

Taciana Davanço

***DOENÇA DE CROHN: EFEITO DE UM CONCENTRADO DE
PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE BOVINO ENRIQUECIDO
COM TGF- β NA NUTRIÇÃO E INFLAMAÇÃO DE PACIENTES
SOB TERAPIA COM IMUNOSSUPRESSOR.***

Orientadora: Prof^a Dr^a. Elizete Ap. Lomazi da Costa Pinto

Co-orientadora: Prof^a Dr^a. Maria Marluce dos Santos Vilela

Campinas

2011



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Ciências Médicas

Taciana Davanço

***DOENÇA DE CROHN: EFEITO DE UM CONCENTRADO DE
PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE BOVINO ENRIQUECIDO
COM TGF- β NA NUTRIÇÃO E INFLAMAÇÃO DE PACIENTES
SOB TERAPIA COM IMUNOSSUPRESSOR.***

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente, na área de concentração Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Elizete Ap. Lomazi da Costa Pinto
Co-orientadora: Prof^a Dr^a. Maria Marluce dos Santos Vilela

Campinas

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA

BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecária: Rosana Evangelista Poderoso – CRB-8ª / 6652

D271d Davanço, Taciana
Doença de Crohn: efeito de um concentrado de proteínas do soro de leite bovino enriquecido com tgf- β na nutrição e inflamação de pacientes sob terapia com imunossupressor. / Taciana Davanço. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Elizete Aparecida Lomazi da Costa Pinto
Co-orientador: Maria Marluce dos Santos Vilela
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Crohn, Doença de. 2. Estado nutricional. 3. Azatioprina. 4. Infliximab. 5. Suplemento alimentar. I. Da-Costa-Pinto, Elizete Aparecida Lomazi. II. Vilela, Maria Marluce dos Santos. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título

Título em Inglês: Crohn's disease: Effect of a concentrated whey protein enriched with TGF- β in nutrition and inflammation in patients under immunosuppressive therapy

Keywords: • Crohn's, Disease
• Nutritional status
• Azathioprine
• Infliximab
• Supplementation

Titulação: Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente

Área de Concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Banca examinadora:

Prof. Dr. Elizete Aparecida Lomazi da Costa-Pinto

Prof. Dr. Maria Teresa Bertoldo Pacheco

Prof. Dr. Vânia Aparecida Leandro Merhi

Prof. Dr. Luciano Bruno de Carvalho Silva

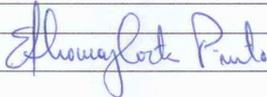
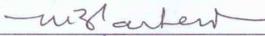
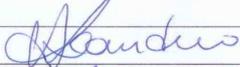
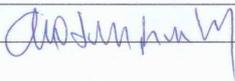
Prof. Dr. Cláudio Saddy Rodrigues Coy

Data da defesa: 25.02.2011

Banca Examinadora de Tese de Doutorado

Aluna Taciana Davanço

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Elizete Aparecida Lomazi da Costa Pinto

Membros:	
Professor (a) Doutor (a) Elizete Aparecida Lomazi da Costa Pinto	
Professor (a) Doutor (a) Maria Teresa Bertoldo Pacheco	
Professor (a) Doutor (a) Vânia Aparecida Leandro Merhi	
Professor (a) Doutor (a) Luciano Bruno de Carvalho Silva	
Professor (a) Doutor (a) Cláudio Saddy Rodrigues Coy	

Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 25/02/2011

Dedicatória

Aos meus pais, Gercino Davanço (em memória) e Diomar, com muito amor e carinho. O amor, gratidão e admiração que tenho por eles é infinita...

“É o amor que adorna a natureza com suas ricas alfombras; ele se enfeita e fixa sua morada onde encontra flores e perfumes. É ainda o amor que traz paz aos homens, a calma ao mar, o silêncio aos ventos e o sossego à dor.”

(O Evangelho segundo o espiritismo- Allan Kardec)

Agradecimentos

A Deus, por me dar força e saúde, para que eu concluísse esta obra, estando presente em todos os dias de minha vida, me enchendo de amor, coragem e ensinamentos a cada dia...sendo paciente e compreensivo com meus defeitos e me dando uma nova oportunidade a cada amanhecer...

A minha orientadora, Dra. Elizete Ap. Lomazi da Costa Pinto, pelo carinho, atenção, dedicação e pela oportunidade oferecida para realizar esta tese, pela sempre disponibilidade para discutir os dados, pela confiança e paciência em saber contornar todos os obstáculos que passei na vida pessoal e, por sempre me encorajar a continuar e não desistir .

A minha co-orientadora, Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela, pelo carinho, por ter me aceitado e me acolhido em seu Laboratório de Imunologia, no Centro de Investigação em Pediatria – CIPEd FCM UNICAMP, pela ajuda, apoio durante a realização do trabalho e compreensão com meus desafios pessoais.

À equipe de médicos e residentes do Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais do Gastrocentro-UNICAMP, em especial, Dr. Cláudio Coy, Dra. Raquel Leal, Dra. Maria de Lourdes Setsuko Ayrizono e Dr. João José Fagundes.

Ao Prof. Dr. Marcos Tadeu Nolasco da Silva, pela ajuda nos ensaios de citometria.

Aos professores Dr. Luciano e Dra Maria Angela, pelas valiosas contribuições no exame de qualificação.

A Simone Cristina Ferreira, Milton César Souza, Tathyanne Krahenbuhl, Valmir e toda equipe do CIPEd, pelo convívio e ajuda.

Aos integrantes do Laboratório de Imunologia do CIPEd, pela amizade e colaboração. A Simone, Flávia, Michele e Taís, por terem me recebido no laboratório e pela paciência para ensinar a rotina de experimentos. A Vanessa

Ramalho, Beatriz e Daniela, pela companhia durante as atividades. A Carol, pela ajuda e pelas conversas descontraídas nos momentos de pausa.

Aos amigos e vizinhos de laboratório no CIPEd, pela alegre convivência, por colaborarem em tudo que precisei, pelas conversas filosóficas de apoio e coragem, pelos momentos inesquecíveis de descontração e alegria, enfim, por sempre estarem disponíveis a ajudar em tudo que precisei: Caruzinha, Edgard, Mateu, Marília, Jussara, Vinícius, Marcelo e Paulinha. Vocês são demais!

A Vanessa Oya, pela companhia em todas as manhãs de quintas-feiras no ambulatório de DII...

A minha querida amiga Silvana, por toda a amizade e apoio durante o trabalho e imprescindível ajuda na coleta de sangue dos pacientes.

A minha querida amiga Cristiana, amiga de todas as horas, que me acolheu e me acolhe sempre que necessito de um ombro amigo e de uma boa risada ou um desabafo. Amiga, você é muito especial... obrigada por fazer parte da minha vida...

Aos amigos e vizinhos de “kjt”, em especial Caio e Mariana, pelos intermináveis questionamentos filosóficos sobre vida, justiça, humildade, honestidade e amizade verdadeira, a querida Fabíola que, com todo seu companheirismo e sua graça, sempre dava um jeito de nos fazer “rir”, apesar de todos os pesares.

A minha amiga e irmã postiça “neusa” Renatinha Mukai, que desde que cheguei a Campinas, esteve presente, fazendo parte de todos os momentos, bons, maus, engraçados, complicados... sempre pronta a tudo e a qualquer fato: amiga, irmã, mãe, filha, anjo, aventureira e maluca...sempre...Renatinha...

Aos meus amigos de infância e da vida inteira: Rulinho e Herika que, por coincidência ou não, destino ou lei de atração, vieram diretamente de Votuporanga parar em Campinas comigo e, “mais uma vez”... juntos...

Agradeço a Deus todos os dias por fazerem parte da minha vida, sendo diretamente responsáveis por muito do que fui e sou. Amo vocês...

A querida Daisy, companheira de ambulatório e adoráveis concertos, sempre tinha uma palavra de conforto e otimismo a todos, alegrando sempre as quintas-feiras.

Ao querido Prof. Dr. Sgarbieri, pela ajuda, colaboração e incentivo no meu trabalho. Destacando a companhia agradável e carinhosa dele e de sua esposa Astrid durante o congresso de Nutrição em Barcelona.

A amiga Beatriz Mariana Abramczuk, meu anjo da guarda terrestre, que esteve comigo durante todo o período do Doutorado. Pessoa admirável, companheira, conselheira, amiga, fiel, honesta, brava “às vezes”, exemplo de vida... Amiga dentro e fora da Unicamp. Fundamental para que eu concluísse este trabalho.

A Vanessinha Ramalho, querida e adorável, paciente e amiga. Muito obrigada por TUDO...

Ao Bruno, amigo de toda a vida, que sempre esteve do meu lado me acolhendo, apoiando e incentivando, apesar de todas minhas neuras e defeitos. Nem sei o que seria da minha vida sem você, sem seu carinho, sem seu amor e sua amizade... Amo você!

A querida amiga Karina, pelo apoio, paciência e ajuda fundamental durante a elaboração da parte sensorial deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso, mais que um Orientador de Mestrado, um orientador de vida e “paizão”.

Aos amigos do DEPAN: Fatiminha, Chico, Susaninha, Cidinha e Lia, que entraram em minha vida durante meu Mestrado e continuam cuidando de mim com muito carinho e paciência até hoje... Muitoobrigada...

As funcionárias Cidinha e Vilma, que sempre me recebiam com um “BOM DIA” radiante, todas as manhãs...

Ao amigo e personal “fit floor” Ricardinho, que de uma maneira brilhante e discreta conseguia transformar meus problemas em grandes “risadas”.

A minha terapeuta Valéria, que participou ativamente de todos os altos e baixos que vivi, sempre me orientando e fazendo eu enxergar uma “luz ao final do túnel”, por mais sombrio e nebuloso que tudo parecesse....

À querida amiga Márcia, companheira neste último ano de Doutorado, que me recebeu com muito carinho, alegria e sábios conselhos.

Às amadas amigas Joelma e Sandra, sempre cuidando de mim e me enchendo de ensinamentos e conselhos, com muita paciência e compreensão.

Ao querido amigo Rodrigo Medina, pelas conversas maravilhosas e por seus sábios ensinamentos, sempre baseados no amor e na verdade...

A VI Turma do GEAE, pelo carinho, companheirismo... sempre vibrando e torcendo para que tudo desse certo em minha vida...

Ao meu amado irmão Denizart, por seu amor, admiração, respeito e cumplicidade depositados a mim. Pela bela lição de vida, me mostrando a cada dia sua superação e crescimento, acompanhados do seu coração bondoso, humilde e amoroso.

Aos pacientes... pessoas lindas, especiais, cada um com sua história... fazendo com que a história do meu Doutorado se tornasse realidade... Fundamentais para o progresso da ciência. Transbordantes de alegrias e esperanças... Homens e mulheres cheios de amor e fé... Possibilitando a todos um futuro melhor... Aprendi muito com todos e, quero compartilhar nesta Tese, um verso que recebi de um desses Pacientes, que me fez refletir ... “A vida é um constante aprendizado...”.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito. Eu permito a todos serem como quiserem, e a mim como devo ser. Tudo tem seu apogeu e seu declínio... É natural que seja assim, todavia, quando tudo parece convergir para o que supomos o nada, eis que a vida ressurge, triunfante e bela!... Novas folhas, novas flores, na infinita benção do recomeço! ”

(Francisco Cândido Xavier)

E a todos os amigos e companheiros, que se fosse citar nominalmente, ocupariam mais algumas páginas dessa Tese e, que de uma forma direta ou indireta, contribuíram para torná-la possível. O meu muito obrigada...

Ao CNPQ e Fapesp, pelo apoio financeiro.

Epígrafe

"O sol está dentro de cada um. Sorrir e acreditar em si é o caminho para alcançar a luz e o brilho que irradia da própria existência e acalenta a crença em nós mesmos. Acreditemos no próprio sol, ele mora no "eu" e ilumina o tudo e o todo. A gargalhada é o sol que varre o inverno do rosto humano. (Victor Hugo)

Sumário

Sumário	1
Lista de tabelas	3
Lista de figuras	4
Lista de abreviaturas e siglas	6
Resumo	9
Abstract	13
1. Introdução	17
2. Revisão Bibliográfica	21
2.1. Doença de Crohn.....	21
2.2. Avaliação nutricional na Doença de Crohn	23
2.3. Proteínas do soro de leite bovino.....	24
2.4. Fator transformador de crescimento beta (TGF- β)	27
2.5. Sistema oxidante - ROS (espécies reativas de oxigênio).....	28
2.6. Sistema antioxidante - (glutathiona reduzida)	30
2.7. Anti-TNF- α e azatioprina	33
2.8. Terapia Biológica na Doença de Crohn	33
2.9. Análise sensorial do suplemento da proteína do soro de leite e TGF- β nos pacientes com Doença de Crohn	34
3. Objetivo Geral	37
3.1. Objetivos específicos	37
4. Hipóteses	39
5. Métodos	41
5.1. Delineamento do Estudo	41
5.2. População e Local de Estudo	41
5.3. Material	42
5.4. Análise Sensorial.....	43
5.5. Avaliação Nutricional	44

5.6. Avaliação Clínica dos pacientes durante a intervenção suplementar	46
6. Resultados	51
6.1. Avaliação Nutricional	51
6.2. Composição Corporal	54
6.3. Caracterização e avaliação Sensorial do suplemento de proteína de soro de leite	55
6.4. Avaliação sensorial	58
6.5. Avaliação Imunológica	63
6.6. Glutaciona Eritrocitária	65
6.7. Liberação de Radicais Intermediários do Oxigênio pelos Granulócitos	68
7. Discussão	75
8. Conclusão	84
9. Referências	86
ANEXO 1	101
ANEXO 2	103
ANEXO 3	104
ANEXO 4	105
ANEXO 5	106
ANEXO 6	107
ANEXO 7	109
ANEXO 8	110
ANEXO 9	115
ANEXO 10	116

Lista de tabelas

TABELA 1. PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE BOVINO E PRINCIPAIS FUNÇÕES FISIOLÓGICAS DESCRITAS.	26
TABELA 2. AVALIAÇÃO DA INGESTÃO E ADEQUAÇÃO DE ENERGIA E NUTRIENTES, SEGUNDO OS VALORES DE REFERÊNCIA EM 42 PACIENTES.....	51
TABELA 3. FREQUÊNCIA DIÁRIA, SEMANAL E MENSAL DOS ALIMENTOS MAIS CONSUMIDOS POR 42 PACIENTES COM DOENÇA DE CROHN.	53
TABELA 4. INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL COM A PROTEÍNA DO SORO DE LEITE E TGF-B, SOBRE O ÍNDICE DE MASSA CORPORAL (IMC), % DE GORDURA, GORDURA ABSOLUTA (KG) E MASSA MAGRA (KG) DO GRUPO SUPLEMENTADO E GRUPO CONTROLE SEM SUPLEMENTO.....	54
TABELA 5. COMPOSIÇÃO APROXIMADA DO WPC.....	55
TABELA 6. AMINOÁCIDOS TOTAIS (100G DE PROTEÍNA) DA FONTE PROTÉICA: PROTEÍNA DO SORO DE LEITE, COMPARADO COM IOM (2002).....	56
TABELA 7. SOLUBILIDADE DO WPC.....	57
TABELA 8. MÉDIAS DE ACEITAÇÃO DOS ATRIBUTOS AROMA, SABOR E TEXTURA DA AMOSTRA DO SUPLEMENTO DA PROTEÍNA DO SORO DE LEITE COM TGF-B (N=54 PACIENTES).	59
TABELA 9. MÉDIAS DE ACEITAÇÃO DO AROMA, SABOR E TEXTURA DO SUPLEMENTO DA PROTEÍNA DO SORO DE LEITE COM TGF-B, DURANTE A SUPLEMENTAÇÃO NOS TEMPOS 1, 2 E 3. (N=22 PACIENTES).	62
TABELA 10. CARACTERÍSTICAS HEMATOLÓGICAS DE PACIENTES COM DOENÇA DE CROHN ANTES E APÓS A SUPLEMENTAÇÃO COM O CONCENTRADO DA PROTEÍNA DO SORO DE LEITE.....	64

Lista de figuras

- FIGURA 1.** CICLO DA GLUTATIONA. (ADAPTADO VANAMAN ET AL. 1970). PONTES DE DISSULFETOS NA ESTRUTURA PRIMÁRIA DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE BOVINO FAVORECEM A AÇÃO MODULADORA. 32
- FIGURA 2.** ANÁLISE, POR CITOMETRIA DE FLUXO, DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) PELOS GRANULÓCITOS, ONDE, 1 É A PRODUÇÃO BASAL DE ROS (SEM ESTÍMULO) E 2 É A AMOSTRA ESTIMULADA, COM O MÁXIMO DE PRODUÇÃO DE ROS SUPOSTADO PELA CÉLULA. A É O GATE PARA A SEPARAÇÃO DE GRANULÓCITOS DOS DEMAIS TIPOS CELULARES, B É A PORÇÃO DE CÉLULAS NÃO FUORECENTES, C É A PORÇÃO DE CÉLULAS FUORESCENTES E D REPRESENTA A MEDIANA DE FLUORCÊNCIA..... 49
- FIGURA 3.** AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES ANTES (T0) E APÓS (T2) A SUPLEMENTAÇÃO COM A PROTEÍNA DO SORO DE LEITE E TGF-B..... 57
- FIGURA 4.** AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES SUPLEMENTADOS DURANTE 16 SEMANAS EM COMPARAÇÃO COM OS PACIENTES CONTROLES SEM SUPLEMENTAÇÃO. 58
- FIGURA 5.** DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES EM FUNÇÃO DOS VALORES HEDÔNICOS DE ACEITAÇÃO DO AROMA, SABOR E TEXTURA DADOS À AMOSTRA DO SUPLEMENTO DE PROTEÍNA DO SORO DO LEITE E TGF-B..... 60
- FIGURA 6.** FREQUÊNCIA DE CITAÇÕES DAS NOTAS AROMÁTICAS PERCEBIDAS (A) E SABORES PERCEBIDOS (B) PELOS INDIVÍDUOS NO SUPLEMENTO DA PROTEÍNA DO SORO DE LEITE COM TGF-B. (N=54 PACIENTES)..... 61
- FIGURA 7.** DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES EM FUNÇÃO DE VALORES HEDÔNICOS DE ACEITAÇÃO DO AROMA, SABOR E TEXTURA DADOS À AMOSTRA DO SUPLEMENTO DA PROTEÍNA DO SORO DE LEITE E TGF-B NOS TEMPOS1, 2 E 3. 63
- FIGURA 8.** CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA NOS ERITRÓCITOS (MG/DL)..... 65
- FIGURA 9.** CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA NOS ERITRÓCITOS (MG/DL)..... 66
- FIGURA 10.** CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA NOS ERITRÓCITOS (MG/DL). COMPARAÇÃO NO GRUPO SUPLEMENTADO ANTES DE INICIAR A SUPLEMENTAÇÃO E APÓS A SUPLEMENTAÇÃO. 67
- FIGURA 11.** CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA NOS ERITRÓCITOS (MG/DL). COMPARAÇÃO NO GRUPO CONTROLE SEM A SUPLEMENTAÇÃO. 67
- FIGURA 12.** CAPACIDADE MÁXIMA DE PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) PELOS GRANULÓCITOS DE CONTROLES SAUDÁVEIS E

PACIENTES COM DC EM USO DE AZATIOPRINA E INFLIXIMAB E APENAS AZATIOPRINA.....	68
FIGURA 13. PERCENTUAL BASAL DE PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) PELOS GRANULÓCITOS DE PACIENTES COM DC E DE CONTROLES SAUDÁVEIS.....	69
FIGURA 14. CAPACIDADE MÁXIMA DE PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) PELOS GRANULÓCITOS DE CONTROLES SAUDÁVEIS E PACIENTES COM DC EM USO DE AZATIOPRINA E INFLIXIMAB SUPLEMENTADOS E NÃO SUPLEMENTADOS.	70
FIGURA 15. PERCENTUAL BASAL DE PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) PELOS GRANULÓCITOS DE CONTROLES SAUDÁVEIS E PACIENTES COM DC EM USO DE AZATIOPRINA E INFLIXIMAB SUPLEMENTADOS E NÃO SUPLEMENTADOS.	70
FIGURA 16. CAPACIDADE MÁXIMA DE PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) PELOS GRANULÓCITOS DE PACIENTES COM DC EM USO DE AZATIOPRINA E INFLIXIMAB ANTES (T0) E APÓS (T2) A SUPLEMENTAÇÃO.	71
FIGURA 17. PERCENTUAL BASAL DE PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) PELOS GRANULÓCITOS DE PACIENTES COM DC SUPLEMENTADOS ANTES (T0) E APÓS (T2) A SUPLEMENTAÇÃO.	72
FIGURA 18. CAPACIDADE MÁXIMA DE PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) PELOS GRANULÓCITOS DE PACIENTES COM DC EM USO DE AZATIOPRINA E INFLIXIMAB SEM SUPLEMENTAÇÃO E DURANTE 16 SEMANAS.	72
FIGURA 19. PERCENTUAL BASAL DE PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) PELOS GRANULÓCITOS DE PACIENTES COM DC EM USO DE AZATIOPRINA E INFLIXIMAB SEM SUPLEMENTAÇÃO E DURANTE 16 SEMANAS.	73

Lista de abreviaturas e siglas =====

Lista de abreviaturas e siglas

DC: Doença de Crohn

TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa

Anti-TNF α - Infliximabe

IBD: inflammatory bowel disease

IADC – Índice de Atividade da Doença de Crohn

PSL: proteína do soro de leite

DII: Doença inflamatória intestinal

MDP: dipeptídeo muramil

NOD2: receptor citoplasmático

NF κ B: fator nuclear de ativação κ B

DRI: Dietary Reference Intakes

GER: gasto de energia em repouso

BSA: albumina bovina sérica

GMP: glicomacropéptídeo

CPSL: concentrado de proteína de soro de leite

IPSL: isolado de proteína de soro de leite

GSH: glutathiona

TGF- β : Fator transformador de crescimento beta

EGF: Fator de Crescimento Epidérmico

FBGF: Fator de crescimento de Fibroblastos

ROS: espécies reativas de oxigênio

CER - Certolizumabe

ADA – Adalimumabe

NATA -Natalizumabe

QFA: Questionário de Freqüência Alimentar

DTNB - 2-ácido nitrobenzóico

PMA - Forbol-12-miristato-13-acetato

PBS - Phosphate-buffered saline

DHR 123 - dihidrorhodamina 123

Resumo



Resumo

A Doença de Crohn (DC) é uma desordem inflamatória intestinal crônica, com evidência de inflamação transmural granulomatosa da mucosa. Há aumento da permeabilidade intestinal, redução da atividade do sistema mucociliar, alterações nas junções epiteliais, deficiência de oligoelementos até desnutrição grave. A etiopatogenia permanece desconhecida, mas há hipóteses sobre a genética da doença e alterações da regulação da resposta imune da mucosa para a microbiota intestinal.

O diagnóstico é estabelecido pelos sintomas e sinais, imagens da endoscopia e radiologia, e histologia do tecido intestinal.

O objetivo desta pesquisa foi investigar o efeito de um concentrado de proteínas de soro de leite bovino enriquecido com TGF- β sobre a inflamação e o estado nutricional dos pacientes com DC sob terapia com azatioprina sozinha ou combinada com anti-TNF α (infliximab).

O desenho do estudo é prospectivo e de intervenção via oral por dezesseis semanas com um concentrado de proteínas do soro de leite enriquecido com TGF- β . Foram realizadas análises de composição centesimal, grau de hidrólise, solubilidade e determinação total de aminoácidos do suplemento da proteína do soro de leite bovino. A ingestão alimentar e estado nutricional foram avaliados antes e após a intervenção. Para avaliação sensorial do suplemento foi aplicado teste de aceitação utilizando escala hedônica facial de 9 pontos. A inflamação foi avaliada antes, durante e após a intervenção, através da medida do índice de atividade da doença e da dosagem do sistema oxidante H₂O₂ pelos granulócitos e antioxidante enzimático da Glutathione eritrocitária (GSH).

O grupo total de pacientes com doença de Crohn apresentou, em sua maioria, consumo adequado de carboidratos e lipídeos, e o consumo de proteína foi superior ao recomendado em mais da metade dos pacientes. Constatou-se inadequação na ingestão de vitaminas A, C, D, E, fibras, cálcio, folato, ferro e zinco. A ingestão de proteínas do soro de leite resultou em melhora da composição corporal dos pacientes. A avaliação sensorial mostrou

que cerca de 30% dos indivíduos gostaram do suplemento com relação a todos os atributos avaliados, já metade deles não gostaram e 20% o classificaram como "mais ou menos".

A avaliação clínica pelo Índice de atividade da Doença de Crohn (IADC), mostrou que a suplementação nutricional no grupo de pacientes sob terapia combinada Azatioprina e Infliximab reduziu significativamente o IADC revelado pela melhora dos sintomas clínicos dos pacientes.

O grupo de pacientes que apresentava a DC com sintomas mais leves estava sob terapia com AZA sozinha e mostrou produção de GSH similar ao controle saudável. No entanto, o grupo sob terapia combinada AZA + anti-TNF- α (Infliximab) apresentou valores de GSH significativamente mais elevados do que o controle saudável antes ($p=0,023$) e após a suplementação ($p<0,01$). Do mesmo modo, valores significativamente mais altos de GSH no grupo da terapia combinada antes ($p=0,048$) e após a suplementação foi observado quando comparado ao grupo AZA. Os valores mais elevados de GSH no grupo de terapia combinada podem ser interpretados como efeito dessa terapia, combinada, uma vez que não se observou diferença significativa quando se comparou os valores de GSH antes e após receber a suplementação. " Em relação à produção basal de H_2O_2 , o grupo de pacientes sob terapia com AZA sozinha mostrou resultados similares ao controle saudável, enquanto o grupo sob terapia combinada mostrou valores inferiores significativos ($p<0,01$) em relação ao controle saudável. A capacidade máxima de produção de espécies reativas de oxigênio não apresentou diferença significativa entre o controle saudável e os pacientes em uso de imunossupressores. Como também não foi observada diferença significativa entre H_2O_2 antes e após a suplementação. Esses resultados demonstram, pela primeira vez, que a terapia combinada na DC reduz de modo acentuado a geração de espécies reativas do oxigênio por granulócitos e, o aumento de GSH encontrado nesses pacientes, reforça seu relevante papel no equilíbrio do balanço H_2O_2 (oxidante) versus GSH (antioxidante). Com resultados de H_2O_2 tão baixos e de GSH mais elevados no grupo de pacientes sob terapia combinada, o suplemento oferecido a esses pacientes pôde ser metabolizado e

aproveitado de modo a ter impacto na melhora no IADC e na composição corporal. O grupo sob terapia combinada, mas não suplementado, não apresentou melhora do IADC nem do índice de massa corporal. Esses resultados são muito relevantes uma vez que os pacientes ao iniciarem a terapia combinada apresentavam doença de moderada para grave e ao receberem o suplemento já se encontravam com o IADC ≤ 150 . Nessa fase, o suplemento teve sua contribuição porque não havia mais desequilíbrio no sistema oxidante versus antioxidante. Além disso, o curto período de 16 semanas de suplementação com o concentrado de proteína do soro de leite enriquecido com TGF- β foi suficiente para promover melhoras no IADC e no Índice de massa corporal.

Concluimos que o suplemento tem grande potencial para ser comercializado e auxiliar na melhoria da clínica de indivíduos com doença de Crohn. Entretanto, para encorajar a suplementação com o concentrado de soro de leite enriquecido com TGF- β de modo regular é fundamental melhorar a qualidade sensorial do produto.

Abstract

Abstract

Crohn's disease (AD) is a chronic inflammatory bowel disorder, with evidence of transmural granulomatous inflammation of the mucosa. There is increased intestinal permeability, reduced the activity of the ciliary mucus, changes in epithelial junctions, and trace element deficiency to severe malnutrition. The etiopathogenesis remains an enigma, but there are hypotheses about the genetics of disease and changes in regulation of the mucosal immune response to intestinal microbiota.

The diagnosis is established by the symptoms and signs, endoscopy and radiology images, and histology of the intestinal tissue. The objective of this research was to investigate the role of a protein concentrate of whey enriched with TGF- β on inflammation and nutritional status of patients with Crohn's disease under treatment with azathioprine alone or combined with anti-TNF (infliximab). The study design is prospective and intervention orally for sixteen weeks with a protein concentrate of whey enriched with TGF- β . Were analyzed for chemical composition, degree of hydrolysis, solubility and total amino acid determination of protein supplementation of whey. Dietary intake and nutritional status were evaluated before and after intervention. To supplement the sensory evaluation test was applied for acceptance facial hedonic scale of 9 points. Inflammation was assessed before, during and after the intervention by measuring the index of disease activity and dosage of the oxidant system H₂O₂ by granulocytes and erythrocyte antioxidant enzyme glutathione (GSH). The total group of patients with Crohn's disease had, in most cases, adequate intake of carbohydrates and lipids, and protein consumption was higher than recommended in more than half of patients. It was found inadequate intake of vitamins A, C, D, E, fiber, calcium, folate, iron and zinc. Protein intake of whey resulted in improved body composition of patients. The sensory evaluation showed that about 30% of individuals liked the supplement with respect to all attributes, since half of them did not like and 20% classified it as "more or

less".

The clinical activity index for Crohn's disease (CDAI), showed that nutritional supplementation in patients under azathioprine and infliximab combination therapy significantly reduced the IADC revealed by the improvement of clinical symptoms of patients. The group of patients who presented with the DC milder symptoms were being treated with AZA alone and showed production of GSH similar to healthy control. However, the AZA group under combined therapy + anti-TNF- α (infliximab) had GSH values significantly higher than healthy controls before ($p = 0.023$) and after supplementation ($p < 0.01$). Similarly, significantly higher values of GSH in the combined therapy group before ($p = 0.048$) and after supplementation was observed when compared to the AZA group. Highest levels of GSH in the combined therapy group can be interpreted as an effect of this therapy, combined, since there was no significant difference when comparing the values before and after receiving GSH supplementation. "In relation to the basal production of H₂O₂, the group of patients on AZA therapy alone showed similar results to healthy control, while the group under combined therapy showed significant lower values ($p < 0.01$) compared to healthy control. The ability Maximum production of reactive oxygen species showed no significant difference between healthy control and patients using immunosuppressive drugs. Nor was no significant difference between H₂O₂ before and after supplementation. These results demonstrate for the first time that therapy combined in DC markedly reduces the generation of reactive oxygen species by granulocytes and the increase of GSH found in these patients, strengthen its important role in balancing the balance sheet H₂O₂ (oxidative) versus GSH (antioxidant). With results of H₂O₂ as low GSH and higher in the group of patients on combination therapy, the supplement offered to these patients could be metabolized and used in order to have an impact on improvement in CDAI and body composition. The group under combined therapy, but not supplementation, showed no improvement in the CDAI or the body mass index. These results are very relevant since patients starting combination therapy had moderate to severe disease and to receive the

supplement has met with the CDAI \leq 150. At this stage, the supplement had its contribution because there was an imbalance in oxidant versus antioxidant system. Moreover, the short period of 16 weeks of supplementation with protein concentrate of whey enriched with TGF- β was sufficient to promote improvements in CDAI and Score body mass. We conclude that the supplement has great potential to be commercialized and help to improve the clinic from individuals with Crohn's disease. However, to encourage supplementation with the concentrate of whey enriched with TGF- β on a regular basis is essential to improve the sensory quality of the product.

Introdução

1.Introdução

A Doença de Crohn (DC) é uma doença inflamatória crônica complexa, com períodos de agudização (FIOCCHI, 1998 e ELSON, 2000). Sua etiopatogenia ainda não está definida, mas sabe-se que há interação de fatores patogênicos como susceptibilidade do hospedeiro, microbiota entérica e imunidade na mucosa.

A microbiota intestinal normal e o sistema imune associado à mucosa representam a primeira linha de defesa contra vários patógenos. Inicialmente, as células apresentadoras de antígenos como as células dendríticas e macrófagos reconhecem, capturam e apresentam o antígeno ao sistema de células T, as quais, na dependência da genética do hospedeiro para a resposta imune, podem promover proteção, tolerância ou doença (FANARO et al., 2003).

Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que a DC pode ser desencadeada por uma disfunção de componentes do sistema imune inato como neutrófilos, monócitos, células epiteliais e células dendríticas (FURUSHO e KORZENIK, 2006). As células epiteliais atuam como uma barreira inicial na prevenção de penetração de antígenos na mucosa intestinal. Defeitos nesta barreira epitelial do sistema imune de mucosa de indivíduos com DC são caracterizados por diminuição da integridade epitelial, da permeabilidade e da composição anormal de muco podendo resultar na elevada produção de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina 1- β (IL-1- β), (COBRIN e ABREU, 2005).

No tratamento farmacológico da doença de Crohn são incluídos aminossalicilatos, corticosteróides, antibióticos e outros imunossupressores com o objetivo de diminuir os sintomas da fase aguda e, manter a remissão clínica da doença (HANAUER, 2001). O tratamento cirúrgico está indicado nas obstruções, complicações supurativas e doença refratária ao tratamento clínico. Infelizmente, o uso do corticosteróide é limitado por seus efeitos secundários, e os pacientes dependentes ou refratários são tratados com imunossupressores análogos das purinas ou com metotrexate, os quais podem

ter baixa a moderada eficácia e múltiplos efeitos secundários (SOUZA, 2006). O desenvolvimento de anticorpo monoclonal anti TNF- α da subclasse IgG1, tem na sua composição 75% de IgG humana e 25% de origem murina, com porção Fab de reconhecimento antigênico, (YOUUDIM, 2004). O objetivo do anti-TNF- α é neutralizar TNF- α livre para impedir a sua interação com seu receptor de membrana celular, e conseqüente ativação do complemento, citólise das células inflamatórias e apoptose das células T - ativadas (RUTGEERTS, 2002).

Embora o desenvolvimento de drogas altamente ativas como anti-TNF- α tenha contribuído para mudar em curto prazo o prognóstico da IBD, há ainda a necessidade de desenvolver terapias alternativas, com menos eventos adversos e de menor risco. Sendo assim, a imunonutrição se destaca por exercer função antiinflamatória nos pacientes com IBD (COEFFIER, 2010).

Nesse contexto, é fundamental considerar que a desregulação do sistema imune associado à mucosa intestinal leva à inflamação crônica que tem como conseqüência a destruição do epitélio intestinal e graves anormalidades funcionais, com perda da capacidade de absorção e secreção exagerada de eletrólitos e fluidos intestinais. Assim, os indivíduos com Doença de Crohn podem apresentar alteração nutricional que vai desde a deficiência de alguns nutrientes até a desnutrição grave (FLORA, 2006). O tratamento clínico e nutricional adequado resulta na indução e manutenção da remissão da doença. Os nutrientes imunomoduladores ou alimentos funcionais apresentam perspectivas promissoras nas suas propriedades farmacológicas de modular a inflamação, mantendo a integridade da mucosa intestinal, melhorando o estado clínico e o estado nutricional destes pacientes. Para evitar efeitos deletérios da DC, as deficiências nutricionais devem ser detectadas precocemente e oferecer ao paciente, um plano alimentar individualizado de acordo com o seu estado nutricional, tipo e gravidade da doença. (FLORA, 2006).

Vários tipos de dietas e suplementos são capazes de modular as funções do sistema imune e seus componentes bioativos foram propostos para constituir a base de produtos alimentares funcionais imunomoduladores

(ROBERFROID, 2002; MORENO et al., 2005). O papel imunomodulador das proteínas do soro de leite (PSL) bovino esta amplamente demonstrada em vários trabalhos, (RUTHERFORD, 2003; CROSS, 2000). PSL constituem 20% do teor total de proteínas do leite bovino e engloba alfa-lactalbumina, beta-lactoglobulina, albumina sérica bovina, lactoferrina, imunoglobulinas e fatores de crescimento de tecidos. Elas estão associadas aos efeitos prebióticos, promoção de restauração de tecidos, manutenção da integridade intestinal, destruição de patógenos e eliminação de toxinas (KENT, 2003).

Revisão Bibliográfica

2.Revisão Bibliográfica

2.1. Doença de Crohn

Doença inflamatória intestinal (DII) inclui um grupo de doenças de causa desconhecida, caracterizada pelo acometimento focal, assimétrico e transmural de qualquer parte do tubo digestivo, da boca ao ânus (RUTHRUFF et al., 2007). A inflamação intestinal inicia-se e perpetua-se por meio de uma resposta imunológica a antígenos desconhecidos num hospedeiro geneticamente susceptível (SHANAHAN, 2001; BAMIAS e COMINELLI, 2006).

É importante considerar que embora a DC possa afetar qualquer porção do trato digestivo, ela na maioria dos casos, favorece o intestino delgado. O íleo e o ceco são afetados em 40% dos casos, o intestino delgado em 30% e o cólon em 25% dos casos (RUTHRUFF et al., 2007). Com esta larga porcentagem de apresentação no delgado, esta doença pode ser muito prejudicial para o estado nutricional do paciente. Quando a doença está ativa, o paciente pode se apresentar com fraqueza, palidez, febre, fadiga, e tem aparência de doença crônica.

A incidência de DC aumentou no final do século XX. O risco de DC é duas a quatro vezes maiores na presença de um simples polimorfismo associado à doença. O risco aumenta 20 a 40 vezes se dois alelos estiverem presentes. O mecanismo desta predisposição não está claro. O gene CARD15 codifica a proteína citoplasmática NOD2, que reconhece o dipeptídeo muramil (MDP), componente do peptidoglicano da parede de bactérias gram-positivas e negativas. O receptor citoplasmático NOD2 está expresso principalmente em fagócitos mononucleares da luz intestinal. A ligação de MDP com o NOD2 ativa a transcrição do fator nuclear de ativação κ B (NF κ B) levando a transcrição de genes de citocinas pró inflamatórias. Há uma similaridade entre os aspectos da DC e os produzidos por micobactérias. Outra teoria considera que a inflamação na DC surge como um processo autoimune primário, no qual participam mecanismos celulares e humorais. Vários locus de suscetibilidade para DC já

foram identificados e o mais forte é o CARD15. Contudo, polimorfismos ocorrem em apenas 40% dos pacientes (aqueles com doença no íleo) e em 15% dos indivíduos saudáveis. Uma teoria alternativa propõe que a falha na resposta inflamatória aguda leva ao retardo ou remoção incompleta da bactéria, a qual rompe a barreira mucosa (GRIFFITHS, 2005).

A microbiota intestinal normal e o sistema imune associado à mucosa representam a primeira linha de defesa contra vários patógenos. A microbiota ativa a imunidade inespecífica e a resposta imune humoral, além de modular as reações de hipersensibilidade. Após o reconhecimento e apresentação do antígeno ocorre a construção de uma resposta imune, a qual poderá ter papel na proteção, na tolerância ou na doença (FANARO et al., 2003). Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que a DC pode ser desencadeada por uma disfunção de componentes do sistema imune inato como neutrófilos, monócitos e células dendríticas (FURUSHO e KORZENIK, 2006). As células epiteliais atuam como uma barreira inicial na prevenção de penetração de antígenos na mucosa intestinal.

No intestino do paciente com DC, TNF- α é indutor da apoptose de enterócitos e IFN- γ é modulador da sinalização intracelular, e ambas promovem aumento da proliferação de células imaturas nas criptas. Adicionalmente, as quimiocinas secretadas pelas células epiteliais são fatores potentes para atração de outras células inflamatórias para o epitélio intestinal (COBRIN e ABREU, 2005). Deste modo, há maior expressão de IL-12, TNF- α e IFN- γ na mucosa e, nas áreas de inflamação aguda, há elevada taxa de apoptose das células epiteliais e aumento da proliferação das células nas criptas. Algumas interleucinas como IL-4, IL-10 e TGF- β , têm efeitos antiinflamatórios. TGF- β é uma citocina reguladora, produzida por células T e macrófagos, com propriedades antiinflamatórias e regulação da resposta imune (Hauck, 2005), ações protetoras diretas sobre a mucosa intestinal, como o estímulo da re-epitelização, produção de mucina (GIBSON, ANDERSON, E MARIADASON, 1996; BECK e PODOLSKY, 1999), indução da tolerância oral e produção de IgA. Sua deficiência está relacionada com doença inflamatória

intestinal. A administração de uma dieta rica em TGF- β ajuda na remissão clínica da doença de Crohn e melhora das lesões intestinais (FELL, 2005).

2.2. Avaliação nutricional na Doença de Crohn

A avaliação nutricional pretende detectar problemas nutricionais e colaborar para a promoção ou recuperação da saúde. Na prática clínica utiliza-se a análise da história clínica, dietética e social, dados antropométricos, dados bioquímicos e interação entre drogas e nutrientes para estabelecer o diagnóstico nutricional e servir de base para o planejamento e orientação dietética (DRI, 2000).

A fisiopatologia da Doença Inflamatória Intestinal é multifatorial e envolve interações entre o intestino luminal e o sistema imune associado à mucosa.

À desnutrição observada durante os surtos de atividade da doença, e cujas manifestações clínicas principais são a perda de peso, anemia e hipoalbuminemia, pode se associar desnutrição crônica, resultando em caquexia, deficiências nutricionais múltiplas e, em crianças, retardo no crescimento. A anemia é resultado da deficiência de ferro, folato e vitamina B12 e muitas outras deficiências específicas (HOW e SELLIN, 2010). A intervenção com a nutrição oral ou enteral na Doença Inflamatória Intestinal pode ser eficaz, tanto isolada ou em associação com outras drogas, podendo levar a remissão da doença (COEFFIER, 2010). Além de tratar a desnutrição, o suporte nutricional é também usado para modular a inflamação intestinal.

A atividade da doença parece ser um fator determinante para o aparecimento de hipermetabolismo energético e protéico. Em geral, o gasto de energia em repouso (GER) em pacientes com doença inativa não difere do normal mas pode exceder as taxas previstas na presença de febre e sepse (COEFFIER, 2010).

Os mecanismos de retardo do crescimento em pacientes com DC incluem ingestão inadequada de calorias, má absorção, aumento do consumo de energia em consequência da inflamação crônica, ação das citocinas pró-

inflamatórias, desequilíbrios hormonais, redução do IGF-1 e terapia com esteróides (JOSE, et al, 2009)

Osteopenia e osteoporose são identificadas como complicações da DII pediátrica, da mesma forma que o retardo de crescimento, decréscimo na densidade mineral óssea é também comum em pacientes com DC. A osteopenia pode estar presente já ao diagnóstico. As etiologias da osteopenia e osteoporose são multifatoriais e incluem hipovitaminose D, diminuição da ingestão e má absorção de cálcio, e reabsorção óssea mediada por citocinas, (CANNIOTO, et al, 2009). Anemia na DII pode ocorrer em razão de perda crônica, inflamação crônica, deficiência de ferro e folato, depressão medular e hemólise. Achados laboratoriais incluem microcitose e baixos níveis de ferro sérico e ferritina (KAPPELMAN, 2008).

A monitorização do estado nutricional do paciente com DII deve incluir a avaliação antropométrica longitudinal do peso, estatura e índice de massa corporal, controle da anemia com avaliação da hemoglobina, reticulócitos, dosagem de ferro sérico, ferritina, capacidade de ligação do ferro total, TIBC, dosagem de folato e Vitamina B12, avaliação de má absorção intestinal por meio da dosagem de albumina sérica e zinco e densitometria óssea. (JOSE, et al, 2009). O acompanhamento laboratorial inclui dosagem de hemoglobina e hematócrito, se diminuídos ampliar a investigação com a contagem de reticulócitos, dosagem de ferro sérico, ferritina sérica e capacidade de ligação do ferro, dosagens de folato e vitamina B12. Má absorção intestinal deve se investigada, assim como albuminemia e zinco sérico. O metabolismo do cálcio deve ser monitorizado em pacientes com doença mais grave pela densitometria óssea e dosagem de vitamina D. (KAPPELMAN, 2008).

2.3. Proteínas do soro de leite bovino

O soro lácteo, também conhecido como soro de leite, soro de queijo ou lacto-soro, é um subproduto da indústria de laticínios e representa a porção aquosa do leite que se separa do coágulo durante a fabricação do queijo ou da

caseína (BALDASSO, 2008). O soro de leite pode ser obtido, em laboratório ou na indústria, por três processos principais (SGARBIERI, 2004):

a) processo de coagulação enzimática (enzima quimosina), resultando no coágulo de caseína, matéria-prima para a produção de queijos e no soro "doce";

b) precipitação ácida no pH isoeletrico (pI), resultando na caseína isoeletrica, que é transformada em caseinatos e no soro ácido;

c) separação física das micelas de caseína por microfiltração, obtendo-se um concentrado de micelas e as proteínas do soro, na forma de concentrado ou isolado protéico.

A fração protéica do soro representa em torno de 18-20% do total de proteínas do leite da vaca. As duas principais proteínas do soro α -lactoalbumina (α -La) e β -lactoglobulina (β -Lg) perfazem 70-80% das proteínas totais do soro (JOVANOVIC et al., 2005). As sub frações ou peptídeos secundários, assim denominados por se apresentarem em pequenas concentrações no soro do leite, são compostas por glicomacropéptido, imunoglobulinas, albumina, lactoferrina, lactoperoxidase, lisozima, lactolina, relaxina, lactofano, fatores de crescimento IGF-1 e IGF-2, proteoses-peptonas e aminoácidos livres (HARAGUCHI et al., 2006).

As proteínas do soro têm sido reconhecidas como valiosos ingredientes alimentares com importantes propriedades nutricionais e funcionais, que possuem elevada quantidade de aminoácidos sulfurados, os quais apresentam funções antioxidantes (SINHA et al., 2007).

Por décadas, essa parte do leite foi desperdiçada pela indústria de alimentos. Somente a partir da década de 70, pesquisadores passaram a estudar suas propriedades (HARAGUCHI, et al 2006). Do ponto de vista aminoacídico, tais proteínas apresentam quase todos os aminoácidos essenciais em excesso às recomendações, exceto os aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina) que não são tão elevados, mas atendem às necessidades de todas as idades (MACEDO, 2003). Apresentam elevadas concentrações de triptofano, cisteína, leucina, isoleucina e lisina (SGARBIERI, 2004).

Estudos demonstram que as proteínas do soro são absorvidas mais rapidamente que outras, como a caseína, por exemplo. Essa rápida absorção faz com que as concentrações plasmáticas de muitos aminoácidos, inclusive a leucina, atinjam altos valores logo após a sua ingestão (BOUTHEGOURD, 2002). Pode-se, dessa forma, hipotetizar que, a ingestão de proteínas do soro são mais eficientes no processo de síntese protéica e adequadas para situações de estresses metabólicos em que a reposição se torna emergencial (SGARBIERI, 2004).

Tabela 1. Proteínas do soro de leite bovino e principais funções fisiológicas descritas.

Proteína	Massa molecular (kDa)	Concentração (g/L)		Função fisiológica
		Leite Bovino	Leite Humano	
Proteínas totais		6,3	67,3	
β -Lactoglobulina	18,3	3,2		Carreador de retinol, conjuga ácidos graxos, antioxidante
α -Lactalbumina	14,1	1,2	1,9	Síntese de lactose, carreador de Ca^{++} imunomodulação, anticarcinogênico
Imunoglobulinas (IgA, IgM e IgG)	160 a 900	0,7	1,3	Proteção imunológica
BSA	66,2	0,4		
Lactoferrina	86,1	0,1	1,5	Antimicrobiano, antiviral, antioxidante, imunomodulação, absorção de Fe^{++} , anticarcinogênico
Lactoperoxidase	77	0,03		Antimicrobiano
GMP		1,2		Antimicrobiano, antiviral, bifidogênica
Lisozima	15	0,0004	0,1	Antimicrobiano, sinergia com lactoferrina, IgA, IgM, IgG,

Fonte: Adaptado de Shah (2000); Pan Y. et al., (2006), Korhonen e Pihlanto, (2006). **BSA**: albumina bovina sérica, **GMP**: glicomacropeptídeo.

Os concentrados de proteína de soro de leite (CPSL) e os isolados de proteína de soro (IPSL) geralmente contêm uma concentração de cisteína pelo menos quatro vezes maior do que outras proteínas de alta qualidade, e isso produz uma melhora da resposta imune (CRIBB, 2005).

Em pacientes com AIDS, a proteína do soro do leite, além de aumentar a concentração de glutathione (GSH) em linfócitos e eritrócitos, também foi capaz de reduzir a morbidade e melhorar a relação entre os linfócitos T CD4 e CD8 (BARUCHEL, 1998 e MORENO 2005). Os possíveis mecanismos estimulatórios das PSL sobre o sistema imune parecem estar relacionados com sua estrutura primária rica em aminoácidos sulfurados, cisteína e grupamentos glutamil-cisteína, precursores da síntese de GSH. Esse poder imunoestimulante parece se estender à síntese de IgA secretória no trato gastrointestinal e às inter-relações imunológicas entre a microbiota intestinal e o hospedeiro (BOUNOUS et al., 1988; 1989; 1993; CONSTANTINO et al., 1989; MCINTOSH et al., 1995).

Diversos estudos demonstram os benefícios do consumo das proteínas do soro do leite em relação as suas propriedades fisiológico-funcionais, tais como: atividade anticâncer, atividades antiúlcera, proteção ao sistema cardiovascular entre outras (SHAH, 2000; SGARBIERI, 2004; PACHECO et al., 2006). Além disso, uma importante característica que tem sido atribuída às proteínas do soro é a sua capacidade de aumento da resposta imune através de uma maior produção de glutathione celular. A glutathione, por sua vez, desempenha funções metabólicas como antioxidante celular, protegendo contra efeitos deletérios de radicais livres e como substrato para a enzima glutathione peroxidase com ação desintoxicante sobre o peróxido de hidrogênio e outros hidroperóxidos (BRINK, 1996).

2.4. Fator transformador de crescimento beta (TGF- β)

Os fatores de crescimento do soro de leite bovino estão sendo usados cada vez mais nos produtos para a saúde. Os fatores mais abundantes presentes no soro são: Fator do Crescimento do Tipo Insulina 1 (IGF-1); Fator- β de Transformação de Crescimento (TGF- β); alguns membros da família de

Fatores de Crescimento Epidérmico (EGF) e Fator de crescimento de Fibroblastos (FBGF), (POULIOT & GAUTHIER, 2006). O TGF- β 2 está presente em maior quantidade no leite, podendo variar entre 10-70ngmL⁻¹ e o TGF- β 1 em baixas concentrações <5ngmL⁻¹.

A família TGF- β tem várias funções e dentre elas se destaca a modulação (POULIOT & GAUTHIER, 2006), da resposta inflamatória por inibir a proliferação e a função de células T efetoras e macrófagos ativados; regular a diferenciação de subpopulações funcionalmente distintas de células T, podendo, por exemplo, bloquear o desenvolvimento de padrão de resposta imune TH1 e TH2; estimular a produção de IgA e atuar na reparação tecidual depois que as reações inflamatórias regredem (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI 2008).

O TGF- β é uma citocina pleiotrópica que atua como potente supressor da imunidade e da inflamação, inibindo a produção de muitas citocinas produzidas por monócitos e linfócitos (TNF- α , IL-1 e IL-6), inibe a proliferação das células T e B e induz à produção de IL-1RA a qual contribui com efeitos imunossupressores e anti-inflamatórios. Estimula a produção de IgA por induzir as células B a realizarem a troca de classe, produzindo assim, imunoglobulinas do isotipo IgA (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; SAGEL & ACCURSO, 2002). Portanto temos no TGF- β , um potente agente regulador para diminuir a inflamação crônica nas células intestinais e com isso a possibilidade dos benefícios terapêuticos nos suplementos alimentares que contem o fator de crescimento beta.

2.5. Sistema oxidante - ROS (espécies reativas de oxigênio)

Os radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (ROS) podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (Anderson, 1996). Entre as principais formas reativas de oxigênio O_2^-

apresenta uma baixa capacidade de oxidação, o OH⁻ mostra uma pequena capacidade de difusão e é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares. O H₂O₂ não é considerado um radical livre verdadeiro, mas é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas (ANDERSON, 1996).

A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição à fatores exógenos. Contudo, na condição de pró-oxidante a concentração desses radicais pode aumentar devido à maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes (CERUTTI, 1991, 1994). O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres tem sido chamado de estresse oxidativo (SIES, 1993). A ocorrência de um estresse oxidativo moderado, freqüentemente é acompanhada do aumento das defesas antioxidantes enzimáticas, mas a produção de uma grande quantidade de radicais livres pode causar danos e morte celular (ANDERSON, 1996).

Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças, incluindo doenças degenerativas tais como as cardiopatias, aterosclerose, problemas pulmonares e na patogênese do envelhecimento (MASELLA, et al, 2005). Os danos no DNA causados pelos radicais livres também desempenham um papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese (POULSEN *et al.*, 1998).

A fim de lidar com um excesso de radicais livres produzidos pelo estresse oxidativo, os seres humanos desenvolveram mecanismos sofisticados para manter a homeostase. Esses mecanismos de proteção, tem a função de limpar ou desintoxicar os ROS, bloqueando sua produção, ou seqüestrando metais de transição que são a fonte de radicais livres, e incluem antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, atuando como defesa endógena para o organismo (HAYES,1999; SIES, 1999).

Outro meio de defesa exógena ocorre através da dieta (BENZIE, 1999; PORRINI, 2005), e dessa maneira, muitas substâncias e compostos naturais têm sido amplamente estudados com funções importantes na capacidade antioxidante, entre eles se destaca a proteína do soro do leite que possui a capacidade única e ímpar de aumentar as concentrações de glutathione em vários tipos diferentes de células do organismo (SESSO, 1999; RICE-EVANS, 2001; MASELLA, 1999).

A glutathione é a peça central do sistema de defesa antioxidante do organismo que protege as células contra danos provocados por radicais livres, poluição, toxinas, infecções e exposição a raios ultravioleta (MASELLA, 2005). Os níveis de glutathione diminuem com a idade (RICE-EVANS, 1995), e este declínio é associado à fase inicial de muitas doenças, tais como o mal de Alzheimer, catarata, o mal de Parkinson e arteriosclerose (NIJVELDT, 2001). Além disso, as concentrações de glutathione parecem determinar alterações na composição corporal, (RICE-EVANS, 1995; SZOCS, 2004).

A condição fisiológica da célula exige equilíbrio entre as condições pró-oxidantes e antioxidantes; o rompimento do estado estacionário em favor da condição pró-oxidante favorece injúrias celulares e o estresse oxidativo (RIBEIRO *et al.*, 2005). O excesso de ROS celular vem sendo descrito por promover a transcrição de genes inflamatórios, além disso, pode causar a oxidação de macromoléculas, causando um dano molecular irreversível (GENESTRA, 2007; ROTNER; FREYSSINET; MARTINEZ, 2009).

2.6. Sistema antioxidante - (Glutathione reduzida)

O sistema antioxidante da glutathione (GSH) é o principal mecanismo de proteção celular contra o estresse oxidativo. Uma das funções básicas do sistema imune é reduzir este estresse. Por este motivo, a disponibilidade de glutathione é crucial para a eficiência da resposta imune (CRIBB, 2005). GSH é sintetizada no interior das células a partir de glutamato, glicina e cisteína. Cisteína é essencial para manter alta proporção de GSH nas células e garantir uma ótima atividade e proliferação de células do sistema imune,

particularmente as células T (AUGUSTIN, 2006) e defesa contra o estresse oxidativo (BOUNOUS, 2003). Por definição, GSH é um tripeptídeo (γ -glutamil-cistinil-glicina) hidrossolúvel de vital importância na proteção celular contra estresse oxidativo, uma vez que é o principal antioxidante intracelular e cofator de várias enzimas antioxidantes. Como antioxidante, GSH possui ação direta na remoção dos peróxidos produzidos durante o metabolismo de toxinas exógenas e do estresse oxidativo. Além disso, mantém outros antioxidantes celulares nas suas formas reduzidas e algumas enzimas antioxidantes nos seus estados reduzidos e ativos (CHANTRY et al., 1999; McDERMID et al., 2002). É encontrada praticamente em todas as células e sua síntese depende da disponibilidade de seus precursores cisteína e glutamilcisteína. Ciclo da glutatona está ilustrado na figura 3.

A provisão dietética de cisteína livre, entretanto, parece ter efeito limitado na elevação dos níveis teciduais de GSH e, em altas concentrações, pode se tornar tóxica. Um modo mais efetivo de suplementar esses aminoácidos se dá via fonte protéica rica em cisteína, como a encontrada no soro de leite bovino (BOUNOUS et al., 1988; McINTOSH et al., 1995; STELLA e POSTAIRE, 1995). Níveis de GSH em células apresentadoras de antígeno desempenham um papel na direção da resposta para um padrão do tipo "T-helper 1 (Th1)" ou "T-helper 2 (Th2)" (TOWNSEND et al., 2003).

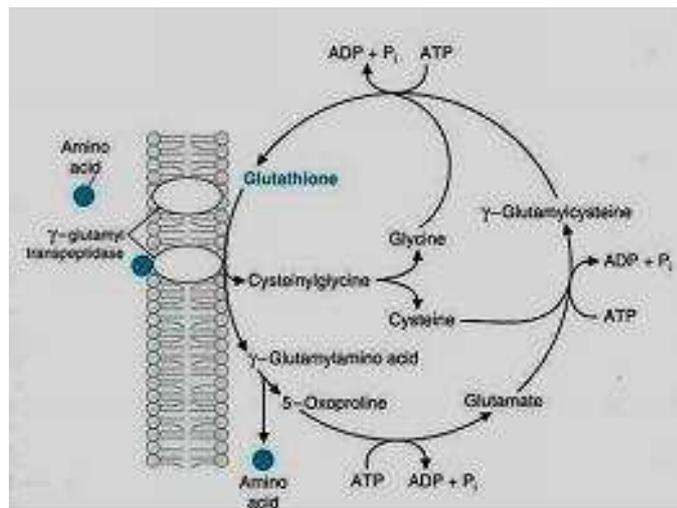


Figura 1. Ciclo da Glutathione. (adaptado Vanaman et al. 1970). Pontes de dissulfetos na estrutura primária das Proteínas do soro de leite bovino favorecem a ação moduladora.

Assim, o papel central de GSH reduzida envolve todas as linhas de proteção contra ROS, no meio intracelular e nas defesas antioxidantes endógenas (SIES, 1999). A atividade enzimática da GSH reduzida é regulada em resposta ao estresse, porém mutações prejudicam a atividade da glutathione reduzida com conseqüências deletérias. Contudo, a presença de GSH é essencial, mas não suficiente, para prevenir a citotoxicidade de ROS.

Vários dados experimentais indicam a inter-relação estreita entre glutathione, polifenóis endógenos e polifenóis dietéticos na defesa contra o estresse oxidativo (STEELE, 2000). A utilização de compostos antioxidantes encontrados na dieta é um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres que podem ser empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e também na medicina. Muitas vezes os próprios medicamentos aumentam a geração intracelular desses radicais livres, sendo importante a utilização de substâncias antioxidantes naturais para combater o estresse ocasionado (HALLIWELL *et al.*, 1995).

2.7. Anti-TNF- α e azatioprina

As doenças inflamatórias intestinais, notadamente a DC e a retocolite ulcerativa, são entidades autoimunes. Analisando a reação inflamatória na DC, observou-se que existia um desequilíbrio entre a produção de citocinas pró-inflamatórias em relação às anti-inflamatórias, ligadas à defesa. Entre os agentes causadores da inflamação, notou-se um papel importantíssimo do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), pelo seu potencial de gerar e ampliar essa reação. Por esse motivo, as primeiras drogas biológicas estudadas e posteriormente liberadas para uso clínico foram os inibidores do TNF- α (KOTZE, 2010). O anti-TNF- α é um anticorpo monoclonal, uma imunoglobulina G1 (IgG1) que inibe o fator de necrose tumoral (TNF) (HANAUER et al, 2002). A neutralização do TNF- α livre impede a interação com seu receptor de membrana celular, enquanto que, a sua ligação ao receptor induz a ativação do complemento, a citólise das células inflamatórias e apoptose das células T - ativadas (RUTGEERTS, 2002).

A azatioprina é um imunossupressor que tem a função de diminuir a inflamação do tecido, reduzindo a população de células imunes e / ou interferindo com a sua produção de proteínas que promovem a ativação imune e inflamação. O objetivo do tratamento com azatioprina é enfraquecer o sistema imunológico do corpo a fim de diminuir a intensidade da inflamação no intestino. Estudos demonstram que o uso em associação do Anti-TNF- α com a azatioprina em pacientes com DC de nível moderado a grave estão mais propensos a remissão clínica, (COLOMBEL, et al 2010)

2.8. Terapia Biológica na Doença de Crohn

O tratamento com medicamentos biológicos nitidamente foi um divisor de águas no tratamento das DII. O primeiro agente biológico anti TNF- α estudado para o manejo das DII foi o infliximab. A primeira publicação de metodologia destacada sobre essa droga, na gastroenterologia foi publicada por TARGAN, et al (1997). Este trabalho demonstrou superioridade clara do Infliximab

endovenoso frente ao placebo após uma única infusão. Outro estudo realizado por PRESENT et al (1999) novamente mostrou a eficiência do infliximab, com infusões nas semanas 0, 2 e 6, e melhora no processo inflamatório e diminuição do IADC. Outro estudo realizado por (HANAUER, 2002), demonstrou que, após o esquema de indução da remissão, a manutenção do tratamento por 54 semanas trazia remissão clínica em 1/3 dos pacientes com DC.

O uso do infliximab em crianças foi solidificado com o trabalho de HYAMS (2007), onde demonstrou que pacientes pediátricos com DC, em uso do infliximab tiveram a manutenção do tratamento a cada 8 semanas quando comparado com doses a cada 12 semanas. O ADA (adalimumab) foi liberado para uso no Brasil em 2007, com seus estudos focando, da mesma forma que o infliximab, as formas moderada a grave da doença, de forma luminal e fistulizante. A eficácia do ADA foi comprovada em pacientes que apresentaram perda de resposta ou intolerância ao infliximab. Portanto, o ADA tem indicação precisa tanto em pacientes virgens de outros agentes anti-TNF como na falha ao infliximab prévio (KOTZE, 2010).

Também em 2007, surgiram os trabalhos sobre um terceiro agente biológico na DC, o Certolizumabe (CER). Estudos demonstraram vantagens no uso do CER em portadores da DC em relação ao placebo, com algumas considerações específicas (LOLY, 2008). Outro agente biológico com diferente mecanismo fisiopatológico (inibição de outro agente pró-inflamatório, a integrina alfa-4) denominada Natalizumabe (NATA) também foi estudado, e apresenta um papel ainda não muito bem definido no tratamento da DC (D'HAENS, 2008). Entretanto a prática clínica demonstrou que pode ser útil em determinados casos.

Atualmente é impossível dissociar DC com o uso de terapia biológica, visto a sua eficácia e melhora da qualidade de vida dos pacientes.

2.9. Análise sensorial do suplemento da proteína do soro de leite e TGF- β nos pacientes com Doença de Crohn

O interesse em suplementos com a proteína do soro do leite (PSL) aumentou com a sensibilização dos consumidores para seus benefícios de

saúde, pois já está amplamente demonstrado o seu papel imunomodulador (RUTHERFORD, 2003; CROSS, 2000). Elas estão associadas aos efeitos prebióticos, promoção de restauração de tecidos, manutenção da integridade intestinal, destruição de patógenos e eliminação de toxinas (KENT, 2003).

Apesar das valiosas propriedades funcionais e nutricionais, é importante ressaltar que a proteína do soro de leite apresenta pouco ou nenhum sabor (DRAKE 2006; DRAKE et al. 2009). Entretanto, alguns compostos presentes no soro do leite podem sofrer reações químicas como a oxidação lipídica formando aromas/sabores desagradáveis no produto (KARAGUL-YUCEER et al. 2002; MAHAJAN et al. 2004, WRIGHT et al. 2009). Atualmente, os consumidores esperam cada vez mais obter prazer com o alimento e requerem características sensoriais, como aroma, sabor e textura agradáveis e juntamente com essas características sensoriais possibilite a manutenção ou melhoria de sua saúde e bem estar.

Objetivo



3.Objetivo Geral

Caracterizar o estado nutricional e verificar o efeito de um suplemento alimentar de concentrado de proteína de soro de leite bovino enriquecido com TGF- β , sobre o balanço oxidante vs antioxidante enzimático, nos pacientes com Doença de Crohn.

3.1. Objetivos específicos

- 1- Avaliar o sistema oxidante (H_2O_2) medido por citometria de fluxo;
- 2- Avaliar o sistema antioxidante enzimático da glutathiona (GSH) medido por espectrofotometria
- 3- Avaliar a morbidade da Doença de Crohn, pelo IADC.

- 4- Avaliação nutricional (registro alimentar de três dias e frequência alimentar)
- 5- Avaliação da composição corporal
- 6- Análise sensorial do suplemento.

Hipóteses



4. Hipóteses

As hipóteses de estudo, enunciadas na forma de hipótese alternativa, são:

1- O Concentrado de proteínas de soro de leite bovino enriquecido com TGF- β oferecido por via oral possui efeito imunomodulador direto sobre o sistema imune associado à mucosa intestinal de pacientes com Doença de Crohn.

2- Esta imunomodulação é traduzida pela regulação do balanço oxidante-antioxidante.

3- A suplementação alimentar oral é capaz de melhorar o estado nutricional e diminuir a intensidade do processo inflamatório medido pelo Índice de atividade da doença em pacientes com Doença de Crohn.

Métodos

5. Métodos

Estudo aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da FCM-UNICAMP (PROCESSO N^o 304/2007), conforme recomendações para pesquisas biomédicas envolvendo seres humanos propostas pela Resolução n^o 196 de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde, (Anexo 1). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2 e 3).

5.1. Delineamento do Estudo

Ensaio clínico prospectivo de intervenção clínica e nutricional com um concentrado de proteínas do soro de leite bovino enriquecido com TGF- β .

5.2. População e Local de Estudo

Foram selecionados 60 indivíduos de uma coorte de 198 pacientes com Doença de Crohn, sob acompanhamento clínico no Gastrocentro da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), SP, Brasil. Seleção dos pacientes obedeceu aos seguintes critérios:

Critérios de inclusão:

- Pacientes de ambos os gêneros;
- Estar sob terapia intravenosa com anti-TNF- α a cada 2 meses;
- Azatioprina via oral diariamente;
- Apresentar acometimento no delgado;
- Não fumante;
- Não droga adito;
- Não estar usando outros medicamentos;
- Ter boa adesão ao seguimento clínico ambulatorial.

Os grupos foram separados aleatoriamente a saber: Trinta indivíduos receberam orientação nutricional e o Concentrado de PSLB enriquecido com TGF- β (grupo suplementado=GS) durante 16 semanas e trinta receberam apenas orientação nutricional (grupo controle=GC) durante o período da pesquisa.

Critério de exclusão:

Pacientes que por algum motivo não completar as 16 semanas de suplementação alimentar.

5.3. Material

Concentrado da proteína do soro de leite (CPSL), doado pela HILMAR CHEESE COMPANY, 9001 (North Lander Avenue Hilmar, Califórnia 95324 USA). Foi realizado a irradiação do suplemento pela EMBRARAD – Empresa Brasileira de radiações LTDA. (Anexo 4).

5.3.1. Composição centesimal da proteína

Umidade, sólidos totais, cinzas e proteína foram determinadas segundo a AOAC, 2006. Os lipídios totais foram determinados de acordo com BLIGH & DYER, 1959 e os carboidratos totais foram estimados por diferença, subtraindo a soma dos valores obtidos nas outras determinações de 100%.

5.3.2. Determinação do grau de hidrólise

O grau de hidrólise (GH) foi determinada de acordo com ADLER NIESSEN, 1979, método que consiste na medição espectrofotométrica do cromóforo formado na reação entre o ácido trinitrobenzênico sulfônico (TNBS) e grupos de aminoácidos em condições alcalinas. Após uma hora de incubação, a reação foi interrompida através da redução do pH com 0,1 M HCl. A amostra foi dispersa em dodecil sulfato de sódio (SDS) e a reação ocorreu em 0.2125M tampão fosfato, pH 8,2. aminoácido L-leucina (0 a 2,0 mM) foi utilizado como padrão e as leituras feitas a 340 nm.

5.3.3. Solubilidade da proteína

A solubilidade da proteína (%) foi determinada de acordo com o método de MORR et al (1985). Os efeitos dos diferentes pHs (2.5 a 7.5) na solubilidade foram estudados na proteína do soro de leite (CPSL).

5.3.4. Determinação total de aminoácidos

Os aminoácidos totais foram determinados por cromatografia líquida de fase reversa (HART et al, 1986; HAGEN et al, 1989), após a etapa de hidrólise ácida -24h, acrescida de 20% HCl fenol, seguido de derivatização com fenilisotiocianato.

5.4. Análise Sensorial

A análise sensorial foi realizada através do teste de aceitação de consumidor adaptado para pacientes com Doença de Crohn pelos pacientes suplementados. (anexo 5). Foi utilizado escala hedônica facial de 9 pontos ancorada nos extremos esquerdo e direito nos termos "horrrível" e "ótimo" . Para o grupo de pacientes não suplementados foi realizado o teste de aceitação, como também foi avaliado notas aromáticas e sabores percebidos na amostra de suplemento, assim como avaliação da intenção de compra do produto (anexo 6)

5.4.1. Recrutamento e Seleção dos indivíduos para avaliação sensorial do suplemento da proteína de soro de leite

Foram convidados a participar do presente estudo indivíduos que possuíam doença de Crohn, de ambos os gêneros e com idade entre 16 e 62 anos e mediana de idade de 37 anos. O presente estudo foi desenvolvido no Gastrocentro da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), SP, Brasil, onde foram avaliados 2 grupos de indivíduos. Para o grupo 1 foram selecionados 54 pacientes com Doença de Crohn, os quais realizaram o teste de aceitação do suplemento em apenas uma sessão com relação aos atributos aroma, sabor e textura e, de acordo com os seguintes critérios de inclusão: 1. pacientes de ambos os sexos; 2. ter adesão regular ao seguimento clínico ambulatorial. Para o grupo 2 foram selecionados 22 pacientes com Doença de Crohn e de acordo com os seguintes critérios de inclusão: 1. pacientes de

ambos os sexos, 2. em terapia biológica com anti-TNF- α , administrada a intervalos de 2 meses, e utilizada em associação à azatioprina. 3. acometimento comprovado do intestino delgado; 4. não fumante ou drogadito; não estar usando outros medicamentos; 5. ter adesão regular ao seguimento clínico ambulatorial, de acordo com o registro do serviço. Os pacientes receberam a suplementação com a proteína do soro de leite e TGF- β durante 16 semanas, e realizaram a avaliação sensorial com relação aos mesmos atributos avaliados pelo grupo 1. As avaliações foram realizadas no próprio domicílio dos pacientes durante o tempo 1, tempo 2 e tempo 3. Os tempos foram definidos de acordo com o que se segue:

T0 - imediatamente antes da infusão do anti-TNF- α

T1 - 8 semanas após T0, imediatamente antes da infusão do anti-TNF- α

T2 - 8 semanas após T1

5.4.2. Preparação das amostras para avaliação sensorial do suplemento da proteína do soro de leite

O grupo 1 realizou o teste de aceitação avaliando o produto no ambulatório de DII, no Gastrocentro – Unicamp o qual foi previamente preparado diluindo-se 15 g do produto em 100 mL de água filtrada e à temperatura ambiente. O grupo 1, realizou o teste em cabines individuais e os testes foram realizados no período da manhã entre às 9h e 11h. Para o grupo 2, o suplemento em pó da proteína do soro de leite e TGF- β foi embalado em sachês de 15 g, onde foi sugerido aos pacientes acrescentarem ao mesmo 100 mL de água ou algum suco de sua preferência

5.5. Avaliação Nutricional

5.5.1. Suplementação Alimentar

A suplementação alimentar com o produto de concentrado de proteínas do soro de leite bovino enriquecido com TGF- β foi de 50% da recomendação de proteínas proposta pela Recommended Dietary Allowances (RDA, 1989).

O registro alimentar de três dias foi aplicado em dias diferentes, 3 vezes para cada indivíduo antes do início da suplementação, (Anexo 7). Essa avaliação foi feita para investigar a alimentação dos pacientes com doença de Crohn. A alimentação habitual foi questionada, incluindo quantidade, marca comercial e preparação de cada alimento e para isso foi utilizado um álbum fotográfico, onde os pacientes podiam comparar o tamanho e quantidade de suas porções. Por meio desse método, avaliou-se a ingestão energética (Valor Energético Total – VET); a porcentagem de carboidratos, proteínas e lipídios, em relação ao VET ingerido; a porcentagem de gorduras saturadas, polinsaturadas e monoinsaturadas, em relação ao VET consumido; conteúdo de fibras, vitamina A, vitamina D, vitamina C e vitamina E, vitamina B12, folato, cálcio, ferro, zinco, potássio e sódio. Os cálculos foram realizados pelo *software* AVANUTRI versão 3.1.4, tendo como base a Tabela de composição de Alimentos (TACO). Para estimar a adequação na proporção de carboidratos, proteínas e lipídeos, foi utilizada a Tabela da WHO/FAO, 2003. Para avaliação da adequação quanto à ingestão de micronutrientes utilizou-se a DRI (2002), como parâmetro de comparação.

Para investigar a adequação da ingestão de energia, foi utilizada a equação de Harris e Benedict, modificada por Long, et al., 1979.

Homens: $(TMB)^* = 66 + (13,7 \times \text{massa em Kg}) + (5 \times \text{altura em cm}) - (6,8 \times \text{idade em anos})$

Mulheres: $TMB^* = 655 + (9,6 \times \text{massa em Kg}) + (1,7 \times \text{altura em cm}) - (4,7 \times \text{idade em anos})$

*TMB = taxa metabólica basal

Para avaliar o consumo qualitativo, utilizou-se o Questionário de Frequência de Consumo Alimentar (QFA) (Anexo 8). Conforme descrito no questionário foi testado previamente no público sujeito, e incluía 135 alimentos que foram separados em 11 grupos: sopas e massas, carnes e peixes, leite e derivados, leguminosas e ovos, arroz e tubérculos, verduras e legumes, molhos e temperos, frutas, bebidas, pães e biscoitos, doces e sobremesas.

A frequência do consumo foi avaliada da seguinte forma: diária (quando o alimento era consumido todos os dias, o número de vezes que era ingerido e

o tamanho da porção), semanal (quando era consumido toda semana, o número de vezes que era ingerido na semana e o tamanho da porção) e mensal (quando era consumido todo mês, o número de vezes que era consumido durante o mês e o tamanho da porção).

5.5.2. Avaliação do Estado Nutricional

As pregas cutâneas bicipital, tricipital, subescapular e suprailíaca foram medidas nos tempos T0, T1 e T2 com um compasso de dobras cutâneas *Lange*, conforme procedimento descrito por DURNIN & RAHMAN (1967).

5.6. Avaliação Clínica dos pacientes durante a intervenção suplementar

5.6.1. Avaliação da morbidade

Foi utilizado o Escore Clínico baseado na presença e intensidade de sintomas (diarréia, dor abdominal, humor, sinais extra-digestivos), segundo, Best (1979), conforme descrito no Anexo 9.

5.6.2. Coleta das amostras de sangue

As amostras de sangue, para realização dos testes laboratoriais, foram coletadas nos seguintes tempos:

T0 - imediatamente antes da infusão do anti-TNF- α

T1 - 8 semanas após T0, imediatamente antes da infusão do anti-TNF- α

T2 - 5 semanas após T1.

Os testes laboratoriais foram realizados no Centro de Investigação em Pediatria (CIPED) e no Laboratório de Patologia Clínica, da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

Foram coletados 20 mL de sangue de veia periférica para realização dos seguintes exames:

- Hemograma;
- Dosagem de H₂O₂;
- Dosagem de glutathiona.

5.6.3. Glutathiona eritrocitária

A concentração de GSH nos eritrócitos foi determinada através de modificação do método descrito por Beutler et al. (1986). Os eritrócitos de sangue periférico foram lisados com água destilada e, em seguida, as proteínas presentes foram desnaturadas com solução de ácido metafosfórico glacial. Após incubação por 5 minutos, a solução foi filtrada. Foi acrescentado a 1 mL do filtrado, 4 mL de fosfato de sódio 0,3M. Após leitura em espectrofotômetro a 412 nm (DO1), foi adicionado 100 µL de solução de 5,5'-dithiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) e, uma segunda densidade ótica (DO2) foi obtida.

A concentração percentual da GSH nos eritrócitos foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{GSH (mg/dL)} = \frac{(\text{DO2}-\text{DO1}) \times 31040}{\% \text{ de Hematócrito}}$$

Onde:

DO1= Densidade ótica da amostra antes da adição do DTNB.

DO2= Densidade ótica da amostra após a adição do DTNB.

31040= Coeficiente de extinção molar do DTNB

5.6.4. Dosagem de H₂O₂ por citometria de fluxo

Realizou-se pela técnica de EMMENDÖRFFER *et al.* (1990) modificada, que determina a produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) em granulócitos, por meio de citometria de fluxo utilizando a dihidrorhodamina 123 (DHR 123) como substrato. Nessa reação a DHR 123 é oxidada pelo peróxido de hidrogênio em rhodamina, que é fluorescente e pode ser detectada e medida por citometria de fluxo (RICHARDSON *et al.*, 1998). Segue a seguir uma breve descrição do método. Utilizou-se 1mL de sangue total heparinizado (Vacuette®, Brasil), do qual foram separadas 3 alíquotas, cada uma com 100 µL, onde apenas uma recebeu estímulo com 4µL (10µL/mL) de Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA). As amostras foram incubadas à 37°C por 10min. Posteriormente, 2µL (10µg/mL) de DHR123 foram adicionados à alíquota estimulada e a uma das alíquotas sem estímulo. Incubou-se à 37°C por 5min. As alíquotas foram lavadas com 3 mL de PBS (tampão fosfato salino – pH 7,4),

centrifugadas por 5min à 2200rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pelete* recebeu 3mL de solução de lise (NH₄Cl 0,15M, KHCO₃ 10mM e EDTA 4Na 37mg/L). Incubou-se à 37°C por 7min, seguindo-se centrifugação por 5min à 1000rpm. Novamente o sobrenadante foi descartado e as células remanescentes foram ressuspensas em 350µL tampão de lavagem (PBS com 1% de soro bovino fetal inativado pelo calor e 0,1% de azida sódica) para posterior leitura. As amostras foram denominadas da seguinte forma: estimulada (sangue + PMA + DHR123) e produção basal (sangue + DHR123). Representação esquemática desta parte da metodologia no Anexo 10. A leitura foi feita em citômetro de fluxo Coulter XL-MCL (Beckman-Coulter, EUA), onde foram registrados 30.000 eventos para posterior análise no programa computacional EXPO 1.0 (Beckman-Coulter, Flórida, EUA) conforme descrito na Figura 2.

Para a análise dos dados, primeiramente foi feita a identificação dos granulócitos por meio de um *gate* (A1, A2 e A3). Posteriormente avaliou-se a produção basal de ROS (1), ou seja, a quantidade de células fluorescentes (C1) que são produtoras de radicais livres mesmo na ausência de qualquer estímulo. Por fim, verificou-se o máximo de produção de ROS suportado pela célula (2), mediante ao forte estímulo do PMA. Os dados foram expressos em percentual de produção basal de ROS (C1) e razão entre (D2) por (D1), que representa a capacidade máxima de produção celular de ROS (Figura 2).

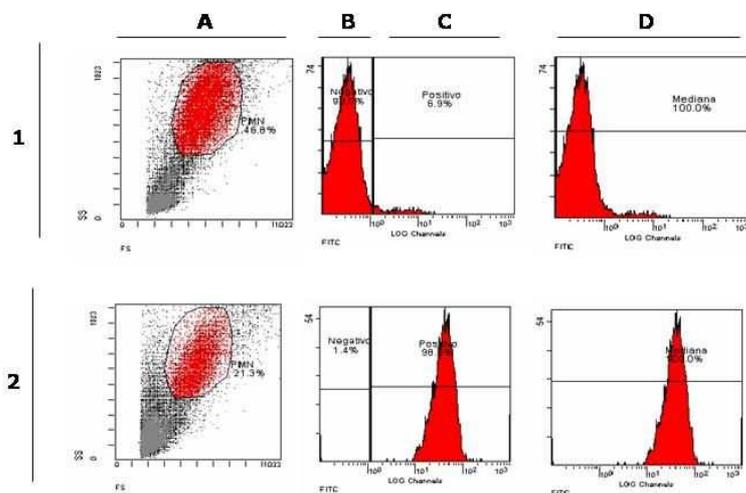


Figura 2. Análise, por citometria de fluxo, da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos granulócitos, onde, 1 é a produção basal de ROS (sem estímulo) e 2 é a amostra estimulada, com o máximo de produção de ROS suportado pela célula. A é o gate para a separação de granulócitos dos demais tipos celulares, B é a porção de células não fluorescentes, C é a porção de células fluorescentes e D representa a mediana de fluorescência.

5.6.5. Análise Estatística

Para comparar variáveis numéricas entre dois grupos independentes utilizou-se o Teste de Mann Whitney e entre três grupos independentes utilizou-se o teste Friedman. Para comparar o mesmo grupo em tempos diferentes utilizou-se o teste de Wilcoxon, adotando-se o nível de significância p inferior a 0,05. Os dados foram analisados no programa SPSS for Windows 15.0 (SPSS Inc., Chicago Illinois). Os Valores do QFA, para os alimentos mais consumidos, foram avaliados de acordo com a sua frequência diária, semanal ou mensal e processados no programa Microsoft Excel, 2002 (10.2614.2625) – Brasil.

As análises descritivas das variáveis foram apresentadas como média e desvio padrão, mediana, valores mínimo e máximo.

Resultados

6.Resultados

6.1. Avaliação Nutricional

Foram avaliados 42 pacientes com Doença de Crohn sendo, 22 do grupo suplementado e 20 do grupo sem suplemento. No grupo suplementado, 17 pacientes eram do gênero masculino (77,27%) e 5 do gênero feminino (22,72%), com mediana de idade de 37 anos e variação de 16 a 62 anos.

De acordo com o hábito alimentar dos 42 pacientes, apresentamos na Tabela 2 a adequação da ingestão de energia e nutrientes em relação aos valores de referência.

Tabela 2. Avaliação da ingestão e adequação de energia e nutrientes, segundo os valores de referência em 42 pacientes.

Nutrientes	Adequado	Abaixo	acima
Carboidratos	23 (54,7%)	19 (45,2%)	-
Proteínas	12 (28,6%)	13 (30,9%)	17 (40,5%)
Lipídeos	31 (73,8%)	3 (7,1%)	8 (19,0%)
Gordura saturada	8 (19,0%)	-	34 (81,0%)
Gordura monoinsaturada	27 (64,9%)	-	15 (35,7%)
Gordura Polinsaturada	38 (90,5%)	1 (2,3%)	3 (7,1%)
Fibras	12 (28,6%)	29 (69,0%)	1 (2,3%)
Vitamina A	3 (7,1%)	23 (54,8%)	15 (35,7%)
Vitamina D	3 (7,1%)	33 (78,6%)	6 (14,9%)
Vitamina C	3 (7,1%)	25 (59,5%)	14 (33,3%)
Vitamina E	4 (9,5%)	26 (61,9%)	12 (28,6%)
Vitamina B12	5 (11,9%)	12 (28,6%)	25 (59,5%)
Cálcio	-	28 (66,7%)	14 (33,3%)
Ferro	-	31 (73,8%)	11 (26,2%)
Folato	-	42 (100%)	-
Zinco	4 (9,5%)	17 (40,5%)	21 (50%)
K	-	42 (100%)	-
Na	6 (14,3%)	24 (57,1%)	12 (28,6%)

Observou-se que 28,6% dos pacientes apresentavam a adequação no consumo de proteínas e 40,5% consumiram proteínas em quantidades acima do recomendado de acordo com (WHO/OMS, 2003). O consumo inadequado de proteínas vem reforçado também nos dados de frequência alimentar com baixo consumo de peixe, frango e lentilha entre outros, porém consumo acima do recomendado para carne vermelha, leite, arroz e feijão (Tabela 3).

Em relação ao consumo de carboidratos (WHO/FAO, 2003), podemos observar que pouco mais da metade dos pacientes atingiu as necessidades recomendadas. Esse fato foi observado também na baixa frequência da ingestão das principais fontes de carboidratos. Mais de 2/3 dos pacientes apresentou consumo de fibras abaixo do recomendado. O consumo de lipídeos foi adequado na maioria dos pacientes (WHO/FAO, 2003). No entanto, o consumo das gorduras saturadas apresentou-se acima do recomendado na maioria dos pacientes avaliados.

Tabela 3. Frequência diária, semanal e mensal dos alimentos mais consumidos por 42 pacientes com Doença de Crohn.

Alimentos mais consumidos diariamente	fr	%	Alimentos mais consumidos semanalmente	Fr	%	Alimentos mais consumidos mensalmente	fr	%
Carne vermelha	2x	30	Sopas	2x	20	Salgados fritos	1x	35
Leite	2x	25	Macarrão com molho	1x	40	Salgados assados	1x	40
Feijão	2x	30	Polenta cozida	1x	15	Macarrão com carne	1x	35
Arroz	2x	55	Carne porco	1x	30	Pizza, panqueca...	2x	40
Sal	1x	35	Carne seca	1x	20	Lingüiça	2x	30
Maçã	1x	10	Embutidos	2x	30	Hambúrguer	1x	35
Mamão	1x	10	Frango	2x	30	Peixe	2x	45
Café/chá c açúcar	7x	15	Iogurte	1x	35	Lentilha	2x	25
Café/chá s açúcar	1x	35	Mussarela	4x	20	Feijoada	1x	40
Pão	1x	20	Queijo minas	2x	15	Batata assada	3x	20
Achocolatado	1x	25	Ovo	2x	30	Salada de maionese	2x	25
			Batata frita	2x	25	Refrigerante diet	1x	5
			Farinha de mandioca	2x	20	Cerveja	1x	20
			Alface	3x	35	Sanduiche	1x	20
			Cenoura	1x	20			
			Outros legumes	1x	20			
			Verduras cozidas	2x	20			
			Brócolis	2x	25			
			Óleos	4x	35			
			Maionese	1x	25			
			Laranja	2x	25			
			Banana	3x	20			
			Suco natural	3x	35			
			Suco industrializado	3x	30			
			Refrigerante normal	3x	35			
			Biscoito	3x	20			
			Biscoito recheado	1x	30			
			Bolo	1x	25			
			Manteiga no pão	3x	25			
			Chocolate	1x	25			
			Sobremesa	4x	25			
			Açúcar	6x	10			

Com relação à ingestão dos micronutrientes, observou-se ingestão abaixo do recomendado nas vitaminas A, C, D, E, e a maioria dos alimentos ricos em vitaminas não é consumida com frequência. A ingestão do folato encontrou-se abaixo do recomendado em todos os pacientes avaliados, enquanto a ingestão da vitamina B12 foi superior às doses recomendadas em 59% dos pacientes. Na presente casuística foi observado baixo consumo de cálcio, ferro e potássio. A ingestão de vitamina D também não atingiu a recomendação mínima.

6.2. Composição Corporal

A composição corporal do grupo suplementado com proteína do soro de leite por 16 semanas apresentou diferença significativa entre os tempos 1, 2 e 3, teste de Friedman. Houve redução da porcentagem de gordura e da gordura absoluta (Kg), assim como o aumento da massa magra (kg), conforme mostrado na Tabela 4.

Tabela 4. Influência da suplementação nutricional com a proteína do soro de leite e TGF- β , sobre o Índice de massa corporal (IMC), % de gordura, gordura Absoluta (Kg) e massa magra (Kg) do grupo suplementado e grupo controle sem suplemento.

Composição Corporal	Grupo Suplementado*			Grupo Controle**	
	Tempo			Tempo	
	1	2	3	1	2
IMC	23,1	22,6	22,1	25,1	25,7
Massa Magra (kg)	50,43	53,71	55,93	51,43	51,53
% Gordura	19,6	17,9	16,6	29,8	30,08
Gordura Absoluta (kg)	13,2	11,9	11	22,5	22,78

*Grupo suplementado: valores correspondentes às médias nos três tempos, com diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Friedman. Tempos: **T0** - imediatamente antes da infusão do anti-TNF- α ; **T1** - 8 semanas após T0, imediatamente antes da infusão do anti-TNF- α ; **T2** - 8 semanas após T1.

Grupo controle sem suplemento: Valores correspondentes as médias nos dois tempos, não apresentando diferença significativa ($p > 0,05$) de acordo com o teste de Friedman. Tempos: **T0- imediatamente antes da infusão do anti-TNF- α ; **T2** - 16 semanas após T0.

De acordo com a tabela verifica-se que o grupo suplementado teve aumento de massa magra e diminuição de gordura, no grupo controle a composição corporal não apresentou nenhuma mudança durante o mesmo período de observação.

6.3. Caracterização e avaliação Sensorial do suplemento do concentrado da Proteína do soro de leite

6.3.1. Caracterização CPSL

A Tabela 5 apresenta a composição química do CPSL utilizado para formulação do suplemento analisado no presente estudo.

Tabela 5. Composição aproximada do CPSL.

Fonte	CPSL
Proteína (%) ^{1,2}	73.30 ± 0.43
Gordura (%) ^{1,2}	10,48 ± 0.03
Cinza (%) ^{1,2}	2.15 ± 0.33
Água (%) ^{1,2}	6.36 ± 0.01
Carboidrato (%) ^{2,3}	7.71± 0.01

¹ Valores correspondentes as médias (± DV) de três determinações.

² Valores expressos em base seca.

³ Calculo por diferença = 100 - (proteína + total gordura + cinza + água

O CPSL apresentou em sua composição alto valor protéico e baixo teor de carboidrato, apresentando um teor de proteína de 78,8% em base seca, justificando a classificação do produto como um concentrado protéico (Tabela 5).

Tabela 6. Aminoácidos totais (100g de proteína) da fonte protéica: proteína do soro de leite, comparado com as DRIs para aminoácidos essenciais em pré-escolares e adultos, segundo IOM (2002).

Aminoácidos (g/100g de proteína)	IOM-2002		CPSL
	Pre-escolares ¹	Adultos ¹	
Ac. Aspartico	*	*	10,16
Ac. Glutamico	*	*	16,95
Serina	*	*	5,18
Glicina	*	*	2
Histidina	1,8	1,7	1,79
Arginina		*	1,44
Treonina	2,7	2,4	6,22
Alanina	*	*	5
Prolina	*	*	5,9
Fenilalanina + Tirosina	4,7	4,1	5,47
Valina	3,2	2,9	5,64
Metionina + cistina	2,5	2,3	3,1
Cisteina		*	2,01
Isoleucina	2,5	2,3	6,49
Leucina	5,5	5,2	10,16
Lisina	5,1	4,7	9,32
Triptofano	0,8	0,6	*

¹Valores baseados no EAR (necessidade média estimada): EAR amino ácidos/EAR proteína; Crianças (1 a 3 anos) EAR proteína = 0.88 kg/day; adultos (> 18 anos) EAR proteína = 0.66 kg/dia.

*Aminoácido não determinado.

O grau de hidrólise encontrado foi de 10.11mM /g, sendo classificado como uma fonte de proteína de médio grau de hidrólise (7 a 15mm / g).

Tabela 7. Solubilidade do CPSL em diferentes valores de pH.

pH	CPSL ^{1,2} (%)solubilidade
2.5	71.56 ± 1.45 ^C
3.5	80.93 ± 0.53 ^A
4.5	77.54 ± 0.11 ^B
5.5	80.71 ± 0.28 ^A
6.5	81.18 ± 0.56 ^A
7.5	79.88 ± 0.72 ^A

¹ Valores correspondentes as médias (± DV) de três determinações.² Valores com Letras diferentes, apresentam diferença significativa. Valores com letras iguais, não apresentam diferença significativa de acordo com o Teste de Tuckett ($p > 0.05$).

A solubilidade do suplemento apresentou pequena variação nos valores de pH testados. A maior solubilidade ficou no pH 6,5 com diferença significativa apenas para o pH 2,5 e 4,5. Portanto a menor solubilidade foi observada no pH 2,5.

6.3.2. Influência da suplementação nutricional com a proteína do soro de leite e TGF- β , sobre o Índice de Atividade da Doença de Crohn.

A avaliação clínica dos pacientes foi realizada antes e após 16 semanas de suplementação utilizando-se o escore denominado índice de atividade da doença (IADC)****.

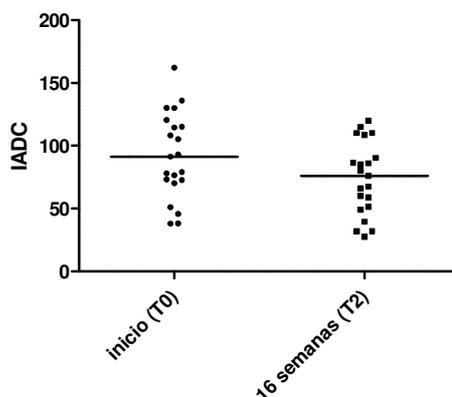


Figura 3. Avaliação clínica dos pacientes antes (T0) e após (T2) a suplementação com a proteína do soro de leite e TGF- β .

T0: antes de iniciar a suplementação

T2: após 16 semanas de suplementação

*** IADC: Índice de atividade da Doença de Crohn.

A importância nutricional do suplemento do soro de leite vem acompanhada da melhora observada pelos pacientes com Doença de Crohn suplementados durante 16 semanas, com diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Wilcoxon.

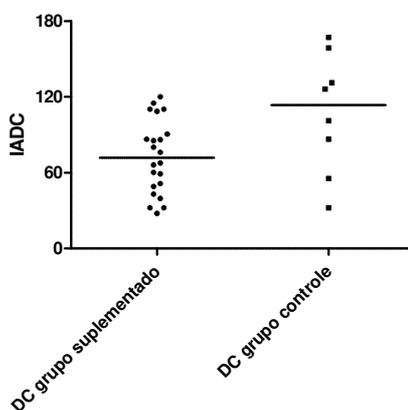


Figura 4. Avaliação clínica dos pacientes suplementados durante 16 semanas em comparação com os pacientes controles sem suplementação.

O Grupo suplementado em comparação ao Grupo controle (sem suplementação) apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Wilcoxon.

6.4. Avaliação sensorial

Grupo 1

De acordo com as médias de aceitação para o aroma, sabor e textura obtidos para o grupo 1, $n=54$ (avaliou sensorialmente o produto no ambulatório de DII, em uma única sessão) foi observado que a avaliação do

suplemento de uma maneira geral esteve entre os termos "mais ou menos" e "um pouco bom".

Tabela 8. Médias de aceitação dos atributos aroma, sabor e textura da amostra do suplemento da proteína do soro de leite com TGF- β (n=54 pacientes).

Atributos	Aceitação*
Aroma	5,3
Sabor	5,5
Textura	5,5

* Valores na escala: 1= horrível; 5=mais ou menos; 9= ótimo.

De acordo com a frequência de respostas para o atributo aroma do suplemento, 46,3% dos pacientes avaliaram como "horrível" a "pouco ruim" (valores entre 1 e 4), 25.9% como "mais ou menos" e 28% entre "um pouco bom" e "ótimo" (Figura 2). De fato, o aroma do suplemento foi caracterizado por apresentar notas desagradáveis de aroma como: "soja" (23% das respostas), "leite passado" (17%), "alimento cozido" (9%), "queijo", "leite em pó" e "grão" (8% das respostas em cada nota aromática), dentre outras. Observou-se que uma pequena parcela de citações estava associada a aromas agradáveis como "doce" (11%) e "baunilha" (6%).

Com relação ao sabor, a frequência de respostas foi bastante similar ao aroma: cerca de 28% dos pacientes gostaram do produto e 50% não gostaram. Adicionalmente, o sabor estava associado principalmente ao sabor de soja (24% das respostas), leite passado (16% das respostas), grão (10% das respostas), leite em pó (9% das respostas), alimento cozido e vômito (7% das respostas) e metálico (6% das respostas). Já com relação à textura, a aceitação foi um pouco melhor; cerca de 40% gostaram da textura da amostra contra 33% que não gostaram.

De maneira geral, pode-se observar que cerca de 30% dos indivíduos gostaram do suplemento com relação a todos os atributos avaliados, já metade deles não gostaram do mesmo e os outros 20-25% o classificaram como "mais ou menos", o que indica que o produto precisa ser melhorado principalmente com relação ao aroma e sabor.

Apesar da baixa aceitação do produto, 28% dos pacientes indicaram que “provavelmente comprariam” o suplemento e 22% que “certamente comprariam” o produto, o que indica uma boa intenção de compra. Isso pode ter ocorrido pela expectativa gerada em torno da possibilidade do suplemento ser importante no tratamento da doença de Crohn. Já 19% dos pacientes indicaram que “talvez comprasse, talvez não comprasse” o suplemento, 22% “provavelmente não comprariam” o produto e 9% “certamente não compraria”.

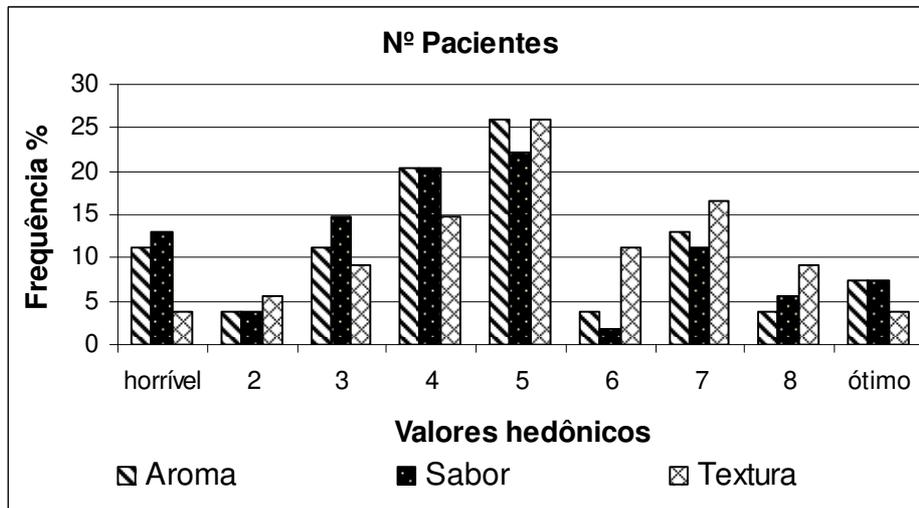


Figura 5. Distribuição dos pacientes em função dos valores hedônicos de aceitação do aroma, sabor e textura dados à amostra do suplemento de proteína do soro do leite e TGF- β .

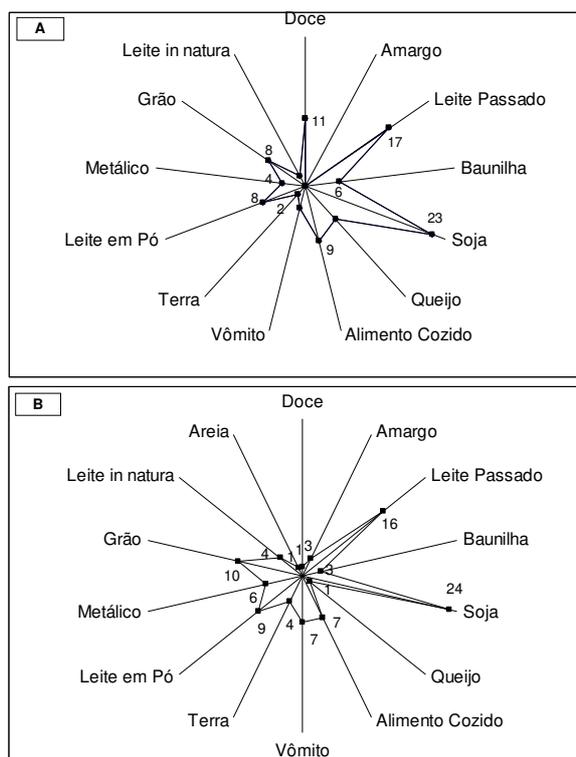


Figura 6. Frequência de citações das notas aromáticas percebidas (A) e sabores percebidos (B) pelos indivíduos no suplemento da proteína do soro de leite com TGF- β . (n=54 pacientes).

Grupo 2

Os resultados de aceitação do grupo 2 (grupo suplementado durante 16 semanas) foi similar a aceitação do grupo 1 no tempo T1, ou seja, após a primeira avaliação do produto pelos pacientes após feita a infusão e o produto ser avaliado em casa. Cerca de 50% dos indivíduos desgostaram do produto quanto ao aroma, sabor e textura.

As médias obtidas para o aroma do produto estiveram em torno de 5 o que equivale ao termo "mais ou menos" da escala hedônica; porém ao longo do uso do suplemento houve um acréscimo na aceitação do aroma e apesar deste aumento não ser significativo ($p > 0,05$) de acordo com teste de Friedman, podemos observar pelo gráfico de frequência (Figura 4) que 43% dos pacientes acharam o aroma do produto entre "um pouco bom" e "ótimo", ou seja, situaram-se na região de aceitação do mesmo. Já no tempo T1 apenas 25% dos pacientes gostaram do aroma do produto e no tempo T2 30% indicaram gostar do aroma.

Tabela 9. Médias de aceitação do **aroma, sabor e textura** do suplemento da proteína do soro de leite com TGF- β , durante a suplementação nos tempos 1, 2 e 3. (n=22 pacientes).

Suplemento	Aceitação*		
	T 1	T 2	T 3
Aroma	4,9 ^a (\pm 2,1)	5 ^a (\pm 1,9)	5,6 ^a (\pm 1,7)
Sabor	5 ^a (\pm 1,7)	5,2 ^a (\pm 1,9)	5,9 ^b (\pm 1,9)
Textura	5,1 ^a (\pm 1,6)	5,4 ^a (\pm 1,8)	5,3 ^a (\pm 2)

Tempos: **T1** - imediatamente após a primeira prova; **T2** - 8 semanas após T1; **T3** - 8 semanas após T2. Letras em comum na mesma linha indicam médias que não diferiram entre si a ($p > 0,05$) de acordo com o teste de Friedman. * (1= horrível; 5=mais ou menos; 9= ótimo).

Quanto ao sabor do suplemento, a aceitação aumentou ao longo do uso, havendo diferença significativa ($p < 0,05$) após 16 semanas, como pode ser observado pela Tabela 4. Cerca de 50% dos pacientes indicou gostar do sabor do produto (valores superiores a 6 na escala), já sua rejeição ficou ao redor de 14% apenas. Para textura não houve diferença significativa de aceitação ($p > 0,05$) ao longo das 16 semanas de uso do suplemento, sendo a média de aceitação em torno de 5.0, o que equivale ao termo "mais ou menos" na escala.

Os resultados com o grupo 2 indicaram que ao longo da suplementação aumentou a aceitação quanto ao sabor do produto o que pode ser decorrência também do bem-estar promovido pela ingestão do mesmo, o que pode ser comprovado com o resultado obtido com a diminuição do Índice de Atividade da Doença com diferença significativa ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Friedman, indicando uma melhora na saúde destes pacientes com o uso contínuo do suplemento (Tabela 5).

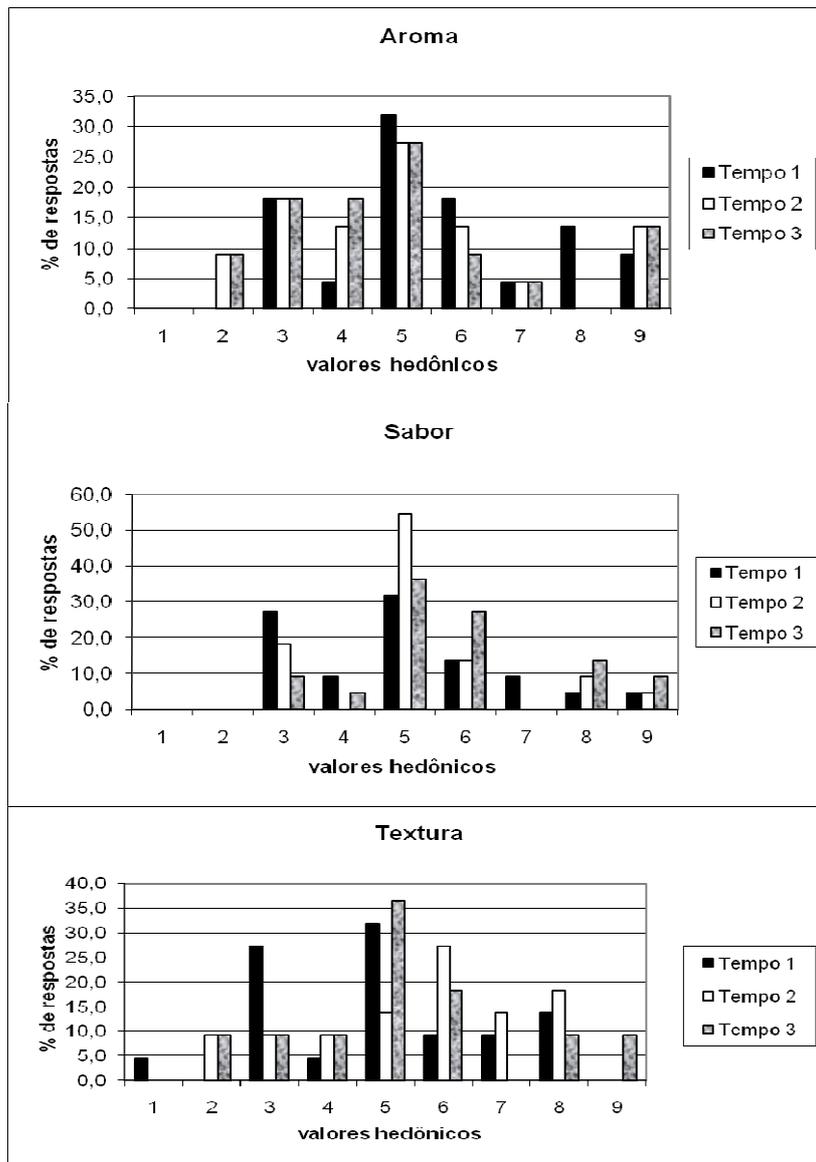


Figura 7. Distribuição dos pacientes em função de valores hedônicos de aceitação do aroma, sabor e textura dados à amostra do suplemento da proteína do soro de leite e TGF- β nos tempos 1, 2 e 3.

6.5. Avaliação Imunológica

6.5.1. Hemograma

A mediana da característica Hematológica de pacientes com Doença de Crohn antes e após a suplementação, esta apresentada na Tabela 10.

Tabela 10. Características hematológicas de pacientes com Doença de Crohn antes (T0) e após (T2) a suplementação com o concentrado da proteína do soro de leite.

Parâmetro hematológico	T0	T2	p ^a
	Mediana Mínimo - Máximo	Mediana Mínimo - Máximo	
WBC (x10 ³ /mm ³)	7,31 3,22-11,40	6,49 3,42-9,56	0,396
LINF (x10 ³)	1,66 0,56-2,76	1,91 0,59-3,24	0,045
MONO (x10 ³)	0,62 0,29-0,95	0,79 0,28-1,31	0,695
RBC (x10 ⁶ /mm ³)	4,35 3,4-5,31	4,36 3,31-5,42	0,372
HCT (%)	37,85 29,5-46,2	36,6 27-46,2	0,962
HGB (g/dL)	12,15 8,1-16,2	11,1 7-15,2	0,727
MCH (pg)	26,45 19,7-33,2	25,25 17,2-33,3	0,9
MCHC (g/dL)	31,6 27,5-35,7	30,9 25,9-35,9	0,445
MCV (fL)	79,5 60,9-98,1	79,9 62,7-97,1	0,438

p^a: Teste de Wilcoxon; WBC: leucócitos; LINFO: Linfócitos; MONO: Monócitos; RBC: Glóbulos vermelhos; HGB: Concentração de Hemoglobina; HCT: hematócrito; MCH: Volume corpuscular médio; MCHC: Concentração corpuscular média; MCV: Volume corpuscular médio.

- Aumento de linfócitos T0 (antes da suplementação) X T2 (após a suplementação, ($p=0,045$, teste de Wilcoxon).
- Não houve diferença significativa nos demais parâmetros Hematológicos.

6.6. Glutaciona Eritrocitária

Figura 8 compara a concentração média de GSH nos eritrócitos, de indivíduos saudáveis e de pacientes com DC.

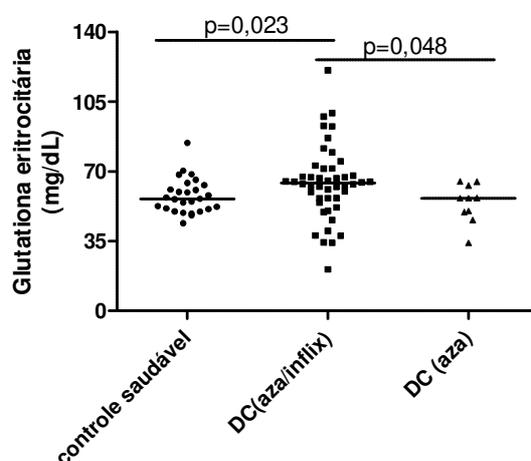


Figura 8. Concentração de glutaciona nos eritrócitos (mg/dL).

- Houve diferença entre os três grupos ($p=0,027$, teste de Kruskal-wallis).
- Controle saudável X pacientes com DC em uso de azatioprina ($p=0,760$, não houve diferença significativa, teste de Mann-Whitney).
- Controle saudável X pacientes com DC em uso de azatioprina e infliximab ($p=0,023$, teste de Mann-Whitney)
- pacientes com DC em uso de azatioprina X pacientes com DC em uso de azatioprina e infliximab ($p=0,048$, teste de Mann Whithney).

Figura 9 compara a concentração média de GSH nos eritrócitos, de indivíduos saudáveis e de pacientes com DC após 16 semanas de suplementação e em uso de azatioprina e infliximab em relação ao grupo controle sem suplementação.

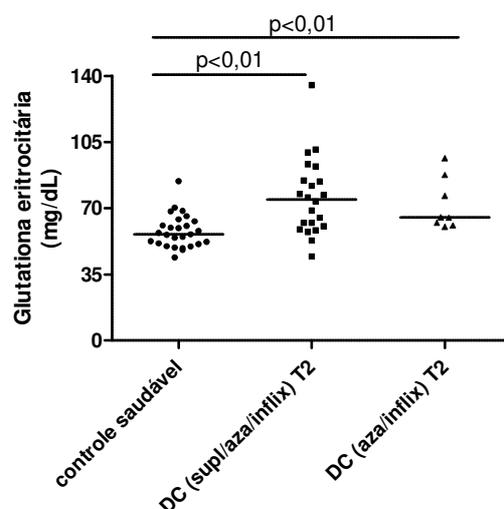


Figura 9. Concentração de glutatona nos eritrócitos (mg/dL).

- Houve diferença entre os três grupos ($p=0,01$, teste de Kruskal-wallis), com maior concentração de GSH dos pacientes suplementados e em uso de azatioprina e infliximab em relação ao grupo saudável.
- Controle saudável X pacientes com DC após 16 semanas de suplementação em uso de azatioprina e infliximab ($p<0,01$, diferença significativa entre os grupos, teste de Mann Whitney).
- Controle saudável X pacientes com DC após 16 semanas sem uso de suplementação e tratamento com azatioprina e infliximab ($p<0,01$, diferença significativa entre os grupos, teste de Mann Whitney).
- pacientes com DC após 16 semanas de suplementação em uso de azatioprina e infliximab X Pacientes com DC após 16 semanas sem uso de suplementação e tratamento com azatioprina e infliximab ($p=0,870$, teste de Mann Whitney).

Figura 10 compara a concentração média de GSH nos eritrócitos de pacientes com DC antes de iniciar a suplementação e após 16 semanas de suplementação.

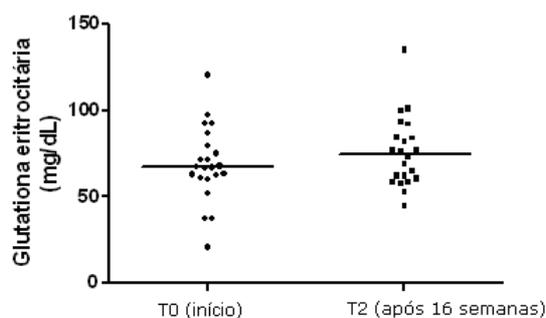


Figura 10. Concentração de glutatona nos eritrócitos (mg/dL). Comparação no grupo suplementado antes de iniciar a suplementação e após a suplementação.

- T0 - Antes de iniciar a suplementação X T2 - após 16 semanas de suplementação ($p=0,355$, não houve diferença significativa entre os grupos, Teste de Wicoxon).

Figura 11 apresenta a comparação entre a concentração média de GSH nos eritrócitos de pacientes com DC sem uso da suplementação e durante o período de 16 semanas.

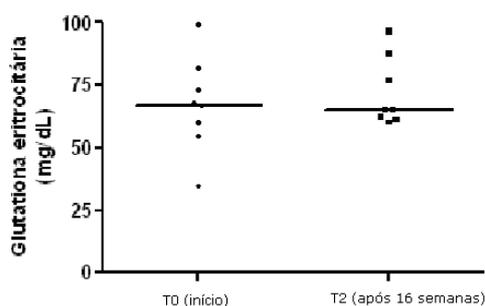


Figura 11. Concentração de glutatona nos eritrócitos (mg/dL). Comparação no grupo controle sem a suplementação.

- Início X Após 16 semanas ($p=0,575$, não houve diferença significativa entre os grupos, Teste de Wicoxon).

6.7. Liberação de Radicais Intermediários do Oxigênio pelos Granulócitos

Figura 12 apresenta comparação entre o controle saudável e pacientes com DC em uso de azatioprina e infliximab e apenas azatioprina sem suplementação com o concentrado da proteína do soro de leite.

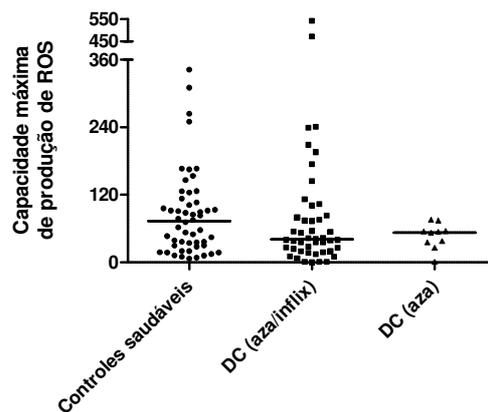


Figura 12. Capacidade máxima de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos granulócitos de controles saudáveis e pacientes com DC em uso de azatioprina e infliximab e apenas azatioprina.

- Não houve diferença entre os três grupos ($p=0,278$, teste de Kruskal-Wallis)

A produção basal de ROS de pacientes com DC entre controle saudável e pacientes com DC em uso de azatioprina e infliximab e apenas azatioprina sem suplementação com a proteína do soro de leite

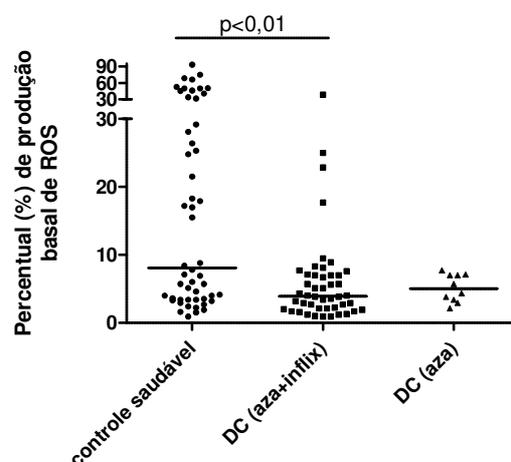


Figura 13. Percentual basal de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos granulócitos de pacientes com DC e de controles saudáveis

- Houve diferença entre os três grupos (teste de Kruskal-wallis $p=0,01$). O controle saudável apresentou percentual (%) de produção basal de ROS elevado em relação aos pacientes com DC em tratamento com azatioprina e infliximab e apenas azatioprina.
- Controle saudável X pacientes com DC em uso de azatioprina e infliximab ($p<0,01$, diferença significativa, teste de Mann Whitney).
- Controle Saudável X pacientes com DC em uso de azatioprina ($p=0,102$, diferença significativa entre os grupos, teste de Mann Whitney).
- Pacientes com DC em uso de azatioprina e infliximab X pacientes com DC em uso de azatioprina ($p=0,441$, teste de Mann Whitney)

Figura 14 apresenta comparação entre os controles saudáveis e pacientes suplementados por 16 semanas com o concentrado da proteína do soro de leite em uso de azatioprina e infliximab e pacientes sem a suplementação, mas em uso de azatioprina e infliximab.

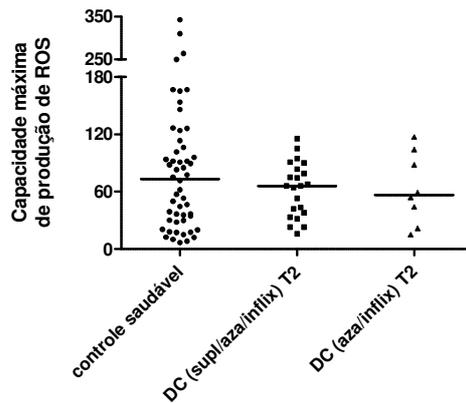


Figura 14. Capacidade máxima de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos granulócitos de controles saudáveis e pacientes com DC em uso de azatioprina e infliximab suplementados e não suplementados.

- Não houve diferença entre os três grupos ($p=0,768$, teste de Kruskal-Wallis)

Produção basal de ROS em comparação com o grupo controle saudável e o grupo de pacientes suplementados há 16 semanas com a proteína do soro de leite em uso de azatioprina e infliximab e pacientes sem a suplementação, e em uso de azatioprina e infliximab.

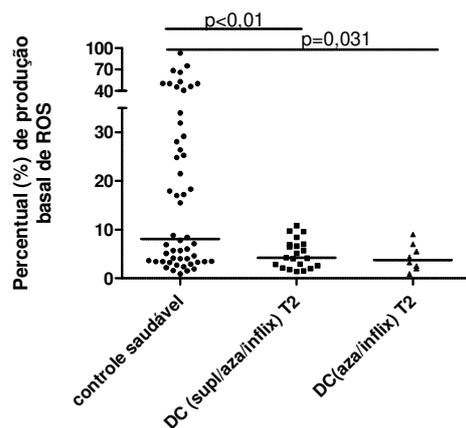


Figura 15. Percentual basal de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos granulócitos de controles saudáveis e pacientes com DC em uso de azatioprina e infliximab suplementados e não suplementados.

- Houve diferença entre os três grupos (teste de Kruskal-wallis $p < 0,01$). O controle saudável apresentou percentual (%) de produção basal de ROS elevado em relação aos pacientes com DC após 16 semanas de suplementação e em tratamento com azatioprina e infliximab e pacientes com DC apenas com azatioprina, após 16 semanas, porém sem suplementação.
- Controle saudável X pacientes com DC suplementados e em uso de azatioprina e infliximab ($p < 0,01$, diferença significativa, de acordo o teste de Mann Whitney).
- Controle saudável X pacientes com DC sem suplementação e em uso de azatioprina e infliximab ($p = 0,031$, diferença significativa, teste de Mann Whitney).
- pacientes com DC suplementados e em uso de azatioprina e infliximab X pacientes com DC sem suplementação e em uso de azatioprina e infliximab ($p = 0,626$, não houve diferença significativa, teste de Mann Whitney).

A figura 16 mostra a comparação entre os pacientes suplementados em uso de azatioprina e infliximab antes (T0) e após a suplementação (T2).

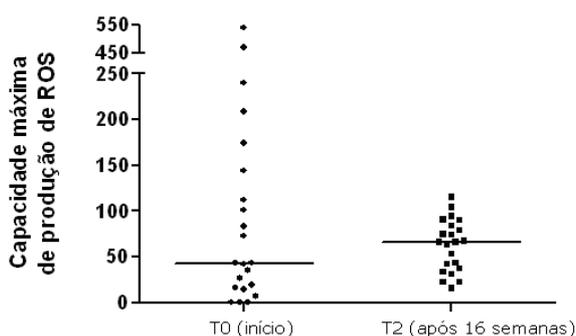


Figura 16. Capacidade máxima de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos granulócitos de pacientes com DC em uso de azatioprina e infliximab antes (T0) e após (T2) a suplementação.

- Pacientes suplementados antes (T0) e após 16 semanas de suplementação (T2). De acordo com o Teste de Wilcoxon ($p=0,394$), não houve diferença significativa no início e final da suplementação.

Figura 17 mostra produção basal de ROS dos pacientes suplementados em uso de azatioprina e infliximab antes (T0) e após a suplementação (T2).

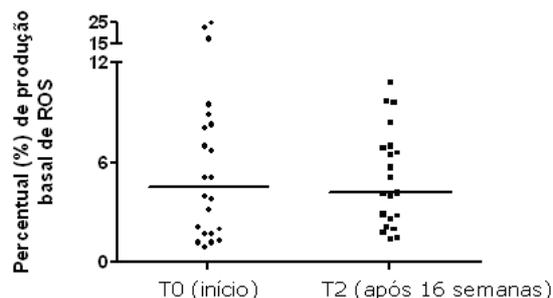


Figura 17. Percentual basal de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos granulócitos de pacientes com DC suplementados antes (T0) e após (T2) a suplementação.

- Pacientes suplementados antes (T0) e após 16 semanas de suplementação (T2). De acordo com o Teste de Wilcoxon ($p=0,689$), não houve diferença significativa entre os tempos.

Figura 20 mostra a comparação entre os pacientes não suplementados e em uso de azatioprina e infliximab durante o período de 16 semanas.

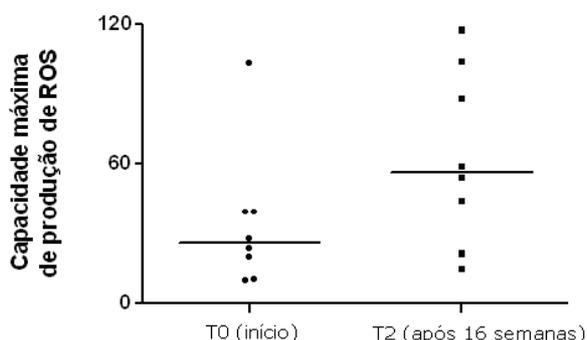


Figura 18. Capacidade máxima de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos granulócitos de pacientes com DC em uso de azatioprina e infliximab sem suplementação e durante 16 semanas.

- Pacientes não suplementados antes (T0) X após 16 semanas (T2), (p=0,161, não houve diferença significativa, Teste de Wilcoxon).

Produção basal de ROS mostra a comparação entre os pacientes não suplementados e em uso de azatioprina e infliximab durante o período de 16 semanas.

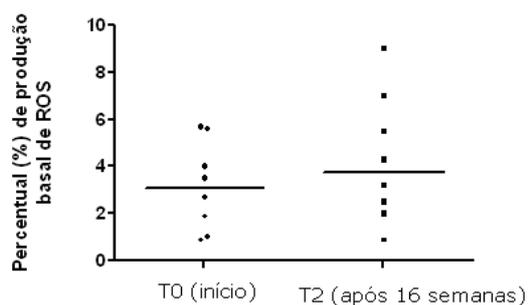


Figura 19. Percentual basal de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos granulócitos de pacientes com DC em uso de azatioprina e infliximab sem suplementação e durante 16 semanas.

- Pacientes com DC não suplementados antes (T0) X após 16 semanas (T2), (p=0,674, não houve diferença significativa, teste de Wilcoxon).

Discussão



7. Discussão

Este estudo tem grande importância por ser prospectivo de intervenção nutricional, no qual se avalia os efeitos de um concentrado protéico de soro de leite enriquecido com TGF- β , oferecido por via oral a pacientes com DC. Pouquíssimos trabalhos foram encontrados nesta área de conhecimento.

A maioria dos pacientes com DC apresentou ingestão inadequada de proteínas e micronutrientes. Essa inadequação provavelmente pode ocorrer, pois a Doença de Crohn colabora para má absorção com diminuição da área absorptiva (doença, ressecções), deficiência de sais biliares, super crescimento bacteriano, estreitamento gastrointestinal e estenoses que levam ao edema, inflamações e ressecções cirúrgicas. Para agravar este quadro, os pacientes apresentam frequentemente ansiedade e medo de comer relacionados às experiências como dor abdominal, inchaço, náusea ou diarreia que contribuem para comprometer o estado nutricional (CUPPARI, 2006). Devido a esse conjunto de fatores, os pacientes com DC comumente apresentam déficits de micronutrientes e desnutrição protéico-calórica (Rodrigues, 2008), o que reforça o baixo consumo de proteínas observado em 30% dos nossos pacientes.

Verificou-se que 45% dos pacientes avaliados não atingiram as necessidades recomendadas de carboidratos, porém, 55% atingiram a adequação no consumo. Essa baixa adequação pode estar associada com possíveis problemas individuais de intolerância ao consumo de determinados alimentos. RAZACK (2007), realizou um trabalho onde o consumo de açúcares refinados foi associado com o aumento do risco do desenvolvimento de Doenças Inflamatórias Intestinais, pois carboidratos de cadeia curta e poliois poderiam aumentar a susceptibilidade para DC, uma vez que promovem o crescimento de bactérias do intestino delgado, resultando em aumento da permeabilidade e desencadeamento da DC em indivíduos geneticamente susceptíveis (GIBSON, 2005). Quando analisamos a frequência alimentar pelos pacientes na Tabela 3, observamos consumo relativamente baixo de

carboidratos complexos e predomínio de ingestão de carboidratos simples, o que representa ingestão de fibras abaixo do recomendado.

Estudo mais recente mostrou que o consumo de fibras é muito importante nos pacientes com DC, pois além de serem fonte de energia para os colonócitos, podem inibir a formação de mediadores inflamatórios (SERRANO, 2007). Estudos "in vivo" demonstraram que o butirato inibe a formação de mediadores pro inflamatórios, como o fator de necrose tumoral alfa, e a atividade enzimática óxido nítrico sintetase (RODRIGUES-CABEZAS, 2002). A baixa ingestão de fibras é um problema que ocorre não só nos pacientes com DC, mas também na população saudável. Estudo na população adulta brasileira constatou baixo consumo de fibras. As práticas alimentares revelaram que a dieta é constituída por alimentos pobres em fibras alimentares (MATTOS, 2000). Outro estudo utilizando os dados do ENDEF-1974/759 registrou que a dieta da população de três capitais – Rio de Janeiro, São Paulo e Porto Alegre apresentaram baixo consumo de fibras alimentares. O baixo consumo de fibras entre os pacientes com DC pode ser resultado de uma cultura alimentar brasileira, que utiliza na dieta habitual alimentos com fontes pobres de fibras.

Em relação à ingestão de lipídeos observou-se que a maioria dos pacientes teve consumo adequado, sendo acompanhado pela adequação das gorduras monoinsaturadas e poliinsaturadas, porém o consumo da gordura saturada apresentou-se acima do recomendado. Segundo HOU & SELLIN (2010) a quantidade e qualidade do consumo de gordura estão associadas ao aumento do risco de Doenças Inflamatórias Intestinais, porém, as gorduras poliinsaturadas, como o Omega-3 e Omega-6, são metabolizadas em compostos antiinflamatórios, podendo ter efeito benéfico nos portadores da inflamação intestinal.

O consumo das vitaminas A, C, D e E esteve abaixo do recomendado, em razão da baixa freqüência de consumo dos alimentos ricos nestas vitaminas (Tabela 3). O questionário de freqüência alimentar (QFA) é considerado como o método mais prático e informativo de avaliação da ingestão dietética e

fundamentalmente importante em estudos epidemiológicos que relacionam a dieta com a ocorrência de doenças crônicas (SLATER, 2004).

As complicações mais freqüentes geradas pelas deficiências nutricionais nas Doenças Inflamatórias Intestinais são a anemia e osteoporose. A osteoporose é causada pela deficiência de cálcio, vitamina D e vitamina K e a anemia, pode ter etiologia associada à perda crônica, inflamação duradoura e, sob o ponto de vista das deficiências nutricionais, desenvolve-se devido à deficiência do folato e vitamina B12 (HOW e SELLIN, 2010). Todos os pacientes avaliados em nosso estudo apresentaram consumo inadequado de folato necessitando, portanto aumentar seu consumo.

Na prática clínica, a avaliação do estado nutricional em pacientes com DC demonstra diminuição na ingestão alimentar global causada por anorexia, náuseas, vômitos, dor abdominal, diarreia e dietas restritas, o que torna comum a deficiência de alguns nutrientes. (RODRIGUES, 2008),

O aumento da massa magra pode ter ocorrido pela suplementação, pois, proteínas do soro apresentam concentrações elevadas de aminoácidos ramificados, que contribuem para a massa muscular. Em comparação a outras fontes protéicas, a proteína do soro possui a capacidade única de aumentar a produção de glutathiona, o que por sua vez leva a uma melhora na composição corporal, (BOUNOUS, 2000 e LANDS,1999). Vários estudos demonstram o efeito benéfico do soro do leite sobre a composição corporal em comparação direta com outras fontes de proteínas de alta qualidade. O aumento e/ou preservação muscular não somente melhora a composição corporal, como também contribui decisivamente para aumentar as chances de viver uma vida mais longa e mais saudável (INELMEN, 2003 e XAVIER PI-SUNYER, 2002).

As proteínas do soro são ricas em cálcio (aproximadamente 600mg/100g). Diversos estudos epidemiológicos têm verificado uma relação inversa entre a ingestão de cálcio, proveniente do leite e seus derivados, e a gordura corporal (CRIBB, 2006). Uma provável explicação seria que o aumento no cálcio dietético reduz as concentrações dos hormônios calcitrópicos, principalmente o 1,25 hidroxicolecalciferol. Em altas concentrações, esse hormônio estimula a transferência de cálcio para os

adipócitos. Nos adipócitos, altas concentrações de cálcio levam à lipogênese e à redução da lipólise. Portanto, a supressão dos hormônios calcitrópicos mediada pelo cálcio dietético, pode ajudar a diminuir a deposição de gordura nos tecidos adiposos, (HACK, 1997).

Quando comparamos o grupo suplementado com o grupo controle, observamos que o grupo suplementado teve um aumento de massa magra e diminuição de gordura, e no grupo controle não suplementado não foi observada mudança na composição corporal durante o mesmo período avaliado. O perfil de aminoácidos das proteínas do soro pode, possivelmente, favorecer o anabolismo muscular. Além disso, HA e ZEMEL, (2003), destacam que o perfil de aminoácidos das proteínas do soro é muito similar ao das proteínas do músculo esquelético, fornecendo quase todos os aminoácidos em proporção similar às existentes na musculatura esquelética, classificando esse suplemento como um efetivo suplemento anabólico.

Estudos demonstram que as proteínas do soro são absorvidas mais rapidamente que outras, como a caseína, por exemplo. Essa rápida absorção faz com que as concentrações plasmáticas de muitos aminoácidos, inclusive a leucina, atinjam altos valores logo após a sua ingestão (BOUTHEGOURD, 2003). Além de aumentar as concentrações plasmáticas de aminoácidos, a ingestão de soluções contendo as proteínas do soro aumenta, significativamente a concentração de insulina plasmática, o que favorece a captação de aminoácidos para o interior da célula muscular, otimizando a síntese e reduzindo o catabolismo protéico, (CALBET, 2002).

A composição do CPSL apresentou alto valor nutricional, devido ao alto teor de aminoácidos essenciais, especialmente os de cadeia ramificada, como observado na Tabela 6. Esses valores estão acima da média, quando comparados àqueles de outras fontes protéicas como, por exemplo: caseína, soja, ovo, arroz, feijão, carne de frango entre outras, fornecendo às proteínas do soro importantes propriedades nutricionais, podendo contribuir para a manutenção do estado nutricional para pacientes com doença de Crohn que muitas vezes carecem de suporte nutricional especial.

Devido ao perfil aminoacídico da proteínas do soro de leite, esta proteína é utilizada na formulação de vários produtos especiais, como fórmulas infantis (HAMBRAEUS, 1982), e para o desempenho do metabolismo muscular, devido ao alto teor de cadeia ramificada de aminoácidos essenciais, tais como leucina e isoleucina (STEELE & HARPER, 1990). Essas peculiaridades são extremamente importantes para os pacientes DC, devido ao hipermetabolismo e perda progressiva da massa magra com a evolução clínica da doença.

A proteína do soro do leite (CPSL) é a fonte proteica que melhor representa todas as recomendações de aminoácidos essenciais com base na norma do Instituto de Medicina (IOM, 2002) para todas as fases da vida (Tabela 6).

Os resultados para a solubilidade indicaram que o CPSL apresentou boa solubilidade em ampla faixa de pH (Tabela 7) o que é bastante vantajoso, pela possibilidade de ser utilizado na formulação de vários alimentos como bebidas fermentadas, sorvetes, cremes, entre outros (GWARTNEY *et al*, 2000); aumentando assim as possibilidades de consumo deste suplemento com alto valor nutricional.

O aroma e o sabor de soja, leite passado, baunilha, doce, amargo, queijo, alimento cozido, vômito, terra, leite em pó, metálico, grão e "leite in natura", percebidos pelos indivíduos, podem ser provenientes da oxidação lipídica e/ou reação de Maillard. Conforme alguns estudos, a oxidação lipídica contribui para a formação de off-flavours e perda de aromas/sabores desagradáveis em concentrado protéico de soro limitando assim sua utilização (WHITSON *et al*, 2010; TOMAINO *et al*, 2001; MORR e FOEGEDING, 1990). GRIGIONI (2008) através de *headspace*-SPME (micro extração em fase sólida) isolou e identificou 43 substâncias voláteis no CPSL, dentre as quais vários aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos. Esses voláteis podem contribuir com aromas/sabores desagradáveis percebidos no CPSL, como a 2-heptanona, 2-nonanona, 1-octen-3-ol, associados a aromas de papelão, metálico e mofo, respectivamente.

A formação de voláteis durante obtenção e estocagem de CPSL é difícil de controlar. Para a obtenção de CPSL com aroma/sabor mais suave seria

necessário padronizar as condições do processamento e estocagem do CPSL e assim obter um produto com melhor qualidade sensorial.

Talvez se o suplemento fosse consumido adicionando-se o mesmo em outros produtos como iogurtes, sobremesas lácteas etc, sua aceitação poderia aumentar entre os pacientes já que o aroma/sabores percebidos poderiam ser mascarados, o que não ocorreu no suplemento adicionado de água e/ou refresco. Desta forma, os benefícios obtidos através da suplementação continuariam a ser percebidos pelos indivíduos, entretanto com uma maior satisfação ao consumir o produto.

Vários estudos têm demonstrado que a nutrição enteral com suplementos protéicos melhora não só a condição nutricional dos pacientes, mas também ocorre melhora na inflamação intestinal e frequentemente recuperação da mucosa intestinal (SANDERSON e CROFT, 2005). Já o tratamento utilizando-se apenas corticosteróides apresenta efeitos limitados na mucosa (MODIGLIANI et al, 1990). Em crianças acometidas pela doença de Crohn a nutrição enteral exerce um papel fundamental no aumento do crescimento das mesmas, devido ao fornecimento de nutrientes extras aliados a melhora na inflamação intestinal (SANDERSON e CROFT, 2005). Em adultos com DC aguda a nutrição enteral tem grande eficácia tanto no alívio da doença, quanto na condição nutricional do indivíduo, podendo ser utilizada juntamente com outras terapias para o controle da DC (DRAY e MARTEAU, 2005). Assim é de grande importância estudos que avaliem e desenvolvam soluções orais mais bem aceitas pelos pacientes.

Esclarecemos que os participantes dessa pesquisa estavam sob terapia regular com AZA sozinha ou AZA combinada com anti-TNF α garantidos cem por cento pelo Sistema Único de Saúde (SUS), e o suplemento nutricional foi oferecido sem qualquer custo para o paciente. Entretanto, a adesão ao tratamento foi de 50% demonstrando a importância dos aspectos sensoriais do produto e do consentimento do paciente para essa adesão. Contudo, não foi objetivo dessa pesquisa avaliar dados sociais e afetivos dos participantes que pudessem interferir nessa adesão.

O grupo de pacientes com DC sob terapia com AZA mostrou valores de GSH similares aos dos indivíduos saudáveis e significativamente mais baixos do que os pacientes com AZA + Infliximab. Esses resultados associados com a produção significativamente mais baixa de espécies reativas de oxigênio ($p=0,031$) e baixos IADC indicam remissão clínica da DC no grupo que só recebia AZA.

O grupo que recebia a combinação terapêutica azatioprina mais anti-TNF α apresentou valores de espécies reativas do oxigênio significativamente mais baixas ($p<0,01$) e de GSH mais altos do que o grupo saudável ($p=0,023$) sendo mais forte ($p<0,01$) após 16 semanas de suplementação. Esse resultado somado à redução significativa do IADC vista no grupo com suplementação fortalece a reconhecida eficácia da combinação azatioprina mais anti-TNF α no tratamento da DC e demonstra pela primeira vez que azatioprina associada ao biológico anti-TNF- α foi capaz de controlar o balanço oxidante versus antioxidante na DC. Essa produção de ROS em relação ao grupo de controles saudáveis permaneceu adequado tanto na produção espontânea quanto na estimulada com PMA, sugerindo que os pacientes estudados encontravam-se com a doença inflamatória relativamente controlada. A eficácia e segurança da terapia com infliximab e AZA sozinhos ou em combinação para DC são desconhecidas. As infecções graves podem estar presentes em 3,9% dos pacientes sob terapia combinada, em 4,9% no grupo com infliximab apenas e em 5,6% nos pacientes com AZA sozinha (COLOMBEL et al, 2010).

Os níveis de ROS e GSH controlados antes da suplementação, caracterizavam que AZA sozinha ou AZA + infliximab era eficaz e segura Após a suplementação não houve diferença nesses valores, mas foi o suplemento quem favoreceu a melhora do IADC e do índice de massa corpórea.

A suplementação com agentes antioxidantes e/ou precursores da glutathiona vem sendo proposta como uma das alternativas para reduzir o stress oxidativo nestes pacientes (CANTIN *et al.*, 2007). Além disso, a suplementação com agentes capazes de modular a resposta inflamatória, ou

interferir na infecção crônica, pode trazer muitos benefícios aos pacientes e representam um desafio para os pesquisadores.

Conclusão

8. Conclusão

Deficiências nutricionais relacionadas à macro e micronutrientes são freqüentes em pacientes com DC, assim, a terapia deve considerar o papel da nutrição. Na população de estudo observou-se consumo adequado de carboidratos e lipídeos pela maioria dos pacientes. O consumo de proteína encontrou-se acima do recomendado por mais da metade dos pacientes. Constatou-se inadequação de ingestão para as vitaminas A, C, D, E, fibras alimentares, cálcio, folato, ferro e zinco. O consumo da vitamina B12 esteve acima do recomendado.

A suplementação com a proteína do soro de leite demonstrou efeito na composição corporal, com aumento de massa magra e diminuição de gordura corporal.

Com base nos resultados obtidos, estes pacientes devem ser orientados em relação ao consumo de nutrientes, enfocando a importância da suplementação para melhora do estado nutricional e conseqüentemente da doença.

O suplemento de PSL-TGF- β apresentou-se como boa fonte protéica e como promotor na melhora da morbidade da doença para pacientes com doença de Crohn. A aceitação do produto quanto ao sabor aumentou ao longo da suplementação por 16 semanas de ingestão diária provavelmente decorrentes dos benefícios trazidos pelo consumo contínuo do mesmo, como: melhora no trato digestivo, com diminuição de diarreia e cólicas, desta forma melhorando a sensação de bem estar percebidos pelos pacientes. Entretanto, para que um grande número de pacientes seja encorajado a fazer a suplementação continuamente é fundamental a melhora da qualidade sensorial do produto, e para que isso ocorra são necessários pesquisas adicionais que consigam prevenir a formação de voláteis causadores de off-flavours ou mascarar aroma/sabores desagradáveis encontrados no mesmo.

Referências

9.Referências

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. Citocinas. In: ABBAS, A.K.;LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. Imunologia celular e molecular. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p 267-301, 2008.

ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 27, 1256-1262, 1979.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research*, Amsterdam, v.350, n.1, p.103-108, 1996.

AUGUSTIN, O. M., MUNOZ, M. V. Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutrición Hospitalaria*. N.21, (supl.2), pag 1-4; 2006.

BALDASSO, C. Concentração, purificação e fracionamento das proteínas do soro lácteo atravésde tecnologia de separação por membranas. 163 f. Dissertação (Mestrado)UniversidadeFederal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

BAMIAS G, COMINELLI F: Novel strategies to attenuate immune activation in Crohn's disease. *Current Opinion In Pharmacology*, 6:401-407; 2006.

BARUCHEL S et al In: *Oxidative stress in cancer, AIDS, and neurodegenerative diseases*. New York. Marcel Dekker; 1998.

BECK PL, PODOLSKY DK. Growth factors in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Disease*; 5: 44-60; 1999.

BENZIE IFF. Antioxidants: observational epidemiology. In: Sadler MJ, Strain JJ, Cabellero B, editors. *The encyclopedia of human nutrition*. New York7 Academic Press; p. 106– 15, 1999.

BEST WR, BECKTEL JM, SINGLETON JW. Kern F Jr. Development of a Crohn's disease activity index. *Gastroenterology*. 70:439-44, 1976.

BEUTLER, E. *Red Cell Metabolism*. New York: Churchill Livingstone. 126p, 1986.

BLIGH, E. G., & DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917, 1959.

BOUNOUS G, BARUCHEL S, FALUTZ J, GOLD P. Whey Proteins as a Food Supplement in HIV-Seropositive Individuals. *Clinical and Investigative Medicine*, v. 16, p.204-209, 1993.

BOUNOUS G, KONGSHAVN G, GOLD P. Immunoenhancing Property of Dietary Whey Protein in Mice: Role of Glutathione. *Clinical and Investigative Medicine*, 12 (3): 154-61; 1989.

BOUNOUS G, KONGSHAVN PAL, GOLD P. The Immunoenhancing Property of Dietary Whey Protein Concentrate. *Clinical and Investigative Medicine*, 11(4): 271-8; 1988.

BOUNOUS, G. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. *Anticancer Res.* 20(6C):4785-92, 2000.

BOUTHEGOURD, J.J., ROSEAU, S.M., MAKARIOS- LAHHAM, L., et al. A preexercise lactalbumin-enriched whey protein meal preserves lipid oxidation and decreases adiposity in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283: E565-E572, 2002.

BOUTHEGOURD, J.J., ROSEAU, S.M., MAKARIOS-LAHAM, L., et al. A preexercise lactalbumin-enriched whey protein meal preserves lipid oxidation and decreases adiposity in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283: E565-E572, 2002.

BRINK, W. The life extension protein: that fights disease and extends lifespan. *Life Extension Report*, Life Extension Foundation, Scottsdale. 1: 21-28, 1996.

CALBET JAL, MACLEAN DA. Plasma glucagon and insulin responses depend on the rate of appearance of amino acids after ingestion of different protein solutions in humans. *J Nutr.* 132(8):2174-82, 2002.

CANNIOTO Z, BERTI I, MARTELOSSI S, BRUNO I, GIURICI N, CROVELLA S, VENTURA A. IBD and IBD mimicking enterocolitis in children younger than 2 years of age. *Eur J Pediatr.* 168: 149 – 155, 2009.

CERUTTI, P.A. Oxy-radicals and cancer. *Lancet*, London, v.344, n. 8926, p.862-863, 1994.

CHANTRY, C.J.; RODRIGUES, J.L.; FEBO, I.; DIAZ, C. & RODRIGUEZ-ORENGO, J.F. Plasma Glutathione Concentrations in Non-infected Infants born from HIV-infected Mothers: Developmental Profile. *Puerto Rico Health Sciences Journal*, v.18. n., 3,p. 267-272, set.; 1999.

COBRIN, M. G., ABREU, T. M. Defects in mucosal immunity leading to Crohn's disease. *Immunological Reviews*, 277-295; 2005.

COEFFIER M, MARION-LETELLIER R AND DÉCHELOTTE P, MD. Potential for Amino Acids Supplementation During Inflammatory Bowel Diseases. *Inflammatory Bowel Disease*. 16 (3): 518-524, 2010.

COLOMBELL J F; SANDBORN W J; RUTGEERTS P; ENNS R, HANAUER S B, PANACCIONE R, et al. Adalimumab for maintenance of clinical response and remission in patients with Crohn's Disease: the CHARM trial. *Gastroenterology*. 132(10): 52-65, 2007.

COLOMBEL J. F., SANDBORN W. J., REINISCH W., MANTZARIS G. J., KORNBLUTH A., RACHMILEWITZ D. L., LICHTIGER S., D'HAENS G., DIAMOND R. H., BROUSSARD D. L., TANG K. L, VAN DER WOUDE C. J., AND RUTGEERTS P. L. for the SONIC Study Group. Infliximab, Azathioprine, or Combination Therapy for Crohn's Disease*N Engl J Med 362 (15): 1383-1395, 2010.

CONSTANTINO AM, BALZOLA F, BOUNOUS G. MODIFICAZIONI sulle Immunoglobuline A Biliari di Tipo Secretorio in Trophi Nutriti com proteine del Siero di Latte. *Minerva Dietologica e Gastroenterologica*, 35 (4): 241-5; 1989.

CRIBB PAUL, B.H., SC. HMS, B. Chem. Sci. (Hons) CSCS. PROTEÍNAS DE SORO E COMPOSIÇÃO CORPORAL. U.S. Dairy Expot Council, 2006.

CRIBB PJ. WILLIAMS AD, HAYES A e CAREY MF.The effect of whey isolate on strength, body composition and plasma glutamine. *Med Science Sports Exercises* 34; 5: S 299; 2005.

CROSS, M. L., GILL, H. S. Immunomodulatory properties of milk. *British Journal Nutrition*. v.84, p.81-89; 2000.

CUPPARI L. Nutrição clínica no adulto. 2º ed. São Paulo: Manole, 2006.

D'HAENS G; BAERT F; VAN ASSCHE G; et al. Early combined immunosuppression or conventional management in patients with newly diagnosed Crohn's disease: an open randomised trial. *Lancet*. 371:660-667, 2008.

DRAKE, M. A. Flavor and flavor carry-through of whey proteins in beverages. In *Proceedings of the 4th International Whey Conference*. American Dairy Products Institute, Elmhurst, IL. p. 292-300, 2006.

DRAKE, M. A.; MIRACLE, R. E.; WRIGHT, J. M. Sensory properties of dairy proteins. In *Milk Proteins from Expression to Food*, Elsevier, New York, NY, p. 429-448, 2009.

DRAY, X; MARTEAU, P. A utilização da nutrição enteral no controle da doença de Crohn em adultos. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 29 (4): S169-S176; 2005.

DRI. Institute of Medicine. *Dietary Reference Intakes: applications in dietary assessment*. Washington DC. 306, 2000.

DURNIN, J.V.G.A. & RAHAMAN, M.M. The assessment of the amount of fat in the human body from measurements of skinfold thickness. *British Journal of Nutrition*. 681-689, 1967.

ELSON CO, CONG Y, MCCRACKEN VJ, DIMMITT RA, LORENZ RG, WEAVER CT. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunological Review* 206 (1): 260-276; 2005.

ELSON CO: The Immunology of inflammatory bowel disease. In *Inflammatory Bowel Disease*, Kirsner JB (ed). New York, Raven, pp 208-239; 2000.

EMMENDÖRFFER, A.; HETCHT, M.; LOHMANN-MATTHES, M.L.; ROESLER, FANARO S, CHIERICI R, GUERRINI P, VIGI V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Pædiatrica*, 441(supplement): 441-8; 2003.

EMMENDÖRFFER, A.; HETCHT, M.; LOHMANN-MATTHES, M.L.; ROESLER, J. A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123. *Journal of immunological methods*, Amsterdam, v.131, n.6, p.269-75, jul. 1990.

FANARO S, CHIERICI R, GUERRINI P, VIGI V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Pædiatrica*, 441(supplement): 441-8; 2003.

FELL, J.M. Control of systemic and local inflammation with transforming growth factor beta containing growth factor beta containing formulas. *Journal Parenteral Enteral Nutrition*. v.29, p.126-128; 2005.

FIOCCHI C: Inflammatory bowel disease: Etiology and pathogenesis. *Gastroenterology*; 115:182-205; 1998.

FLORA, A. P. L., DÍCHI, I. Aspectos atuais na terapia nutricional da doença inflamatória intestinal. *Revista Brasileira nutrição clínica*, v 21, p 131-137; 2006.

FURUSHO, Y. K. J., KORZENIK, R. J. Crohn's disease: Innate immunodeficiency. *World Journal Gastroenterol*. 12(42) : 6751-6755; 2006.

GENESTRA, M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular Signalling*, Oxford, v.19, n.9, p.1807-19, sep. 2007. genetic and other damage. *Mutation Research*, Amsterdam, v.350, n.1, p.103-108, 1996.

GIBSON PR, ANDERSON RP, MARIADASON JM et al. Protective role of the epithelium of the small intestine and colon. *Inflammatory Bowel Disease*; 2 279-302; 1996.

GIBSON PR SHEPHERD SJ: Personal view: Food for thought – western lifestyle and susceptibility to Crohn's disease. The FODMAP hypothesis. *Aliment. Pharmacol. Ther* 2005; 21(12): 1399-1409.

GRIFFITHS, A. M. A nutrição enteral no controle da doença de Crohn. *Journal of Parenteral and enteral nutrition*. v.29, p.109-113, 2005.

GWARTNEY, E. A.; FOEGEDING, E. A.; LARICK, D. K. The role of texture and fat on flavor release from whey protein isolate gels. In *Flavor Release* (D.D. Roberts and A.J. Taylor, eds.) pp. 355–367, American Chemical Society, Washington, D.C. 2000.

HA E, ZEMEL MB. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people. *J Nutr Biochem*. 14(5):251-58, 2003.

HACK, V., SCHMID, D., BREITKREUTZ, R., et al. Cystine levels, cystine flux, and protein catabolism in cancer cachexia, HIV/SIV infection and senescence. *FASEB J*. 11:84-92, 1997.

HAGEN, S. R., FROST, B., & AUGUSTIN, J. Pre-column phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in food. *J. AOAC*, 72, 912–916, 1989.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford7 Clarendon Press. [chapter 4], 1999.

HAMBRAEUS, L. Nutritional aspects of milk proteins. In P. F. Fox (Ed.) *Development*, 1982.

HANAUER, S B; LICHTENSTEIN G R; MAYER, L F; SCHREIBER S; COLOMBEL J F, et al. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet*. 359: 1541-1549, 2002.

HARAGUCHI, F.K.; ABREU W.C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. *Rev. Nutr.*, v. 19, n. 4, p. 479-488, 2006.

HAUCK, A. L., SWANSON, K. S., KENIS, P. J. GASKINS, H. R. SCHOOK, L. B. Twist and turns in the development and maintenance of the mammalian small intestine epithelium. *Birth Defects Res C Embryo Today*. V.75, p. 58-71; 2005.

HAYES JD, MCLELLAN LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defences against oxidative stress. *Free Radic Res*;31:273– 300, 1999.

HOW & SELLIN. Diet, nutrition and inflammatory bowel disease. *Therapy*; 7(2) 179-189, 2010.

HYAMS J; GRANDALL W; KUGATHASAN S; GRIFFITHS A; OLSON A; JOHANNIS J; et al. Induction and maintenance infliximab therapy for the treatment of moderate-to-severe Crohn's disease in children. *Gastroenterology*. 132(3):863-873, 2007.

INELMEN, E.M., SERGI, G., COIN, A., MIOTTO, F., PERUZZA, S. AND ENZI, G. Can obesity be a risk factor in elderly people? *Obesity Reviews*. 4 (3):147-155, 2003.

INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary Reference Intakes: applications in dietary assessment. Washington DC. 306, 2000.

IOM (Institute of Medicine). *National Academy of Sciences on Dietary Reference Intakes (DRI's). Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrates, Fiber, Fat, Protein and Amino Acids (Macronutrients)*. Washington: National Academy Press, 2002.

JOSE FA, GARNETT EA, VITTINGHOFF E, FERRY GD, WINTER HS, BALDASSANO RN, KIRSCHNER BS, COHEN SA, GOLD BD, ABRAMSON O, HEYMAN MB. Development of extraintestinal manifestations in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 15 (1): 63 -68, 2009.

JOVANOVIC, S.; BARAC, M.; MACEJ, O. Whey proteins-properties and possibility of application. *Mljedarstvo* 55, p. 215-233, 2005.

KAPPELMAN MD, BOUSVAROS A. Nutritional concerns in pediatric inflammatory bowel disease patients. *Mol Nutr Food Res*. 52(8):867-74, 2008.

KARAGUL-YUCEER, Y.; CADWALLADER, K. R; DRAKE, M. A. Volatile flavor components of stored nonfat dry milk. *J. Agric. Food Chem*. v.50, p.305-312, 2002.

KENT, K. D., HARPER, W. J., BOMSER, J. A. Effect of whey protein isolate on intracellular glutathione and oxidant-induced cell death in human prostate epithelial cells. *Toxicol in Vitro*. V.17, p. 27-33; 2003.

KORHONEN H, PIHLANTO A. Bioactive peptides: Production and functionality International Dairy Journal , 16:945–60; 2006.

KOTZE, P G; VIEIRA, A. Guia prático de Terapia biológica nas Doenças Inflamatórias Intestinais. Câmara Brasileira do Livro. SP, Brasil. CDD-616.34, 2010.

LANDS, L.C., GREY, V.L. AND SMOUNTAS, A.A. Effect of supplementation with a cysteine donor on muscular performance. J. Appl. Physiol. 87: 1381- 1385, 1999.

LOLY C; BELAICHE J; LOUIS E. Predictors of severe Crohn's disease. Scand J Gastroenterol. 43:948-954, 2008.

MACEDO, E. D. O Papel da fase faríngea nos processos da deglutição. In: COSTA, M. M. B; CASTRO, L. P. (Org.). Tópicos em Deglutição e Disfagia. Rio de Janeiro: Medsi, GuanabaraKoogan. p.37-46, 2003.

MAHAJAN, S. S.; GODDIK, L.; QIAN, M. C. Aroma compounds in sweet whey powder. J. Dairy Sci. v.87, p.4057–4063, 2004.

MASELLA R, CANTAFORA A, MODESTI D, CARDILLI A, GENNARO L, BOCCA A, et al. Antioxidant activity of 3,4-DHPEA-EA and protocatechuic acid: a comparative assessment with other olive oil biophenols. Redox Rep; 4:113–21, 1999.

MASELLA, R. T., BENEDETTO, R, D. , VARI, R., FILESI, C., GIOVANNINI, C. REVIEWS: CURRENT TOPICS. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. v.16, p.577–586, 2005.

MATTOS, LL., MARTINS SI. Consumo de fibras alimentares em população adulta. Revista de Saúde Pública. 34(1):50-55, 2000.

MCDERMID JM, LALONDE RG, GRAY-DONALD K, BARUCHEL S, KUBOW S. Associations Between Dietary Antioxidant Intake and Oxidative Stress in HIV-Seropositive and HIV-Seronegative Men and Women. JAIDS, 29(2):158-64; 2002.

MCINTOSH, REGESTER GO, LEU RKL, ROYLE PJ, JOHNSON MA, GRINSTED RL, et al. Dairy Proteins protect against Dimethylhydrazine-Induced Intestinal Cancers in Rats. *Journal of Nutrition*. 125: 809-16; 1995.

MODIGLIANI, R. et al. Clinical, biological and endoscopic picture of attacks of Crohn`s disease. Evolution on prednisolone. Groupe d`Etude Therapeutique des Affections Inflammatoires Digestives. *Gastroenterology*. 98: 811-818; 1990.

MORENO, YF et al. *Journal Trop Pediatric Advance*, doi:doi:10.1093/tropej/fmi074, Access. 13/07/; 2005.

MORR, C. V., GERMAN, B., KINSELLA, J. E., REGENSTEIN, J. P., BUREN, V., KILARA, A., LEWIS, B. A., & MANGINO, M.E. Collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. *Journal of Food Science*. 50, 1715-1718, 1985.

MORR, C. V.; FOEGEDING, E. A. Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolate: A status report. *Food Technol*. 44, 100-112. 1990.

NIJVELDT RJ, VAN NOOD E, VAN HOORN DE, BOELENS PG, VAN NORREN K, VAN LEEWEN PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*;74:418- 25, 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Estratégia global para a alimentação saudável, atividade física e saúde: 57º Assembléia Mundial de Saúde: WHO 57.17.8ª sessão plenária de 22 de maio de 2004 (versão em português, tradução não oficial). [S.I.] 2004.

PACHECO, M. T. B.; BIGHETTI, E.; ANTÔNIO, M.; CARVALHO, J. E.; ROSANELI, C. F.; SGARBIERI, V. C. Efeito de um hidrolisado de proteínas de soro de leite e de seus peptídeos na proteção de lesões ulcerativas da mucosa gástrica de ratos. *Revista de Nutrição, Campinas* . 19 (1): 47-55, 2006.

PAN Y, LEE A, WAN J, COVENTRY MJ, MICHALSKI WP, SHIELL B, ROGINSKI H. Antiviral properties of milk proteins and peptides. *International Dairy Journal*, 16:1252-61; 2006.

PORRINI M, RISO P, BRUSAMOLINO A, BERTI C, GUARNIERI S, VISIOLI F. Daily intake of a formulated tomato drink affects carotenoid plasma and lymphocyte concentrations and improves cellular antioxidant protection. *Br J Nutr*;93:93-9, 2005.

POULIOT, Y.; GAUTHIER, S.F. Milk growth factors as a health products: some technological aspects. *International dairy journal*, Barking, v.16, n.11, p.1415-20. Nov. 2006.

POULSEN, H.E., PRIEME, H., LOFT, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *European Journal of Cancer Prevention*, Oxford, v.7, n.1, p.9-16, 1998.

PRESENT D H; RUTGEERTS P; TARGAN, S R, et al. Infliximab for treatment of fistulas in patients with Crohn's Disease. *N. Engl. J Med.* 340:1398-1405, 1999.

RAZACK R, SEIDNER DL: Nutrition in inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 23(4): 400-405, 2007.

RECOMMENDED DIETARY ALLOWANCES. Subcommittee on the Tenth Edition of the RDAs Food and Nutrition Board Commission on Life Sciences National Research Council NATIONAL ACADEMY PRES. 10th Edition. Washington, D.C, 1989.

RIBEIRO, S.M.R.; QUEIROZ, J.H.; PELÚZIO, M.C.G.; COSTA, N.M.B.; MATTA, S.L.P.; QUEIROZ, M.E.L.R. Revisão: A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Bioscience journal (Impressa)*, Uberlandia, v.21, n.3, p.133-49, set./dez. 2005.

RICE-EVANS C. Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem*;8: 797-807, 2001.

RICE-EVANS C. Plant polyphenols: free radicals scavengers or chainbreaking antioxidants? *Biochem Soc Symp*; 61:103-16, 1995.

RICHARDSON, M.P.; AYLIFFE, M.J.; HELBERT, M.; DAVIES, E.G. A simple

ROBERFROID, M.B. Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. *British J Nutr*, 87(Suppl. 2): S139-S143; 2002.

RICHARDSON, M.P.; AYLIFFE, M.J.; HELBERT, M.; DAVIES, E.G. A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. *Journal of immunological methods*, Amsterdam, v.219, n. 1/2, p.187-93, oct. 1998.

RODRIGUES S. R.; PASSONI C. M. S.; PAGANOTTO M. Aspectos nutricionais na doença de Crohn. *Cadernos da Escola de Saúde Nutrição*; 1: 1- 8, 2008.

RODRIGUES-CABEZAS ME, GALVEZ J, LORENTE MD, et al. Dietary fiber downregulates colonic tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production in trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis rats. *J. Nutr.*; 132: 3.263-3.271, 2002.

ROTTNER, M.; FREYSSINET, J.M.; MARTÍNEZ, M.C. Mechanisms of the noxious inflammatory cycle in cystic fibrosis. *Respiratory Research*, London, v. 13, p.10:23, mar. 2009.

RUTGEERTS P; SANDBORN W J; FEAGAN B G; REINISCH W; OLSON A; JOHANNIS J, et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N. Engl J Med*. 353: 2462-2476, 2005.

RUTHERFORD K. J; LOW P. P. L, GILL H. S; CROSS M. L. Effect of Dietary Whey Protein Concentrate on Primary and Secondary Antibody Responses in Immunized BALB/C Mice. *International Immunopharmacology* 3: 393-401, 2003.

RUTHRUFF B., MSN, APRN-BC, CWOCN. Clinical review of Crohn disease. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners*. 19 , pag392-397; 2007.

RUTHRUFF B., MSN, APRN-BC, CWOCN. Clinical review of Crohn disease. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners*. 19 , pag392-397; 2007.

SAGEL, S.D.; ACCURSO, F.J. Monitoring inflammation in CF (Cytokines). *Clinical Reviews in allergy and immunology*, Totowa, v.23, n.1, p.41-57, aug. 2002.

SANDERSON, I. R.; CROFT, N. M. Os efeitos antiinflamatórios da nutrição enteral. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 29 (4): S136-S143; 2005.

SERRANO L. CHICHARRO. La fibra como tratamiento de enfermedades intestinales. *El farmacéutico Hospitales*. 187: 7-13, 2007.

SESSO HD, Gaziano M, Buring JE, Hennekens CH. Coffee and tea intake and the risk of myocardial infarction. *Am J Epidemiol*; 149:162- 7, 1999.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. *Revista de Nutrição, Campinas*, v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.

SHAH NP. Effects of milk-derived bioactives: an overview. *British Journal of Nutrition*,84 (Suppl. 1): S3-10; 2000.

SHANAHAN, F. Inflammatory Bowel Disease: Immunodiagnostics. Immunotherapeutics, and Ecotherapeutics. *Gastroenterology*, n.120, p. 622-635, 2001.

SIES H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med*;27:916-21, 1999.

SINHA, R.; RADHA, C.; PRAKASH, J.; KAUL, P. Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food Chem*. v.101,p.1501-1508, 2007.

SLATER B; MARCHIONI D. L.; FISBERG R. M. Estimando a prevalência da ingestão inadequada de nutrientes. *Revista de Saúde pública*. 38(4): 599-605, 2004.

SOUZA, H. T. PORTELA, F. FERREIRA, M., ANDRADE, P., LEITÃO, M.C., FREITAS, D. Eficácia e segurança do Infliximab no tratamento da Doença de Crohn-Experiencia de um certo Português; 2006.

STEELE VE, KELLOFF GJ, BALENTINE D, BOONE CW, METHA R, BAGHERI D, et al. Comparative chemopreventive mechanisms of green tea, black tea and selected polyphenol extracts measured by in vitro bioassays. *Carcinogenesis*. 21:63 - 7, 2000.

STEELE, R. D., & HARPER, A. E. Protein. In M. L. Brown (Ed.), *Present knowledge in nutrition*, (6rd ed) (pp.67-79). Washington, DC: Nutritional Foundation, 1990.

STELLA VE, POSTAIRE E. Évaluation de L'Effet Protecteur Antiradicalaire d'un Lactosérum Multiférenté en Doses Réitérées chez le Rat. *CRSB*. 189:1191-7, 1995.

SZOCS K. Endothelial dysfunction and reactive oxygen species production on ischemia/reperfusion and nitrate tolerance. *Gen Physiol Biophys*; 23:265- 95, 2004. technological aspects. *International dairy journal*, Barking, v.16, n.11, p.141520. Nov. 2006.

TARGAN, S R; FEAGAN B G; FEDORAK R N; et al., on behalf of International Efficacy of Natalizumab in Crohn's disease Response and Remission (ENCORE) Trial Group. Natalizumab for treatment of active Crohn's disease: results of the ENCORE Trial. *Gastroenterology*. 132: 1672-1683, 2007.

TOMAINO, R. M.; TURNER, L. G.; LARICK, D. K. Analysis of free fatty acids in whey products by solid-phase microextraction. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3993-3998. 2001.

TOWNSEND DM, TEW KD, TAPIERO H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother.* 57:145-55, 2003.

WHITSON, M. E.; MIRACLE, R. E.; DRAKE M. A.. SENSORY Characterization of chemical components responsible for cardboard flavor in whey protein. *Journal of Sensory Studies* 25 . 616-636, 2010.

WHO. Technical Report Series. 916, 2003.

WHO/FAO Diet, nutrition and prevention of chronic diseases. Report of Joint.

WHO/FAO Expert Consultation. Geneva: WHO, 2003 (Technical Report Series, 916).

WRIGHT, B. J.; ZEVCHAK, S. E.; WRIGHT, J. M.; DRAKE, M. A. The impact of agglomeration and storage on flavor and flavor stability of whey protein concentrate 80% and whey protein isolate. *J. Food Sci.* v.74, p.17-29. 2009.

XAVIER PI-SUNYER, F. The Obesity Epidemic: Pathophysiology and Consequences of Obesity. *Obesity Research*. 10: 97S-104S, 2002.

Anexos

ANEXO 1

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 10/07/07.
(Grupo III)

PARECER CEP: N° 304/2007 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0227.0.146.000 -07

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE E TGF-BETA SOBRE O ESTADO NUTRICIONAL E A FUNÇÃO DE LINFÓCITOS EM PACIENTES COM DOENÇA DE CROHN”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Elizete Ap. Lomazi Costa Pinto.

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas/UNICAMP.

APRESENTAÇÃO AO CEP: 11/05/2007.

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 22/05/08 (O formulário encontra-se no *site* acima).

II - OBJETIVOS

Verificar o papel do suplemento Whey Protein com TGF-beta em pacientes portadores de doença de Crohn sob terapia com corticóide.

III - SUMÁRIO

Para determinar o número de sujeitos participantes da pesquisa, será feito um estudo piloto com 20 pacientes, dos quais 10 receberão a dieta com TGF-beta e 10 não a receberão. Os sujeitos da pesquisa serão pacientes (crianças, adolescentes e adultos de ambos os gêneros) com doenças de Crohn atendidos no ambulatório de doenças inflamatórias. O desenho do estudo é prospectivo e exigirá intervenção clínica: os sujeitos receberão, por oito semanas, a fórmula nutricional. Os suplementos deverão ser ingeridos duas vezes ao dia (sugere-se que a ingestão ocorra no café da manhã e na ceia). A ingestão será avaliada quinzenalmente. Se algum paciente apresentar intolerância, seja gastrointestinal ou alérgica, a suplementação será imediatamente interrompida. A proteína do soro de leite utilizada será doada pela Hilma Cheese Company. Para determinação do escore clínico (avaliação da presença e sintomas clínicos: diarreia, dor abdominal, humor, sinais extra-digestivos) serão utilizados as ferramentas de Best W. R., para adultos, e o Hyamas J. S., para crianças. O escore histológico e endoscópico será calculado segundo o método de August. Por fim, os dados obtidos serão analisados por meio do software SPSS.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Trata-se de um projeto de doutorado. O protocolo está bem estruturado e escrito, o que o torna bastante claro. Inclui folha de rosto, descrição da pesquisa, orçamento, bibliografia, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, breve curriculum vitae dos pesquisadores e discussão dos aspectos éticos da pesquisa. Em relação à estrutura, portanto, o protocolo atende aos requisitos da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13061-970 - Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido está adequado, após resposta do parecer.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VI - DATA DA REUNIÃO

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de maio de 2007.


Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES ADULTOS COM DOENÇA DE CROHN

Eu, _____, com idade de ____ anos e HC de nº _____, RG _____, permito por livre e espontânea vontade a minha participação na pesquisa intitulada **“Avaliação do efeito da suplementação com proteínas do soro de leite e TGF-beta, sobre o estado nutricional e a função de linfócitos em pacientes com Doença de Crohn”**, projeto de tese de doutorado da aluna Taciana Davanço, promovido pelo Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Unicamp, com orientação da Profa Dra. Elizete Ap. Lomazi Costa Pinto e com co-orientação da Profa. Dra. Maria Marluce Dos Santos Vilela

Esta pesquisa tem o objetivo de, através da suplementação alimentar com proteínas do soro de leite e o TGF-beta, recuperar ou manter o estado nutricional e melhorar a resposta inflamatória dos pacientes com a doença de Crohn.

Atesto que recebi esclarecimentos quanto aos propósitos e procedimentos a serem utilizados durante o estudo, tais como:

- a) entrevista com profissional das áreas de nutrição e medicina;
- b) coleta de 20 ml de sangue para a realização de exames
- c) exames antropométricos (peso, altura, pregas cutâneas)
- d) ingestão do suplemento alimentar que for proposto;
- e) fornecimento de informações referentes à ingestão alimentar.

Comprometo-me a ingerir o suplemento alimentar fornecido, bem como, seguir às orientações recebidas quanto ao seu uso, tendo a garantia de receber resposta a qualquer pergunta e, esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos assuntos relacionados à pesquisa e a suplementação alimentar.

Estou ciente que não receberei remuneração em troca da participação, que os dados obtidos serão mantidos em sigilo, que posso deixar de participar da pesquisa no momento em que desejar e, que a desistência não influenciará no atendimento que venho recebendo.

De acordo,

Responsável: _____
Taciana Davanço (telefone 19 3289-6554): _____
Profa. Dra. Elizete AP. Lomazi Costa Pinto (telefone 19 3521-7861): _____
Profa Dra. Maria Marluce dos S. Vilela (telefone 19 3521-8963): _____

Campinas, ____ de _____ de 2008.

Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas- UNICAMP: 19-3521-8936

ANEXO 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA OS PAIS OU RESPONSÁVEIS DO PACIENTES MENORES DE IDADE COM DOENÇA DE CROHN

Declaro, por livre e espontânea vontade, que permito a participação de, _____, com idade de ____ anos e HC de nº _____ sob registro de nascimento _____ que se encontra sob responsabilidade de _____, com idade de _____ anos, com o RG de _____, residente na Rua _____, cujo grau de parentesco é _____, na pesquisa intitulada **“Avaliação do efeito da suplementação com proteínas do soro de leite e TGF-beta, sobre o estado nutricional e a função de linfócitos em pacientes com Doença de Crohn”**, projeto de tese de doutorado da aluna Taciana Davanço, promovido pelo Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Unicamp, com orientação da Profa Dra. Elizete Ap. Lomazi Costa Pinto e com co-orientação da Profa. Dra. Maria Marluce Dos Santos Vilela

Esta pesquisa tem o objetivo de, através da suplementação alimentar com proteínas do soro de leite e o TGF-beta, recuperar ou manter o estado nutricional e melhorar a resposta inflamatória dos pacientes com a doença de Crohn.

Atesto que recebi esclarecimentos quanto aos propósitos e procedimentos a serem utilizados durante o estudo, tais como:

- a) entrevista com profissional das áreas de nutrição e medicina;
- b) coleta de 20 ml de sangue para a realização de exames
- c) exames antropométricos (peso, altura, pregas cutâneas)
- d) ingestão do suplemento alimentar que for proposto;
- e) fornecimento de informações referentes à ingestão alimentar.

Comprometo-me a oferecer o suplemento alimentar fornecido, bem como, seguir às orientações recebidas quanto ao seu uso, tendo a garantia de receber resposta a qualquer pergunta e, esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos assuntos relacionados à pesquisa e a suplementação alimentar.

Estou ciente que não receberei remuneração em troca da participação, que os dados obtidos serão mantidos em sigilo, que posso deixar de participar da pesquisa no momento em que desejar e, que a desistência não influenciará no atendimento que venho recebendo.

De acordo,

Responsável pelo Participante: _____
Taciana Davanço (telefone 19 3289-6554): _____
Profa. Dra. Elizete AP. Lomazi Costa Pinto (telefone 19 3521-7861): _____
Profa Dra. Maria Marluce dos S. Vilela (telefone 19 3521-8963): _____

Campinas, ____ de _____ de 2007.

Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas- UNICAMP: 19-3521-8936

ANEXO 4



EMPRESA BRASILEIRA DE RADIAÇÕES LTDA.
AV. CRUZADA BANDEIRANTE, 290 - COTIA - SP
CNPJ 45.789.724/0002-85
REGISTRO MS 926/81

CLIENTE.....: PROFA.DRA.MARIA MARLUCE DOS SANTOS VILEL
CERTIFICADO N.: 154173 - EMITIDO EM 23/04/2008

PROCESSADO EM : 14/04/2008

MATERIAL PROCESSADO:

QUANT.	PRODUTO	LOTE
--------	---------	------

120 KG	PROTEINA DE SORO DE LEITE BOVINO EM PO////	
--------	--------------------------------------------	--

DOSE: 10 KGY

MATERIAL REFERENTE SUA NF: 167402 DE 10/04/2008

CERTIFICAMOS QUE O MATERIAL ACIMA DESCRITO FOI PROCESSADO
ATRAVES DE RAIOS GAMA E REMETIDO ATRAVES DE NOSSA N.F. 168293.

SISTEMA DE MEDIDA DOSIMETRICA RED PERSPEX 4034.

O MATERIAL E' CONSIDERADO PROCESSADO DESDE QUE INVIOLADAS
AS EMBALAGENS.



DR. DIRCEU M. VIZEU
Físico

DR. RODOLF URI HUTZLER
Controle Microbiológico

Data: ___/___/___

ANEXO 5

Teste de aceitação para pacientes com Doença de Crohn

1 – como foi preparado o produto??

2 – Descreva o que mais gostou e que menos gostou de um modo geral

+ gostei _____

- gostei _____

3 – O quanto gostou ou desgostou do sabor do produto?

+ gostei _____

- gostei _____

Escala de sabor



4- O que mais gostou ou desgostou na textura do produto?

+ gostei _____

- gostei _____

Escala de textura



5- O que mais gostou ou desgostou na aroma do produto?

+ gostei _____

- gostei _____

Escala de aroma



ANEXO 6

Aroma:

O que mais gostou ou desgostou na aroma do produto?

+ gostei _____

-

gostei _____



Marque com um “x” as notas aromáticas percebidas na amostra

Notas:

Doce ()

Queijo ()

Metálico ()

Amargo ()

Alimento cozido ()

Grão ()

Leite passado ()

Vômito ()

Leite natura ()

Baunilha ()

Terra ()

Soja ()

Leite em pó ()

Sabor:

O que mais gostou ou desgostou no sabor do produto?

+ gostei _____

- gostei _____



Marque com um “x” as notas aromáticas percebidas na amostra.

Doce ()

Queijo ()

Metálico ()

Amargo ()

Alimento cozido ()

Grão ()

Leite passado ()

Vômito ()

Leite natura ()

Baunilha ()

Terra ()

Areia ()

Soja ()

Leite em pó ()

Textura:

O que mais gostou ou desgostou na textura do produto?

+ gostei _____

- gostei _____



Sua percepção quanto a textura:

Adstringência:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Qual foi sua impressão Global do produto?



Agora indique sua intenção de compra:

- () certamente compraria
- () provavelmente compraria
- () Talvez comprasse / talvez não comprasse
- () Provavelmente não compraria
- () Certamente não compraria

ANEXO 7
Registro alimentar de 3 dias

() 2º feira () 3º feira () 4º feira () 5º feira () 6º feira () sab () dom

Refeição/ preparação	alimentos	Medida caseira
Desjejum		
Colação		
Almoço		
Lanche da tarde		
Jantar		
Ceia		

ANEXO 8

QUESTIONÁRIO QUANTITATIVO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR

Data da entrevista ___/___/___
Nome do entrevistador: _____
Nº de identificação: _____
Visita: _____
Nome: _____ Sexo () F () M
Idade atual: _____ anos Data de nascimento ___/___/___

1. Você mudou seus hábitos alimentares recentemente ou está fazendo dieta para emagrecer ou por qualquer outro motivo?

- (1) não
(2) sim, para perda de peso
(3) sim, por orientação médica
(4) sim, para dieta vegetariana ou redução do consumo de carnes
- (5) sim, para redução de sal
(6) sim, para redução de colesterol
(7) sim, para ganho de peso
Outro motivo: _____

2. Você está tomando algo para suplementar sua dieta (vitaminas, minerais e outros produtos)?

- (1) não (2) sim, regularmente (3) sim, mas não regularmente

3. Se a resposta da pergunta anterior for sim, favor preencher o quadro abaixo:

SUPLEMENTO	COMPOSIÇÃO	DOSE	FREQUÊNCIA

4. As questões seguintes relacionam-se ao seu hábito alimentar usual no PERÍODO DE UM ANO. Para cada quadro responda, por favor, a frequência que melhor descreva QUANTAS VEZES você costuma comer cada item e a respectiva UNIDADE DE TEMPO (se por dia, por semana, por mês ou no ano). Depois, responda qual a sua PORÇÃO INDIVIDUAL USUAL em relação à porção média indicada. ESCOLHA SOMENTE UM CÍRCULO PARA CADA COLUNA.

Muitos grupos de alimentos incluem exemplos. Eles são sugestões e você pode não consumir todos os itens indicados. Se você não come ou raramente come um determinado item, preencha o círculo da primeira coluna (N = nunca come). NÃO DEIXE ITENS EM BRANCO.

GRUPO DE ALIMENTOS	Com que frequência você costuma comer?		Qual é o tamanho de sua porção em relação à porção média?	
	QUANTAS VEZES VOCE COME:	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Alimentos e preparações	Número de vezes: 1, 2, 3 etc. (N = nunca ou raramente comeu no último ano)	D = por dia S = por semana M = por mês A = por ano	Porção média de referência	P = menor que a porção média M = igual à porção média (M) G = maior que a porção M E = bem maior que a porção M

SOPAS E MASSAS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Sopas (de legumes, canja, creme, etc)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	O S MA O O O O	1 concha média (150g)	P M G E O O O O
Salgados fritos (pizza, coginha, salgadinho)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	O S MA O O O O	1 unidade grande (50g)	P M G E O O O O
Salgados assados (gaúcha, baunzinho, toda)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	O S MA O O O O	2 unidades ou 2 pedaços médios (140g)	P M G E O O O O
Macarrão com molho, sem carne	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	O S MA O O O O	1 prato raso (200g)	P M G E O O O O
Macarrão com molho com carne, lasanha, nhoque	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	O S MA O O O O	1 escumadeira ou 1 pedaço pequeno (110g)	P M G E O O O O
Pizza, panqueca	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	O S MA O O O O	2 fatias pequenas ou 2 unidades (180g)	P M G E O O O O
Feijão cozido ou frito	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	O S MA O O O O	2 colheres de sopa ou 2 fatias pequenas (70g)	P M G E O O O O
CARNES E PEIXES	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Carne de bife (bife, cozida, assada), miúdos, vísceras	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	O S MA O O O O	1 bife médio ou 2 pedaços (100g)	P M G E O O O O
Carne de porco (ombo, bisteca)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	O S MA O O O O	1 fatia média (100g)	P M G E O O O O
Carne seca, carne de sol, bacon	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	O S MA O O O O	2 pedaços pequenos (40g)	P M G E O O O O
Linguiça	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	O S MA O O O O	1 gomo médio (60g)	P M G E O O O O
Embutidos (presunto, mortadela, salicóia)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	O S MA O O O O	2 fatias médias (30g)	P M G E O O O O
Frango (cozido, frito, grelhado, assado)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	O S MA O O O O	1 pedaço ou 1 file pequeno (60g)	P M G E O O O O
Hambúrguer, nuggets, almôndega	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	O S MA O O O O	1 unidade média (60g)	P M G E O O O O
Peixe (cozido, frito, assado) e frutos do mar	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	O S MA O O O O	1 file pequeno ou 1 posta pequena (100g)	P M G E O O O O
LEITE E DERIVADOS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Leite - tipo: () integral () desnatado () semi-desnatado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	O S MA O O O O	1/2 copo, requieijo (25ml)	P M G E O O O O
Iogurte - tipo: () natural () com frutas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	O S MA O O O O	1 unidade pequena (140g)	P M G E O O O O
Queijo mussarela, prato, parmesão, provolone	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	O S MA O O O O	1/2 fatias grossas (30g)	P M G E O O O O
Queijo minas, ricota	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O O O	O S MA O O O O	1 fatia média (30g)	P M G E O O O O

LEGUMINOSAS E OVOS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Ovo (cozido, frito)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 unidade (50g)	P M G E O O O O
Feijão (caríoca, roxo preto, verde)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 concha média (86g)	P M G E O O O O
Lentilha, ervilha, grão de bico, soja	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 colher de servir (35g)	P M G E O O O O
Feijoada, feijão tropeiro	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 concha média (210g)	P M G E O O O O

ARROZ E TUBÉRCULOS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Arroz branco ou integral cozido com óleo e temperos	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	2 escumadeiras médias (120g)	P M G E O O O O
Batata frita ou mandioca frita	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	2 colheres de servir cheia (100g)	P M G E O O O O
Batata, mandioca, inhame (cozida ou assada), purê	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 escumadeira cheia (90g)	P M G E O O O O
Salada de maionese com legumes	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	3 colheres de sopa (90g)	P M G E O O O O
Farinha de mandioca, farofa, cuscuta, aveia, tapioca	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	3 colheres de sopa (40g)	P M G E O O O O

VERDURAS E LEGUMES	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Alface	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	3 folhas médias (30g)	P M G E O O O O
Tomate	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	3 fatias médias (40g)	P M G E O O O O
Cenoura	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 colher de sopa (25g)	P M G E O O O O
Outros legumes (abobrinha, berinjela, chuchu, pepino)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 colher de sopa cheia (30g)	P M G E O O O O
Outras verduras cruas (acelga, rúcula, agrião)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 prato de sobremesa (38g)	P M G E O O O O
Outras verduras cozidas (acelga, espinafre, escarola, couve)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 prato de sobremesa (crua) ou 1 colher de servir (cozida) (30g)	P M G E O O O O
Brócolis, couve-flor, repolho	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 ramo ou 2 colheres de sopa (30g)	P M G E O O O O

MOLHOS E TEMPEROS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Óleo, azeite ou vinagrete para tempero de salada	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 fio (5ml)	P M G E O O O O
Maionesa, molho para salada, patê, chantilly	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 colher de chá (4g)	P M G E O O O O
Sal para tempero de salada	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 pitada (0,35g)	P M G E O O O O

FRUTAS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Laranja, mexerica, abacaxi	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 unidade média ou 1 fatia grande (180g)	P M G E O O O O
Banana	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 unidade média (86g)	P M G E O O O O
Maçã, pêra	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 unidade média (110g)	P M G E O O O O
Mamão, melão, melancia	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 fatia média (150g)	P M G E O O O O

BEBIDAS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Suco natural	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1/2 copo americano (80ml)	P M G E O O O O
Suco industrializado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 copo de requeijão (240ml)	P M G E O O O O
Café ou chá sem açúcar	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	2 xícaras de café (90ml)	P M G E O O O O
Café ou chá com açúcar	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	2 xícaras de café (90ml)	P M G E O O O O
Refrigerante () comum () diet/light	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 copo de requeijão (240ml)	P M G E O O O O
Cerveja	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	2 latas (700ml)	P M G E O O O O

PÃES E BISCOITOS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Pão francês, pão de forma, integral, pão doce, torrada	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 unidade ou 2 fatias (50g)	P M G E O O O O
Biscoito sem recheio (doce, saicado)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	4 unidades (24g)	P M G E O O O O
Biscoito recheado, waffer, amanteigado	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	3 unidades (41g)	P M G E O O O O
Bolo (simples, recheado)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	D S M A O O O O	1 fatia média (60g)	P M G E O O O O

PÃES E BISCOITOS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Manteiga ou margarina passada no pão () comum () light	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	O S MA O O O O	3 pontas de fava (15g)	P M G E O O O O
Sanduíche (cachorro-quente, hambúrguer)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	O S MA O O O O	2 unidades simples (220g)	P M G E O O O O

DOCES E SOBREMESAS	QUANTAS VEZES VOCÊ COME	UNIDADE	PORÇÃO MÉDIA (M)	SUA PORÇÃO
Chocolate, bombom, brigadeiro	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	O S MA O O O O	1 barra pequena (25g)	P M G E O O O O
Achocolatado em pó (adicionado ao leite)	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	O S MA O O O O	2 colheres de sopa (25g)	P M G E O O O O
Sobremesas, doces, bolos, tortas	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	O S MA O O O O	1 pedaço ou 1 fatia média (60g)	P M G E O O O O
Aplicar, mel, geléia	N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 O O O O O O O O O O	O S MA O O O O	1/2 colher de sopa (6g)	P M G E O O O O

Quando você come carne bovina ou suína, você costuma comer a gordura visível?

(1) nunca ou raramente (2) algumas vezes (3) sempre (9) não sabe **D**

Quando você come frango ou peru, você costuma comer a pele?

(1) nunca ou raramente (2) algumas vezes (3) sempre (9) não sabe **D**

Por favor, liste qualquer outro alimento ou preparação importante que você costuma comer ou beber pelo menos UMA VEZ POR SEMANA que não foram citados aqui (por exemplo: leite de coco, outros tipos de carnes, receitas caseiras, creme de leite, leite condensado, gelatina e outros doces etc.).

ALIMENTO	FREQUÊNCIA POR SEMANA	QUANTIDADE CONSUMIDA

ANEXO 9

Índice de Atividade da doença de Crohn (adultos)

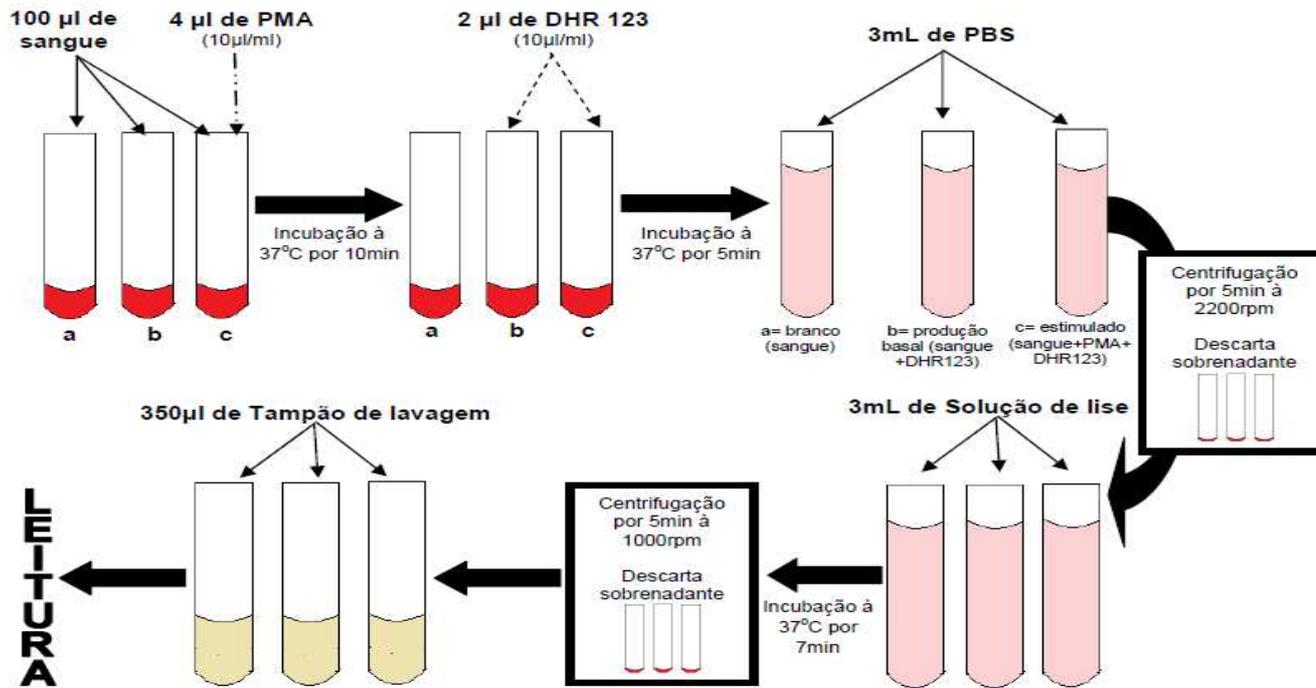
ADULTOS:

Variável	Fator Multiplicador	Subtotal
Média do número de evacuações líquidas ou pastosas por dia nos últimos 7 dias.	x2	
Dor abdominal, em média nos últimos 7 dias (0-sem dor, 1- dor leve, 2- dor moderada, 3- dor acentuada)	x5	
Sensação de bem-estar, média dos últimos 7 dias (0- bom, 1- um pouco abaixo da média, 3- ruim, 4- muito ruim, 5- terrível)	x7	
Número de complicações	x20	
1 - artrite ou artralgia		
2 - irite ou uveíte		
3 - eritema nodoso ou pioderma gangrenoso ou estomatite aftóide		
4 - fissura anal ou fístula ou abscesso perirretal		
5 – febre acima de 37,8° C		
Massa abdominal (0-não, 2- questionável, 5- definida)	x10	
Hematócrito (homens: 47 menos Ht; mulheres: 42 menos Ht em %)	x6	
Percentual acima ou abaixo do peso corporal habitual (1 menos [peso/peso habitual] x 100 (o resultado deve ser Somado ou diminuído ao restante de acordo com o sinal))	x1	
		Total do IADC

Fonte: Best WR, Beckel JM, Singleton JW, Gastroenterology, 1979; 77: 843-46.

ANEXO 10

REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ANÁLISE DE LIBERAÇÃO DE RADICAIS INTERMEDIÁRIOS DE OXIGÊNIO PELOS GRANULÓCITOS



Fonte : **Bernardi**, Daniela Miotto. Aspectos nutricionais e bioquímicos da fibrose cística em pacientes pediátricos: suplementação com um concentrado proteico do soro do leite bovino enriquecido com TGB-β e lactoferrina. *Dissertação de mestrado. FEA-UNICAMP, 2010.*