de cDNA, cujo *mix* utilizado na reação continha DNTPs (2,5 mMoles), tampão da enzima transcriptase reversa (10x), 0,1 M de Dithiothreitol (DTT), inibidor de Rnase (RNasin), oligo dT₁₅ 1/10 (7,5 pMoles), além do RNA de cada paciente e água ultrapura, atingindo volume final de 50 µL. A reação de RT-PCR (qPCR) foi processada num termociclador GeneAmp® PCR System 9700. O produto da reação foi estocado em *freezer* a -80 °C até o momento de sua utilização para realização qPCR.

3.5.4 Reação de PCR quantitativo e em tempo real (qPCR)

A reação em cadeia da polimerase quantitativa e em tempo real sem sonda foi realizada no equipamento ABI prism 7500 (Applied-Biosystems) com os iniciadores específicos (*primers*) para cada gene de interesse, utilizando como gene constitutivo o 18S RNA ribossômico (RNAr). Os *primers* foram sintetizados de acordo com sequências previamente publicadas (COUSINS et al., 2003) pela Invitrogen, conforme quadro 1.

RNAm humano	Forward Primer	Reverse Primer e no de acesso no GenBank
MT1 & 2 NM005950, X97260	GCACCTCCTGCAAGAAAAGCT	GCAGCCTTGGGCACACTT
ZNt1 NM021194	GGTGGCCAATACCAGCAACT	TGTACTTCCACTGTATCACCACCTTCTG
ZIP1 BC003152	AAGGGCTCTGCTGGGAACA	ACCCCTGGCCCATCATG
ZIP 3 XM046934	TGTGAGGGAAAAGCTCCAGAAG	TTCGGCCAGCGGGTAGT
ZIP4 NP570901	GCGGCCTGTAAATACG	ACTTTCCACACGGCCCG
ZIP14	ACTTAGGGCATCGCAGATGTTT	GCAGTAACCTAGACGGGTCATTTAA
18S rRNA	AGTCCCTGCCCTTTGTACACA	GATCCGAGGGCCTCACTAAAC

Quadro 1 – Gene que codifica a proteína, com respectivos números de acesso no GenBank e *primers*

Fonte: Cousins et al. (2003).

As reações foram preparadas em placas de polipropileno contendo 96 poços e específicas para reação (Applied Biosystems). Utilizou-se 2 µL de cDNA, 6,5 µL do *mix Syber green PCR master mix*, 0,52 µL dos *primers forward* e *reverse*, numa concentração de 200 nM e completado com água ultrapura para um volume final de reação de 12,5 2 µL. Todas as reações foram realizadas em triplicata, sendo uma dessas utilizada como controle negativo da reação. As amostras foram submetidas à seguinte termociclagem: 50 °C por 2 min; 95 °C, por 10 min seguidos de 40 ciclos a 95 °C por 15 seg e 60 °C por 1 min. Ao final, eram considerados válidos apenas os resultados cuja reação apresentasse curva de dissociação com apenas um pico, referente à temperatura de *melting* do *primer* utilizado em cada reação.

Os resultados obtidos por meio da reação de qPCR foram analisados utilizando o programa *Sequence Detection System* (Applied Biosystems), que permite obter a curva de dissociação, a intensidade de fluorescência da

amostra, a cada ciclo da reação. A quantidade relativa de cópias foi obtida utilizando-se a fórmula: $2^{-\Delta \Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3.6 Análise estatística

Os dados numéricos foram expressos em média e desvio padrão. As médias encontradas entre os dois tempos do estudo foram comparadas por meio do teste “t” de Student e análise de variância (ANOVA), sendo adotado o valor alfa de 5%. O programa utilizado para tabulação e realização dos testes estatísticos foi o SPSS, versão 15.0.

3.7 Aspectos éticos

Para execução deste trabalho, foi obtido o Consentimento Livre e Esclarecido de cada participante do estudo em sua primeira etapa, obedecendo às normas do Conselho Nacional de Saúde contidas nas resoluções 196/96 e 257/97. Nas duas etapas, obteve-se aprovação do Comitê de Ética da UFPI (pareceres números 021/2005 e 039/2008).

4 RESULTADOS

Foram estudados 25 pacientes portadores de doença renal crônica, estágio 5, em programa de hemodiálise no período de 2005 a 2008, sendo que 48% (12) desses eram do sexo masculino e 52% (13), do sexo feminino. A média de idade foi de $53,32 \pm 16,13$ anos, com intervalo de 18-78 anos. Eram de baixa renda, com média de $1,88 \pm 0,92$ salários mínimo, variando de pacientes sem renda a pacientes com renda de cinco salários mínimos.

Quanto ao tempo de diálise, a média encontrada dos pacientes foi de $7,84 \pm 2,67$ anos, e variação de 4-16 anos. Considerando-se sete anos como ponto de corte entre alto e baixo tempo de diálise, 52% (13) dos pacientes tinham baixo tempo e 48%(12), alto tempo de diálise, conforme Tabela 1.

Considerando-se as características clínicas dos pacientes, avaliou-se a concentração média de hemoglobina obtendo-se um valor médio de $12,9 \pm 1,87$ g/dL com variação de 10,2 g/dL a 17,8 g/dL. Para avaliação do estado nutricional dos mesmos foi determinado o Índice de massa corpórea, identificando-se uma média de $22,39 \pm 2,5$ Kg/m² e intervalo de 18,3 Kg/m² a 26,75 Kg/m².

Tabela 1 – Perfil dos pacientes quanto ao sexo, idade, renda e características clínicas.

Características	Média	Varição
Idade (a) (média \pm desvio padrão)	53,32 \pm 16,13	18-78
Sexo		
Masculino (%)	52	
Feminino (%)	48	
Renda(salário mínimo)	1,88 \pm 0,92	0-5
Tempo de diálise em anos	7,84 \pm 2,67	4-16
Hemoglobina (g/dL)	12,9 \pm 1,87	10,2-17,8
Índice de massa corpórea (Kg/m ²)	22,39 \pm 2,5	18,3-26,75

4.1 Zinco plasmático

Realizou-se a dosagem de zinco plasmático nos pacientes no início do estudo (T0) e 3 anos após (T3), obtendo-se no tempo T0 uma concentração média de $71,77 \pm 6,49$ μ g/dL, com variação de 48,5 μ g/dL a 101,4 μ g/dL e, no tempo T3, uma média de $61,27 \pm 13,76$ μ g/dL, variando de 43,32 μ g/dL a 89,61

$\mu\text{g/dL}$. Aplicando o teste “t” de Student, observou-se que há diferença significativa entre as médias de zincemia plasmática encontradas nos dois períodos, conforme Tabela 2. Considerando-se o ponto de corte proposto por Gibson (1990) para hipozincemia plasmática inferior a $70 \mu\text{g/dL}$, encontrou-se que, no primeiro momento, 48% (12) dos pacientes apresentavam zinco plasmático baixo e 52% (13), concentração normal ou alta. No tempo T3, 76% (19) dos pacientes encontravam-se com zinco plasmático abaixo dos valores de normalidade e 24% (6), com zinco plasmático normal ou alto.

Tabela 2 – Média e desvio padrão das concentrações plasmáticas do zinco e proteína C reativa nos tempos T0 e T3

Tempo	Tempo 0	Tempo 3	Significância
Zinco plasmático ($\mu\text{g/dL}$)	71,77 \pm 16,48	61,27 \pm 13,76	p=0,025
Proteína C reativa (mg/dL)	0,24 \pm 0,26	0,23 \pm 0,14	p>0,05

4.2 Expressão gênica das proteínas transportadoras de zinco

Dos genes codificantes de proteínas transportadoras de zinco pertencentes à família Zip que tiveram sua expressão gênica avaliada (Zip 1, Zip 3, Zip 4 e Zip 14), o único que alterou sua expressão de forma significativa entre os dois tempos do estudo foi da Zip14 (Figura 1).

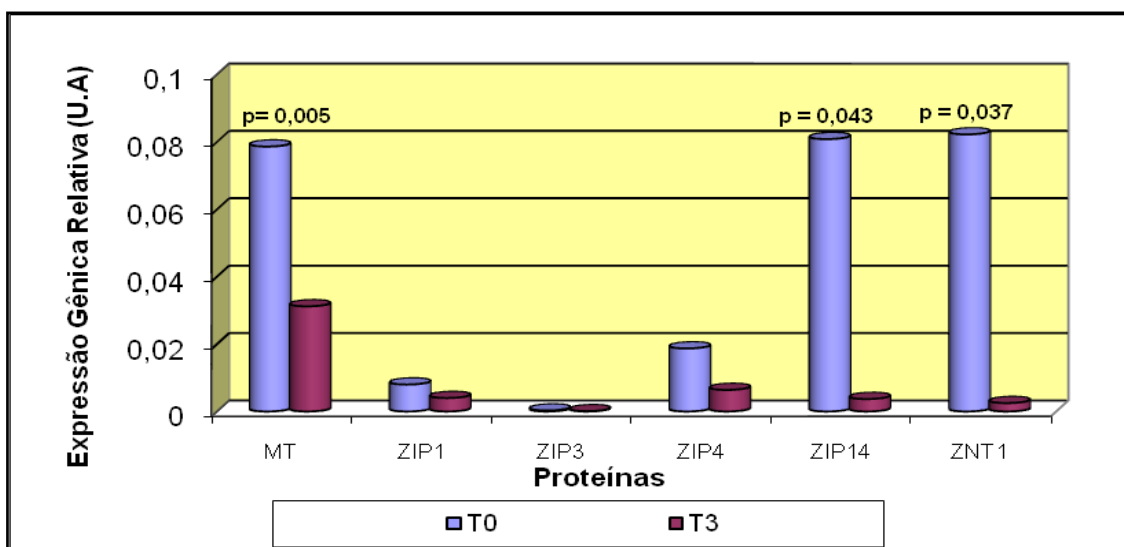


Figura 1 – Expressão de genes codificantes de proteínas transportadores de zinco no início do estudo e após 3 anos

A expressão do gene que codifica essa proteína diminuiu significativamente ($p < 0,05$) sua expressão entre os tempos T0 e T3. Quando se comparou a expressão deste gene com os níveis plasmáticos do zinco, o comportamento sugeriu que, no início do estudo, a expressão foi menor no grupo dos hipozincêmicos, situação que se inverteu no Tempo 3, quando a expressão foi maior nos pacientes desse grupo (Figura 2).

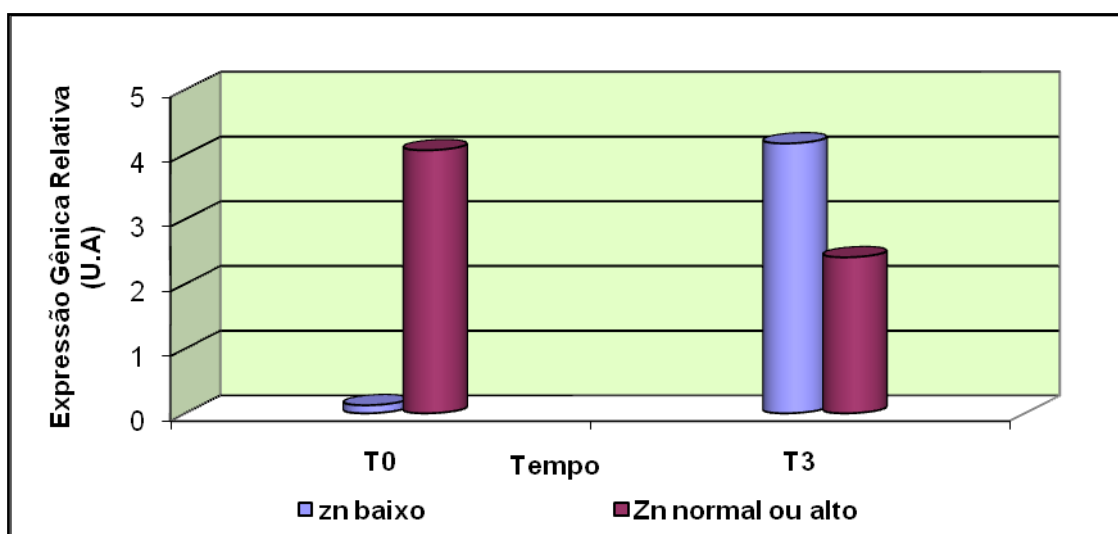


Figura 2 – Expressão do gene codificante da Zip 14 no início do estudo e 3 anos após, conforme os níveis de zinco dos pacientes

Em relação à expressão dos genes codificantes das outras proteínas pertencentes à família Zip que foram avaliadas neste estudo, Zip1, Zip3 e Zip4, observou-se que não houve diferença significativa entre os dois tempos da pesquisa, havendo uma queda na expressão dos genes codificantes de todas elas, entre os dois tempos do estudo, conforme Figura 1.

Dentre as proteínas da família ZnT, a única que teve a expressão do gene codificante analisado foi a ZnT1. Constatou-se, de forma semelhante ao verificado na expressão da família Zip, que a expressão do gene codificante da ZnT1 reduziu-se significativamente entre o início do estudo e os três anos após o mesmo ($p < 0,05$).

4.3 Proteína c reativa

A dosagem sérica da proteína C reativa foi realizada como forma de se determinar o estado inflamatório dos pacientes, sendo classificados como portadores de processo inflamatório aqueles com níveis superiores a 0,1 mg/dL.

Conforme Tabela 2, no início do estudo (T0), o nível médio de proteína C reativa foi de $0,24 \pm 0,26$ mg/dL, com variação de 0,01 mg/dL a 0,96 mg/dL, portanto, acima do ponto de corte preconizado para se determinar presença de inflamação. Após três anos (T3), a média e desvio padrão da proteína C reativa foram de $0,228 \pm 0,139$ mg/dL, variando de 0,024 mg/dL a 0,515 mg/dL. Com esses valores, verificou-se que a concentração média da proteína C reativa permaneceu superior ao ponto de corte que classifica a inflamação, nos dois períodos de tempo, não havendo diferença significativa entre as médias nestes dois momentos. Observou-se que no T0, 72% (18) dos pacientes se encontravam com níveis séricos de proteína C reativa acima do valor de referência que determina a presença de estado inflamatório, quadro que se manteve constante após 3 anos do achado inicial.

4.4 Expressão gênica da metalotioneína

Comparando-se os dois momentos do estudo, a expressão do gene codificante da metalotioneína se reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) entre os dois tempos avaliados, conforme Figura 1.

Dividindo-se os pacientes em grupos de hipozincêmicos e normozincêmicos, nos dois períodos de tempo, observou-se que a expressão do gene codificante da metalotioneína foi maior no grupo dos pacientes normozincêmicos, tanto no tempo inicial quanto três anos após, conforme Figura 3.

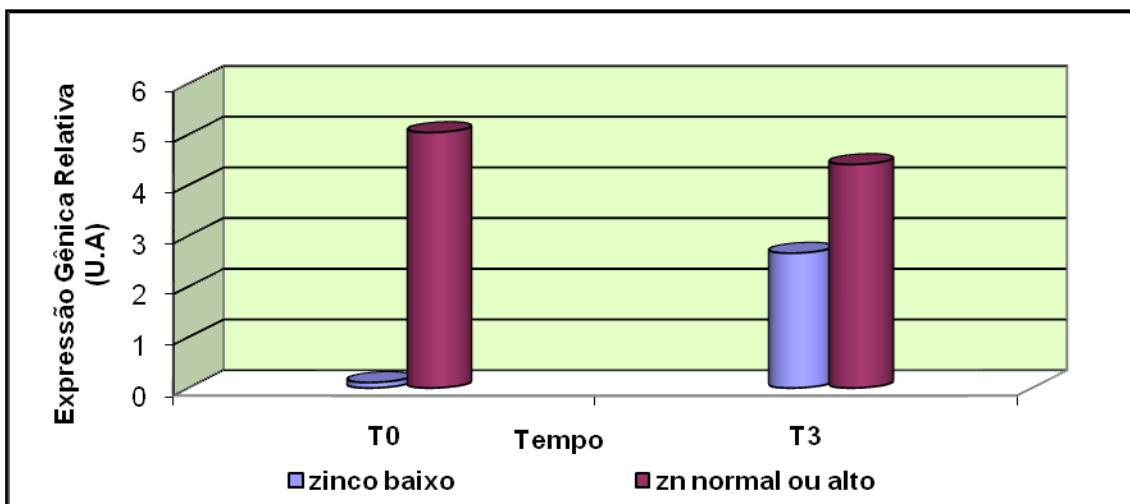


Figura 3 – Expressão do gene codificante da metalotioneína segundo a zincemia plasmática nos dois tempos do estudo

Analisando-se a expressão desta proteína em função da proteína C reativa, verificou-se que a expressão do gene codificante da metalotioneína foi maior nos pacientes com níveis elevados da referida proteína tanto no T0 quanto no T3.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, buscou-se descrever o comportamento da proteína C reativa, do zinco, de proteínas responsáveis pelo seu transporte e da metalotioneína em pacientes hemodialisados, em função do tempo de hemodiálise dos pacientes. Tendo em vista a ampla sintomatologia que causa prejuízos na qualidade de vida desses pacientes e a existência de estudos relacionando parte dessas alterações ao estado inflamatório crônico a que estes pacientes estão submetidos e a conseqüente hipozincemia que se desenvolve em tais situações. (ZIMA et al., 1999; KIZILTAS; EKIN; ERKOC, 2008).

Vários trabalhos documentam um estado de hipozincemia plasmática em pacientes submetidos à hemodiálise (CONDON; FREEMAN, 1970; MANSOURI, 1970; FUKUSHIMA et al., 2009; RASHIDI et al., 2009) e têm sugerido a suplementação de zinco como forma de minimizar as manifestações clínicas presentes nesta patologia (ATKIN-THOR et al., 1978; MAHAJAN, 1980; HO, 1984). Contudo, o conhecimento sobre o metabolismo desse mineral ainda é limitado.

Com relação às características relativas ao sexo e à renda familiar dos pacientes, o estudo mostrou proporção semelhante entre homens (52%) e mulheres (42%); resultado importante, tendo em vista a possível interferência do gênero no estado nutricional relativo ao zinco, devido a fatores hormonais (COZZOLINO, 2005), como por exemplo, as alterações na expressão da Zip1 provocadas pela testosterona (COSTELLO et al., 1999). A renda familiar é importante no acesso aos alimentos e, por conseguinte, no perfil nutricional. Dos 25 pacientes estudados, 24 apresentavam renda inferior a dois salários mínimo, tornando a amostra homogênea do ponto de vista socioeconômico e cultural, aproximando prováveis hábitos de vida e alimentares.

Os pacientes foram avaliados quanto à zincemia plasmática, aos níveis de proteína C reativa e à expressão do gene codificante da metalotioneína e das proteínas transportadoras de zinco ZnT1, ZiP1, ZiP3, ZiP4 e ZiP14, em dois tempos, no início do estudo – Tempo 0 (T0), e após três anos – Tempo 3 (T3).

Comparando-se os resultados das concentrações médias de zinco plasmático nos dois períodos de tempo, verificou-se diminuição nos valores de 73,09µg/dL no T0 para 61,27µg/dL no T3, com significância estatística ($p < 0,05$). Esses resultados são apoiados pelos estudos de Batista et al. (2006), que realizaram pesquisa mostrando que os níveis plasmáticos de zinco foram mais baixo em pacientes hemodialisados que nos controles, e Navarro et al. (2006), que avaliaram as concentrações plasmáticas de zinco e cobre séricos em 48 pacientes hemodialisados e encontraram uma média de zinco plasmático significativamente diminuída, quando comparados com 52 controles sadios. Mafra e Cozzolino (1999) realizaram trabalho dosando zinco plasmático em pacientes portadores de doença renal crônica e encontraram estado nutricional deficitário em relação a este elemento nos referidos pacientes.

Segundo revisão sistemática publicada recentemente por Tonelli (2009), que analisou 128 estudos, foi evidenciado que os níveis séricos de zinco são significativamente mais baixos em pacientes hemodialisados que nos controles. Com base nessas evidências, os resultados obtidos nesta pesquisa, cujos níveis plasmáticos de zinco dos pacientes hemodialisados encontram-se abaixo do ponto de corte proposto por Gibson (1990), caracterizando um estado de hipozincemia, são concordantes com a literatura consultada no que se refere a este parâmetro.

Dentre os fatores apontados pela literatura como responsáveis pela hipozincemia plasmática encontradas, têm-se a diminuição intestinal da absorção de zinco pelo trato gastrointestinal (CHEN et al. 2004), baixos níveis de albumina, aumento da excreção fecal e urinária (NAVARRO et al., 2006), além da ocorrência de uma redistribuição do zinco, que passaria do compartimento plasmático para o interior das células, devido à ação de fatores inflamatórios que estariam presentes e circulantes nesses pacientes (SMYTHE et al., 1982; KIMMEL et al., 1988)

As citocinas e interleucinas produzidas durante a resposta inflamatória, destacando-se neste contexto a Interleucina-6, induziriam a produção de metalotioneína pois, sendo um quelante intracelular de zinco, promoveria a compartimentalização do mineral, culminando com a hipozincemia plasmática (GABAY; KUSHNER, 1999).

Estudos têm demonstrado que 20-50% dos pacientes submetidos à hemodiálise apresentam estado inflamatório crônico (ZIMMERMANN et al., 1999; ISEKI et al., 1999; PANICHI et al., 2000; BAYES et al., 2003). Nesse estado, os pacientes apresentariam níveis séricos aumentados de proteínas de fase aguda e citocinas inflamatórias, podendo gerar consequências para os pacientes, como aceleração no processo de aterosclerose, aumento no risco de morbimortalidade cardiovascular e alterações nos níveis séricos de microelementos (YAO; LINDHOLM; STENVINKEL, 2004).

A reação inflamatória seria atribuída a elementos associados à própria doença renal e a fatores relacionados com o processo dialítico, como contaminação microbiológica dos fluidos utilizados na hemodiálise, produtos pirogênicos bacterianos que ultrapassariam as membranas de hemodiálise, contato do sangue com os materiais da circulação extracorpórea e processos infecciosos nos locais de punção (PEREIRA, 1995; STEFONI et al., 1998).

A proteína C reativa, marcador sistêmico de inflamação, tem-se mostrado um bom marcador de inflamação nos pacientes submetidos à hemodiálise (KANAAAN et al., 2008) e foi o parâmetro utilizado neste estudo para se determinar o estado inflamatório dos pacientes. Observou-se que, no início do estudo, o valor médio da concentração sérica dessa proteína de fase aguda era superior ao ponto de corte para classificar o indivíduo como inflamado, situação que persistiu após três anos do início do estudo. Estes resultados estão em consonância com a literatura, quando demonstra que os níveis de proteína C reativa encontram-se elevados no plasma de pacientes com doença renal crônica em hemodiálise (LIANG et al., 2003).

Relacionando-se os níveis séricos de proteína C reativa com as concentrações plasmáticas de zinco, encontrou-se uma relação inversa entre essas variáveis. Enquanto os níveis de proteína C reativa estiveram persistentemente elevados nos dois tempos do estudo, os níveis séricos do zinco plasmático diminuíram de forma significativa. Lin et al. (1992), estudando alterações na zincemia e na proteína C reativa em pacientes com traumatismo crânio encefálico, observaram que o zinco plasmático diminuiu suas concentrações enquanto os níveis de proteína C reativa estavam marcadamente elevados, na admissão dos pacientes, caracterizando uma relação inversa entre os valores de zincemia plasmática e de proteína C

reativa. Os dados até aqui obtidos estão em concordância com a literatura, mostrando que proteína C reativa e zincemia plasmática correlacionam-se negativamente.

Diante desses dados, fica evidente que os pacientes envolvidos neste estudo se encontravam em estado inflamatório, quadro compatível com os baixos níveis de zincemia plasmática identificados e com a provável ocorrência de compartimentalização do zinco nesses pacientes.

Avaliando-se a expressão do gene codificante da metalotioneína, observou-se que sua redução foi significativa entre os dois momentos do estudo. Dividindo-se os pacientes em dois grupos de acordo com os níveis de zinco plasmático em hipozincêmicos e normozincêmicos nos tempos T0 e T3, verificou-se que a expressão do gene codificante da metalotioneína foi maior no grupo dos pacientes normozincêmicos nos dois períodos. Este fato encontra apoio na literatura, quando esta demonstra que o gene codificante da metalotioneína aumenta sua expressão em resposta à suplementação de zinco (SULLIVAN; BURNETT; COUSINS, 1998).

Comparando-se a expressão da metalotioneína no T0 entre os pacientes com proteína C reativa normal e elevada, verificou-se que a expressão foi maior naqueles pacientes que possuíam proteína C reativa mais elevada, cujo resultado é amparado no fato de a expressão do gene codificante da metalotioneína ser induzida pela Interleucina-6, citocina presente em estados inflamatórios (DE; MCMASTER; ANDREWS, 1990; SCHROEDER; COUSINS, 1990; HUBER; COUSINS, 1993).

Por outro lado, analisando-se o comportamento da expressão do gene da metalotioneína entre T0 e T3, verifica-se redução significativa em sua expressão. O resultado encontrado pode ser atribuído à tentativa do organismo de manter a homeostase do zinco, devido à situação de hipozincemia identificado nos pacientes (AYDEMIR; BLANCHARD; COUSINS, 2005)

Com relação ao estudo da expressão dos genes codificantes das proteínas transportadoras de zinco pertencentes à família Zip, o gene codificante da proteína transportadora de zinco Zip14 se mostrou alterado entre os dois tempos do estudo, diminuindo de forma significativa a sua expressão ($p < 0,05$).

A literatura mostra que a Zip14 é a proteína transportadora de zinco que mais se altera frente a situações de inflamação, tendo sua expressão aumentada nessas circunstâncias (LIUZZI et al., 2005). Nesse estudo, observou-se uma redução na expressão do mRNA da Zip14. Sendo um importador de zinco, a Zip14 tem sua expressão aumentada em situações de carência do mineral. Diante da significativa diminuição na sua expressão, apesar da redução na zincemia plasmática, a influência de outras variáveis não controladas presentes na doença renal crônica podem ter contribuído para este resultado.

As outras proteínas transportadoras de zinco pertencentes à família Zip que tiveram a expressão de seus genes codificantes avaliados foram a Zip1, Zip3 e Zip4. A expressão de todos os genes codificantes reduziu-se entre os tempos T0 e T3 de forma não significativa. A literatura mostra que a Zip1 tem sua expressão diminuída em situações de aumento na oferta de zinco (CAO et al., 2001). Nesta pesquisa, a expressão do gene codificante da Zip1 mostrou-se reduzida, mesmo em situação de hipozincemia plasmática, não coincidindo com o descrito em trabalho já publicado. De acordo com outro estudo, esse fato pode ter ocorrido em virtude da Zip1 ser também regulada por outros fatores, como a prolactina e a testosterona, variáveis que não foram controladas neste estudo (COSTELLO et al, 1999).

De forma semelhante ao verificado no comportamento da expressão da Zip1, o gene codificante da Zip2 também teve sua expressão diminuída entre os dois tempos da pesquisa, de forma não significativa. Estudos sugerem que, em situação de diminuição dos níveis de zinco, ocorre aumento na expressão do gene que codifica esta proteína (CAO et al., 2001), fato contrário ao que se constatou nesta pesquisa, o que, mais uma vez, pode ser atribuído a variáveis que alteram a expressão desse gene e não foram controladas.

A outra proteína transportadora que teve a expressão do seu gene codificante avaliado foi a Zip4, uma das mais importantes transportadoras de zinco encontradas no intestino humano. Nesta pesquisa, observou-se uma redução não significativa na expressão do gene codificante dessa proteína, entre o início do estudo e três anos após. Como a Zip4 tem na alteração de sua localização na superfície dos enterócitos uma das principais formas de atuar na homeostase do zinco, modificações na expressão de seu gene codificante

podem não representar sua principal forma de responder a variações da zincemia plasmática, explicando a pouca alteração entre os dois tempos do estudo, apesar de mudanças significativas na zincemia plasmática.

Dos genes codificantes de proteínas transportadoras de zinco pertencentes à família ZnT, o único que teve sua expressão avaliada neste estudo foi o da ZnT1, tendo sido identificado uma diminuição significativa em sua expressão, entre os dois momentos do estudo.

O gene codificante da proteína ZnT1 é regulado pelo Fator Metal Responsivo-1, situada no citosol das células. Este fator liga-se ao zinco, torna-se ativo, passa ao núcleo da célula e liga-se à região metal responsiva dos genes, induzindo a transcrição do gene da ZnT1 (ANDREWS, 2001). A expressão do gene codificante da ZnT1 aumenta com a suplementação de zinco na dieta (AYDEMIR; BLANCHARD; COUSINS, 2006). Como verificou-se diminuição na zincemia plasmática dos pacientes, ocorreu uma redução significativa na expressão do RNAm da ZnT1, estando esta situação apoiada pela literatura consultada.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo realizado em pacientes portadores de doença renal crônica em hemodiálise revelou diminuição expressiva nas concentrações médias do zinco plasmático entre os dois períodos do estudo (T0 e T3), sugerindo que o tempo de hemodiálise e os agravos associados a este processo podem interferir no estado nutricional relativo ao mineral.

Concluiu-se, também, que os pacientes se apresentavam em estado inflamatório crônico, identificado pela elevada média das concentrações da proteína C reativa, que não se modificou, quando comparou-se esse biomarcador nos dois períodos do estudo.

A expressão de todos os genes codificantes de proteínas avaliados reduziram-se. Os genes da metalotioneína e da ZnT1 diminuíram de forma significativa, corroborando o estado hipozincêmico em que os pacientes encontravam-se. Por outro lado, o RNAm da Zip14 reduziu significativamente sua expressão, contrariamente ao esperado, diante do estado inflamatório e de hipozincemia dos pacientes, revelando a necessidade de novos estudos para avaliar a interferência de fatores não controlados que possam modificar a expressão dessas proteínas e, por conseguinte no metabolismo do zinco.

REFERÊNCIAS

- ACCHIARDO, S.; MOORE, L.; LATOUR, P. Malnutrition as the main factor in morbidity and mortality of hemodialysis patients. ***Kidney International Supplement***, v. 16, p. S199-S203, 1983.
- ACKLAND, M. L.; MICHALCZYK, A. Zinc deficiency and its inherited disorders- a review. ***Genes & Nutrition***, v. 1, n. 1, p. 41-49, 2006.
- 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.
- ANDREINI, C. et al. Counting the Zinc-Proteins Encoded in the Human genome. ***Journal of Proteomic Research***, v. 5, p. 196-201, 2006.
- ANDREWS, G. K. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. ***Biochemical Pharmacology***, v. 59, p. 95-104, 2000.
- ANDREWS, G. K. Cellular zinc sensors: MTF-1 regulation of gene expression. ***Biometals***, v. 14, p. 223-237, 2001.
- ATKIN-THOR, E. et al. Hypogeusia and zinc depletion in chronic dialysis patients. ***American Journal of Clinical Nutrition***, v. 31, p. 1948-1951, 1978.
- AYDEMIR, T. B.; BLANCHARD, R. K.; COUSINS, R. J. Zinc supplementation of young men alters metallothionein, zinc transporter, and cytokine gene expression in leukocyte populations. ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, v. 103, n. 6, p. 1699-1704, 2005.
- BATISTA, M. N. et al. Effect of end-stage renal disease and diabetes zinc and copper status. ***Biological Trace Element Research***, v. 112, n. 1, p. 1-12, 2006.
- BAYES, B. et al. Homocysteine, C-reactive protein, lipid peroxidation and mortality in haemodialysis patients. ***Nephrology Dialysis Transplantation***, v. 18, n. 1, p. 106-112, 2003.
- BERG, J. M.; SHI, Y. The galvanization of Biology: a growing appreciation for the roles of Zinc. ***Science***, v. 271, n. 5252, p. 1081-1085, 1996.
- BERGSTROM, J. Mechanisms of uremic suppression of appetite. ***Journal of Renal Nutrition***, v. 9, n. 3, p. 129-132, 1999.
- BRAY T. M.; BETTER W. J. The role of zinc as an antioxidant. ***Free Radical Biology & Medicine***, v. 8, p. 281-291, 1990.
- BRENNER, B. M.; LAZARUS, J. M. Insuficiência renal crônica. In: WILSON, J. D.; BRAUNWALD, E. (Eds.). ***Medicina interna***. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p. 20-26. v. 8.

CABRAL, P. C.; DINIZ, A. S. Alterações metabólicas e funcionais do zinco em pacientes com insuficiência renal crônica. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 18, n. 1, p. 31-36, 2003.

CAO, J. et al. Effects of intracellular zinc depletion on metallothionein and ZIP2 transporter expression and apoptosis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 70, p. 559-566, 2001.

CHEN, S. M. et al. Intestinal absorption and biliary secretion of zinc in rats with chronic renal failure. **Nephron Physiology**, v. 96, p. 113-120, 2004.

CHIMIENTI, F. et al. Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8 localized into insulin secretory granules. **Diabetes**, v. 53, n. 9, p. 2330-2337, 2004.

CHIMIENTI, F. et al. In vivo expression and functional characterization of the zinc transporter ZnT8 in glucose-induced insulin secretion. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. 20, p. 4199-4206, 2006.

COLE, T. B. et al. Seizures and neuronal damage in mice lacking vesicular zinc. **Epilepsy Research**, v. 39, p. 153-169, 2000.

CONDON, C. J.; FREEMAN, R. M. Zinc Metabolism in Renal Failure. **Annals of Internal Medicine**, v. 73, p. 531-536, 1970.

COSTELLO, L. C. et al. Evidence for a Zinc Uptake Transporter in Human Prostate Cancer Cells Which Is Regulated by Prolactin and Testosterone. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 25, p. 17499-17504, 1999.

COUSINS, R. J.; McMAHON, R. J. Integrative Aspects of Zinc Transporters. **Journal of Nutrition**, v. 130, n. 5S, p. 1384S-1387S, 2000.

COUSINS, R. J. et al. A global view of the selectivity of zinc deprivation and excess on genes expressed in human THP-1 mononuclear cells. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 100, p. 6952-6957, 2003.

COUSINS, J. R.; LIUZZI, J. P.; LICHTEN, L. A. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 34, p. 24085-24089, 2006.

COZZOLINO, S. M. F. Zinco. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 1. ed. São Paulo: Manole, 2005.

CVIJANOVICH, N. Z. et al. Zinc homeostasis in pediatric critical illness. **Pediatric Critical Care Medicine**, v. 10, n. 1, p. 29-34, 2009.

DANSCHER, G. et al. Immunocytochemical localization of zinc transporter 3 in the ependyma of the mouse spinal cord. **Neuroscience Letters**, v. 342, p. 81-84, 2003.

DE, S. K.; MCMASTER, M. T.; ANDREWS, G. K. Endotoxin induction of murine metallothionein gene expression. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 15267-15274, 1990.

DESOUKI, M. M. et al. hZip2 and hZip3 zinc transporters are down regulated in human prostate adenocarcinomatous glands. **Molecular Cancer**, v. 6, p. 37, 2007.

DVERGSTEN, C. L. et al. Alterations in the postnatal development of the cerebellar cortex due to zinc deficiency. Impaired acquisition of granule cells. **Brain Res**, v. 271, p. 271-226, 1993.

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

FILTEAU, S. M.; TOMKINS, A. M. Micronutrients and tropical infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, p. 1-3, 1994.

FOOD AND NUTRITION BOARD. **Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc**. Washington: National Academy of Sciences, 2001.

FRANKLIN, R. B. et al. hZIP1 zinc uptake transporter down regulation and zinc depletion in prostate cancer. **Molecular Cancer**, v. 4, p. 32-44, 2005.

FUKUSHIMA, T. et al. Zinc deficiency anemia and effects of zinc therapy in maintenance hemodialysis patients. **Therapeutic Apheresis and Dialysis**, v. 13, n. 3, p. 213-219, 2009.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 6, p. 448-454, 1999.

GAITHER, L. A.; EIDE, D. J. Eukaryotic zinc transporters and their regulation. **Biometals**, v. 14, p. 251-270, 2001.

_____. The Human ZIP1 Transporter Mediates Zinc Uptake in Human K562 Erythroleukemia cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 25, p. 22258-22264, 2001.

GIBSON, R. S. Assessment of zinc status. In: _____. **Principles of nutritional assessment**. New York: Oxford, 1990. p. 542-553.

HO, E.; COURTEMANCHE, C.; AMES, B. N. Zinc deficiency induces oxidative DNA damage and increases P53 expression in human lung fibroblasts. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 8, p. 2543-2548, 2003.

HUBER, K. L.; COUSINS, R. J. Metallothionein expression in rat bone marrow is dependent on dietary zinc but not dependent on interleukin-1 or interleukin-6. **The Journal of Nutrition**, v. 123, p. 642-648, 1993.

HUANG, L. The Zip7 gene (Slc39a7) encodes a zinc transporter involved in zinc homeostasis of the Golgi apparatus. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 15, p. 15456-15463, 2005.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo, [s.n], 1985. 533p.

ISEKI, K. et al. Serum CRP and risk of death in chronic dialysis patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 14, p. 1956-1960, 1999.

KAPUT, J. Developing the promise of nutrigenomics through complete science and international collaborations. **Forum of Nutrition**, v. 60, p. 209-223, 2007.

KAMBE, T. et al. Cloning and characterization of a novel Mammalian Zinc transporter, Zinc Transporter 5, abundantly expressed in pancreatic β cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, Issue 21, p. 19049-19055, 2002.

KANAAN, N. et al. CRP measurement: does the assay matter in hemodialysis patients? **Clinical Nephrology**, v. 70, n. 6, p. 503-507, 2008.

KELLEHER, S. L.; LONNERDAL, B. Zinc Transportes in the rat Mammary Gland Respond to Marginal Zinc and Vitamin A Intakes during Lactation. **Journal of Nutrition**, v. 132, p. 3280-3285, 2002.

KIMMEL, P. L. et al. Zinc balance in combined zinc deficiency and uremia. **Kidney International**, v. 33, p. 1091-1099, 1988.

KING J. C. et al. Effect of acute zinc depletion on zinc homeostasis and plasma zinc kinetics in men. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 116-124, 2001.

KIZILTAS, H.; EKIN, S.; ERKOC, R. Trace elements status of chronic renal patients undergoing hemodialysis. **Biological Trace Element Research**, v. 124, p. 103-109, 2008.

KOH, J. Y. et al. The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. **Science**, v. 272, p. 1013- 1016, 1996.

KOURY, J. C. **Estado antioxidante cobre-zinco dependente em atletas de elite de diferentes modalidades esportivas**. 2004. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

LIANG, M. et al. Inflammatory status in patients with end-stage renal disease: role of monocyte activation. **Di yi jun yi da xue xue bao**, v. 23, n. 8, p. 781-784, 2003.

LICHTEN, L. A.; LIUZZI, J. P.; COUSINS, R. J. Interleukin-1 β contributes via nitric oxide to the upregulation and functional activity of the zinc transporter Zip14 (Slc39a14) in murine hepatocytes. **American Journal Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 296 p. 860-867, 2009.

LIN, C. N. et al. Assessments of nutritional status and immunological responses in head trauma: alterations in zinc and C-reactive protein. **Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi**, v. 8, n. 4, p. 195-201, 1992.

LIUZZI, J. P.; BLANCHARD, R. K.; COUSINS, R. J. Differential regulation of zinc transporter 1, 2 and 4 mRNA expression by dietary zinc in rats. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 46-52, 2001.

LIUZZI, J. P.; COUSINS, R. J. Mammalian zinc transporters. **Annual Review of Nutrition**, v. 24, p. 151-172, 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.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOVELL, M. A.; SMITH, J. L.; MARKESBERY, W. R. Elevated zinc transporter-6 in mild cognitive impairment, Alzheimer disease, and pick disease. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 65, n. 5, p. 489-498, May 2006.

LOWE, N. M.; FEKETE, K; DESCII, T. Methods of assessment of zinc status in humans: a systematic review. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, Supplement, 1S-12S, 2009.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S. M. F. Avaliação do estado nutricional relativo ao zinco em pacientes com insuficiência renal crônica [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 1999.

MAHAJAN, S. K. Improvement of uremic hypogeusia by zinc: a double-blind study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 33, n. 7, p. 1517-1521, 1980.

MARCKMANN P. Nutritional status and mortality of patients in regular dialysis therapy. **Journal of International Medicine**, v. 226, n. 6, p. 429-432, 1989.

MARGOSHES, M.; VALLE, B. L. A cadmium protein from equine kidney cortex. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 79, p. 4813-4814, 1957.

MATHEWS, W. R. et al. Zinc transport activity of Fear of Intimacy is essential for proper gonad morphogenesis and DE-cadherin expression. **Development**, v. 133, p. 1143-1153, 2006.

McCORMICK, C. C.; MENARD, M. P.; COUSINS, R. J. Induction of hepatic metallothionein by feeding zinc to rats of depleted zinc status. **American Journal Physiology**, v. 240, p. E414-E421, 1981.

McMAHON, R. J.; COUSINS, R. J. Regulation of the zinc transporter ZnT-1 by dietary zinc. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 4841-4846, 1998.

MENDES, V. et al. Zincemia em pacientes cronicamente hemodialisados. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, v. 4315, p. 225-227, 1988.

MILON, B. et al. Differential subcellular localization of hZip1 in adherent and nonadherent cells. **FEBS Letters**, v. 507, p. 241-246, 2001.

MOSHAGE, H. Cytokines and the hepatic acute phase response. **The Journal of Pathology**, v. 181, p. 257-266.

MULLER, M.; KERSTEN, S. Nutrigenomics: goals and strategies. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, p. 315-322, 2003.

NAVARRO, A. et al. Longitudinal study of serum zinc and copper levels in hemodialysis patients and their relation to biochemical markers. **Biological Trace Element Research**, v. 113, n. 3, p. 209-222, 2006.

NISHIDA, K. et al. Zinc transporter Znt5/Slc30a5 is required for the mast cell-mediated delayed-type allergic reaction but not the immediate-type reaction. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 6, p. 1351-1364, June 2009.

OE, P. L. et al. The clinical relevance of trace element deficiencies in patients on hemodialysis. In: ATSUMI, K.; MAEKAWA, M.; OTA, K. (Eds.). **Progress in Artificial Organs**. Cleveland: ISAO Press, 1984. p. 481-486.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Elementos traço na nutrição e saúde humana**. São Paulo: Roca, 1998. p. 63-91.

PALMITER, R. D.; FINDLEY, S. D. Crosstalk of the group IIa and IIb metals calcium and zinc in cellular signaling. **The EMBO Journal**, v. 14, p. 639-649, 1995.

PALMITER, R. D.; HUANG, L. Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. **Pflügers Archiv**, v. 447, n. 5, p. 744-751, 2004.

PANICHI, V. et al. The link of biocompatibility to cytokine production. **Kidney International**, v. 76, Supplement, p. S96-S103, 2000.

PAULSEN, I. T.; SAIER JR., M. H. A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. **The Journal of Membrane Biology**, v. 156, p. 99-103, 1997.

PEREIRA, B. J. Cytokine production in patients on dialysis. **Blood Purification.**, v. 13, n. 3-4, p. 135-146, 1995.

PHILCOX, J. C. et al. Endotoxin-induced inflammation does not cause hepatic zinc accumulation in mice lacking metallothionein gene expression. *The Biochemical Journal*, v. 308, p. 543-546, 1995.

PILETZ, J. E.; GANSCHOW, R. E. Zinc deficiency in murine milk underlies of the lethal milk (Im) mutation mutation. **Science**, v. 199, n. 4325, p. 181-183, 1978.

POOLE, S. et al. Fate of injected interleukin 1 in rats: sequestration and degradation in the kidney. **Cytokine**, v. 2, n. 6, p. 416-422, 1990.

POUND, L. D. et al. Deletion of the mouse Slc30a8 gene encoding zinc transporter-8 results in impaired insulin secretion. **The Biochemical Journal**, v. 421, n. 3, p. 371-376, 2009.

RASHIDI, A. A. et al. Effects of Zinc Supplementation on serum Zinc and C-Reactive Protein Concentrations in Hemodialysis Patients. **Journal of Renal Nutrition**, July 16th 2009 [Epub ahead of print].

RODRIGUEZ, M. P.; NARIZANO, A.; CID, A. A simpler method for the determination of zinc human plasma levels by flame atomic absorption spectrophotometry. **Atomicspectroscopy**. Norwalk, v. 10, n. 2, p.69-70, 1989.

ROMÃO JUNIOR, J. E. Doença Renal Crônica: definição, epidemiologia e classificação. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 26, Suplemento 1, p. 1-3, 2004.

SALGUEIRO, M. J. et al. Zinc as an essential micronutrient: a review. **Nutrition Research**, New York, v. 20, n. 5, p. 737-755, 2000.

SANDSTEAD, H. H.; SMITH, J. C. Deliberations and evaluations of approaches, endpoints and paradigms for determining zinc dietary recommendations. **The Journal of Nutrition**, v. 126, n. 24, 10S-18S, 1996.

SANDSTRÖM, B. Bioavailability of zinc. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 51 Supplement 1, S17-S19, 1997.

SATO, M. Biological antioxidant defense system and metallothionein. **Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 38, p. 228-239, 1992.

SATO, M.; KONDOH, M. Recent studies on Metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and Oxygen free radicals. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 196, p. 9-22, 2002.

SEKLER, I. et al. Mechanism and Regulation of cellular Zinc Transport. **Molecular Medicine**, v. 13, n. 7-8, p. 337-343, 2007.

SETHI, D. et al. C-reactive protein in haemodialysis patients with dialysis arthropathy. ***Nephrology Dialysis Transplantation***, v. 3, n. 3, p. 269-271, 1988.

SIM, D. L.; CHOW, V. T. The novel human HUEL (C4orf1) gene maps to chromosome 4p12-p13 and encodes a nuclear protein contain the nuclear receptor interaction motif. ***Genomics***, v. 59, n. 2, p. 224-233, 1999.

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

SMYTHE, W. R. et al. Trace element abnormalities in chronic uremia. ***Annals of Internal Medicine***, v. 96, n. 3, p. 302-310, 1982.

SONG, Y. et al. Zinc deficiency effects DNA damage, oxidative stress, antioxidant defenses, and DNA repair in rats. ***The Journal of Nutrition***, July 22th, 2009.

STEFONI, S. Clinical biology of artificial organ substitution. ***Nephrology Dialysis Transplantation***, v. 13, Supplement 7, p. 51-54, 1998.

SCHROEDER, J. J.; COUSINS, R. J. Interleukin 6 regulates metallothionein gene expression and zinc metabolism in hepatocyte monolayer cultures. ***Proceedings of The National Academy of Sciences***, v. 87, p. 3137-3141, 1990.

SULLIVAN, V. K.; BURNETT, F. R.; COUSINS, R. J. Methallothionein expression is increased in monocytes and erythrocytes of young men during zinc supplementation. ***Journal of Nutrition***, v. 128, p. 707-713, 1998.

SUZUKI, T. et al. Zinc transporters, ZnT5 and ZnT7, are required for the activation of alkaline phosphatases, zinc-requiring enzymes that are glycosylphosphatidylinositol-anchored to the cytoplasmic membrane. ***The Journal of Biological Chemistry***, v. 280, n. 1, p. 637-643, 2005.

TAYLOR, K. M. LIV-1 Breast Cancer Protein Belongs to New Family of Histidine-Rich Membrane Proteins with Potential to Control Intracellular Zn²⁺ Homeostasis. ***IUBMB Life***, v. 49, p. 249-253, 2000.

THOMPSON, S. G. et al. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. ***The New England Journal of Medicine***, v. 332, p. 635-641, 1995.

TONELLI, M. et al. Trace elements in hemodialysis patients: a systematic review and meta-analysis. ***BMC Medicine***, v. 7, p. 25, 2009.

TSUDA, M. et al. The Role of Zinc in Selective Neuronal Death After Transient Global Cerebral Ischemia. ***The Journal of Neuroscience***, v. 17, p. 6678-6684, 1997.

VALLE, B. L.; FALCHUK, K. H. The biochemical basis of zinc physiology. **Physiological reviews**, v. 73, p. 79-118, 1993.

VASTO, S. et al. Inflammation, genes and zinc in ageing and age-related disease. **Biogerontology**, v. 24, p. 315-327, 2006.

VIDT, D. G. Inflammation in Renal Disease. **The American Journal of Cardiology**, v. 97, p. 20A-27A, 2006.

WANG, K. et al. A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica. **The American Journal of Human Genetics**, v. 71, p. 66-73, 2002.

WANG, F. et al. Zinc-stimulated endocytosis controls activity of the mouse ZIP1 and ZIP3 zinc uptake transporters. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 23, p. 24631-24639, 2004.

WHITAKER, P. Iron and zinc interactions in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p. 442S-446S, 1998.

WIERINGA, F. T. et al. Estimation of the effect of the Acute Phase Response on Indicators of Micronutrient Status in Indonesian Infants. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 10, p. 3061-3066, 2002.

YAO, Q.; LINDHOLM, B.; STENVINKEL, P. Inflammation as cause of malnutrition, atherosclerotic cardiovascular disease, and poor outcome in hemodialysis patients. **Hemodialysis International**, v. 8, p. 118-129, 2004.

YUYAMA, L. K. et al. Zinco. In: COZZOLINO, S. M. F. (Org). **Biodisponibilidade de nutrientes**. São Paulo: Manole, p. 513-538, 2005.

ZIMA, T. et al. Trace elements in end-stage renal disease 2. Clinical implication of trace elements. **Blood Purification**, v. 17, n. 4, p. 187-198, 1999.

ZIMMERMANN, J. et al. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. **Kidney International**, v. 55, n. 2, p. 648-658, 1999.

ZEISEL, S. H. Nutrigenomics and metabolomics will change clinical nutrition and public health practice: insights from studies on dietary requirements for choline. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 86, p. 542-548, 2007.