



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

Vivianne Magalhães Gomes

**ESTADO NUTRICIONAL DE ZINCO E SUA RELAÇÃO COM A MASSA  
ÓSSEA EM NUTRIZES ADULTAS NA LACTAÇÃO**

RIO DE JANEIRO

2013

Vivianne Magalhães Gomes

**ESTADO NUTRICIONAL DE ZINCO E SUA RELAÇÃO COM A MASSA  
ÓSSEA EM NUTRIZES ADULTAS NA LACTAÇÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisitos parciais à obtenção do título de Mestre em Ciências, com ênfase em Ciência de Alimentos.

Orientadores: Prof. Alexandre Guedes Torres  
Dr<sup>a</sup>. Fernanda Kamp

Rio de Janeiro  
2013

Vivianne Magalhães Gomes

**ESTADO NUTRICIONAL DE ZINCO E SUA RELAÇÃO COM A  
MASSA ÓSSEA EM NUTRIZES ADULTAS AO LONGO DA  
LACTAÇÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisitos parciais à obtenção do título de Mestre em Ciências, com ênfase em Ciência de Alimentos.

Aprovada em

---

Prof Dr Alexandre Guedes Torres  
Instituto de Química  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Profª Drª Fernanda Kamp  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia

---

Profª Drª Flávia Fioruci Bezerra  
Instituto de Nutrição  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

---

Profª Drª Alexandra Anastacio Monteiro da Silva

Faculdade de Nutrição  
Universidade Federal Fluminense

## FICHA CATALOGRÁFICA

G663

Gomes, Vivianne Magalhães.

Estado nutricional de zinco e sua relação com a massa óssea ao longo da lactação. / Vivianne Magalhães Gomes – Rio de Janeiro : UFRJ, 2013. 98 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, 2013.

Orientadores: Alexandre Guedes Torres e Fernanda Kamp.

1. Bioquímica. 2. Lactação. 3. Zinco. 4. Massa óssea. I. Torres, Alexandre Guedes (orient.) II. Kamp, Fernanda. (orient). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em Ciências de Alimentos. IV. Título.

CDD 547

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, em parceria com o Laboratório de Avaliação Nutricional do Instituto de Nutrição da Universidade do Estado do Rio de Janeiro e Laboratório de Espectrometria de Emissão Ótica- ICP OES da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, sob orientação do Prof. Alexandre Guedes Torres e Dr<sup>a</sup>. Fernanda Kamp.

Apoio financeiro: CNPq, FAPERJ

**Parte dos resultados dessa dissertação foram enviados e aprovados para as seguintes reuniões científicas:**

- Experimental Biology, 2013 – EB. Boston, Massachusetts (20 a 24 de abril de 2013): Effect of lactation on antioxidant indices and bone mineral density in adult women. Kamp, F, Gomes, V.M; Silva, D.I; Torres, A.G.
- 20<sup>th</sup> International Congress of Nutrition, 2013 – IUNS, Granada, Espanha (15 a 20 de setembro de 2013): Changes in functional biochemical zinc indices and bone mass of adult women during lactation. Gomes, V.M; Silva, D.I; Kamp, F.; Torres, A.G.

“Como é feliz o homem que acha sabedoria, o homem que obtém o entendimento, pois a sabedoria é mais proveitosa do que a prata e rende mais do que o ouro.”

(Provérbios 3:13-14)



## **AGRADECIMENTOS**

À DEUS.... que é o meu orientador da vida, que me permitiu chegar até aqui. Que tudo planejou antes mesmo que eu nascesse e assim me capacitou. Obrigada meu Deus! Esse “muito obrigada” não é nada diante de TUDO que fizeste e o que significas em minha vida. Obrigada por estar sempre ao meu lado, pela força e persistência pra continuar seguindo em frente quando pensei em desistir.

A MINHA FAMILIA, pelo carinho, amor muitas vezes sacrificial, apoio e dedicação em todas as etapas da minha vida. O apoio de vocês foi fundamental! Se hoje sou o que sou, é graças a vocês!

Ao grande presente que Deus me concedeu, meu amor, ELTON. Seu incentivo, compreensão, amor e carinho foram fundamentais para desenvolvimento deste trabalho!  
Obrigada por ser quem você é! Te amo!

Ao meu orientador Prof Alexandre Guedes, pela oportunidade de fazer parte da “família” LBNA, pelos conhecimentos transmitidos. Obrigada!

À minha orientadora Fernanda Kamp. Não tenho nem palavras pra agradecer pela dedicação, paciência em meio ao meu desespero! Posso dizer que cresci e amadureci muito com cada ideia e conhecimento trocado durante esse trabalho. Obrigada por ter confiado a mim o projeto na qual você é apaixonada e se dedicou e lutou pra que saísse!  
Foram muitas dificuldades, mas enfim, aí está ele! Obrigada por tudo!

Às voluntárias que participaram desse estudo e deram seu sangue! Vocês foram essenciais para o desenvolvimento dessa dissertação.

À minha amiga Danúbia, companheira inicial do projeto e coletas. Esse projeto tem muita história pra contar né? Quantas manhãs e tardes ficamos dentro da maternidade a procura

de um sim? Obrigada pela ajuda, paciência e palavras de incentivo nos momentos em que  
pensei e achei que não fosse conseguir!

À Karla Leal, Vanessa Rezende, Fabiana Ramos, Nathalia Sales, Suellen Gomes, Fabricio Silva, Michele Rodrigues, Beatriz Ripper, Emilia Akil. Acho que não tem como descrever o quanto foi maravilhoso conviver com vocês esses 2 anos! Momento açaí, shopping, cinema, praia, mutirão pra organizar o LBNA, ficar até 21:00 hs da noite no laboratório só pra fazer companhia a quem estava fazendo análise. Não tenho nem palavras pra descrever! Conseguimos fazer desse momento sério um momento descontraído, alegre, bem animado e sem perder o foco! Rimos, choramos, desabafamos! Obrigada pelo carinho e apoio nos momentos difíceis! Sentirei saudades!

À minha amiga e enfermeira Suellem Duarte pelas coletas de sangue, pelo companheirismo e disposição na realização desse trabalho. Digo que foi uma aventura viajar pelo Rio pra fazer coleta! Foram momentos muito agradáveis e divertidos! Obrigada pelo carinho e apoio!

Ao secretario Rafael Luiz e Julia Rocha!

Ao Técnico Maurício (PUC) pelo tempo prestado em realizar as análises de minerais.

À Técnica Lívia Maria Loureiro, pela realização do DEXA.

À Técnica Patricia! O que seria de nossas análises se não fosse você pra cuidar de nossas vidrarias!

**MUITO OBRIGADA A TODOS! VOCÊS FORAM ESSENCIAIS PARA QUE EU  
ALCANÇASSE ESSA VITÓRIA!!**

## RESUMO

GOMES, Vivianne Magalhães. **Estado nutricional de zinco e sua relação com a massa óssea de nutrizes adultas ao longo da lactação.** Rio de Janeiro, 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)- Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

A lactação é uma fase que impõe ao organismo materno uma elevada demanda de energia e nutrientes a fim de satisfazer as necessidades do lactente e da mãe. Tal demanda pode ser suprida pelo aumento da ingestão dietética e/ou da mobilização dos estoques maternos. Objetivo: Avaliar o estado nutricional de zinco e sua relação com a massa óssea em nutrizes adultas. 15 nutrizes, saudáveis, entre 20 e 40 anos, foram avaliadas em 2 períodos lactacionais: entre 2ª e a 4ª semana ( $t_0$ ) e entre a 12ª e a 14ª semana ( $t_1$ ). Indicadores bioquímicos avaliados: gerais (hemoglobina, hematócrito, albumina e creatinina), de estado nutricional de zinco no plasma (zinco plasmático, fosfatase alcalina total - FAT e de origem óssea - FAO), em eritrócito (zinco eritrocitário; atividade da ácido aminolevulínico desidratase - -ALAD - e ativação *in vitro* com zinco; Fragilidade osmótica de eritrócitos - FOE; atividade da superóxido dismutase - SOD) e em urina (zinco urinário), indicadores bioquímicos de massa óssea (cálcio e fósforo no plasma e urina) e densidade mineral óssea - DMO (esqueleto total, lombar - L1-L4 e fêmur) através do DEXA. Observou-se ingestão habitual de cálcio e de zinco subadequadas e estado marginal destes dois minerais em  $t_0$ . Em  $t_0$  35% das nutrizes apresentaram osteopenia. Em  $t_1$ , observou-se redução da atividade de enzimas eritrocitárias, na concentração de zinco no eritrócito ( $p < 0,05$ ), e na densidade mineral óssea ( $p < 0,05$ ). No entanto, houve aumento da concentração de zinco na urina ( $p < 0,05$ ), de cálcio no plasma ( $p < 0,05$ ), da atividade da FAT e FAO ( $p < 0,05$ ), no percentual de reativação da -ALAD *in vitro* com zinco ( $p < 0,05$ ) e tendência de aumento na concentração de zinco no plasma ( $p = 0,1$ ). Foi observada correlação negativa entre zinco no plasma com atividade da -ALAD e com FOE, respectivamente ( $r = -0,4656$ ;  $p = 0,09$ ;  $r = -0,5719$ ;  $p = 0,03$ ) e entre a concentração de cálcio no plasma com DMO total ( $r = -0,5422$ ;  $p = 0,03$ ). Foi demonstrado pela primeira vez a associação de indicadores funcionais de estado nutricional de zinco com a concentração no plasma para uma avaliação global do seu estado nutricional. Portanto, os dados deste estudo indicam que a lactação afetou o metabolismo de zinco e ósseo das nutrizes, sugerindo uma redistribuição nos *pools* de zinco, à custa de enzimas eritrocitárias em sentido favorável para minimizar a perda óssea característica da lactação como forma de atender a elevada taxa de *turnover* ósseo.

**Palavras-chave:** Lactação. Zinco. Massa óssea

## ABSTRACT

GOMES, Vivianne Magalhães. **Estado Nutricional de zinco e sua relação com a massa óssea em nutrizes adultas na lactação.** Rio de Janeiro, 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)- Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Lactation is a period that requires the maternal organism a high demand for energy and nutrients to meet the needs of the infant and mother. This demand can be met by increased dietary intake and / or mobilization of maternal stores. Objective: To evaluate the nutritional status of zinc and its relationship with bone mass in lactating women. 15 lactating women, healthy, between 20 and 40 years, were evaluated in two periods of lactation: between 2nd and 4th week (t<sub>0</sub>) and between the 12th and the 14th week (t<sub>1</sub>). Biochemical indicators assessed: general (hemoglobin, hematocrit, albumin and creatinine), the nutritional status of zinc in plasma (plasma zinc, total alkaline phosphatase - TAP and bony origin - BAP) in erythrocytes (erythrocyte; activity of aminolevulinic acid dehydratase - -ALAD - and in vitro activation with zinc; erythrocyte osmotic fragility - EOF; activity of superoxide dismutase - SOD) and urine (urinary zinc), biochemical indicators of bone mass (calcium and phosphorus in plasma and urine) and Bone mineral density - BMD (total skeleton, spine - L1-L4 and femur) using DEXA. Observed habitual intake of calcium and zinc below and marginal state of these two minerals in t<sub>0</sub>. In t<sub>0</sub> 35% of the mothers had osteopenia. In t<sub>1</sub>, there was a reduction of erythrocyte enzyme activity in zinc concentration in erythrocytes (p <0.05), and bone mineral density (p <0,05). However, an increase in zinc concentration in the urine (p <0.05) in plasma calcium (p <0.05), the TAP and BAP activity (p <0.05) at the rate of reactivation of the -ALAD in vitro with zinc (p <0.05) and a trend of increase in the concentration of zinc in plasma (p = 0.1). Negative correlation was found between plasma zinc in the activity of -ALAD and the EOF, respectively (r = -0.4656, p = 0.09, r = - 0.5719, p = 0.03) and between the plasma calcium concentration to total BMD (r = - 0.5422, p = 0.03). Was first demonstrated the association of functional indicators of nutritional status of zinc concentration in plasma for a global assessment of nutritional status. Therefore, data from this study indicate that lactation affected the metabolism of zinc and bone of the mothers, suggesting a redistribution of zinc in the pools at the expense of erythrocyte enzyme in a favorable direction to minimize bone loss characteristic of lactation in order to meet the high rate of bone turnover.

**Keywords:** Lactation. Zinc. Bone mass



## LISTA DE ABREVIATURAS

AI – ingestão adequada

-ALAD – ácido aminolevulínico desidratase

1,25 (OH)<sub>2</sub> D – calcitriol

CRIP - proteína intestinal rica em cisteína

DMO - densidade mineral óssea

DNA - ácido desoxirribonucleico

DRI – do inglês: *Dietary Reference Intakes*

FAO – fosfatase alcalina de origem óssea

FAT- fosfatase alcalina total

FOE – fragilidade osmótica de eritrócitos

ICP-OES - espectrômetro de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado

IGF-I - fator de crescimento semelhante à insulina tipo I

IMC - Índice de Massa Corporal

IOM – do inglês: Institute of Medicine

MT – Metalotioneína

ODF – Fator de diferenciação de osteoblastos

OMS – organização Mundial de Saúde

PBG – porfobilinogênio

PTH – paratormônio

QFA- Questionário de frequência alimentar

RDA – do inglês: *Recommended Dietary Allowance*

SOD – superóxido dismutase

TGF-beta - fator de crescimento beta de transformação

WHO – do inglês: World Health Organization

Zn- -ALAD – ativação da -ALAD de eritrócitos *in vitro* com zinco

SH – grupos sulfidrilas

ZnT – do inglês : *zinc transporter*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Anatomia da glândula mamária	23
<b>Figura 2.</b>	Reflexo da descida do leite	24
<b>Figura 3.</b>	Esquema da absorção e transporte de zinco no organismo humano	30
<b>Figura 4.</b>	Ação do PTH e calcitonina sobre os níveis de cálcio no organismo	36
<b>Figura 5.</b>	Esquema da ação do zinco sobre a formação óssea	39
<b>Figura 6.</b>	Ação do zinco na reabsorção óssea	40
<b>Figura 7</b>	Atividade da fosfatase alcalina total e de origem óssea no plasma das nutrizes estudadas	57



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Metaloenzimas e proteínas ligantes de zinco	28
<b>Tabela 2.</b>	Características gerais de estado nutricional das nutrizes estudadas	55
<b>Tabela 3.</b>	Indicadores bioquímicos de estado nutricional de zinco das nutrizes estudadas	56
<b>Tabela 4.</b>	Indicadores de massa óssea das nutrizes estudadas	58
<b>Tabela 5.</b>	Associações entre os indicadores bioquímicos e de massa óssea das nutrizes em cada estágio lactacional investigado	59

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	19
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	22
<b>2.1. LACTAÇÃO</b>	23
<b>2.1.1. Fisiologia da lactação</b>	23
<b>2.1.2. Necessidades nutricionais na lactação</b>	25
<b>2.2. ZINCO</b>	27
<b>2.2.1. Funções fisiológicas</b>	27
<b>2.2.2. Regulação da homeostase do zinco</b>	29
<b>2.3. REGULAÇÃO DA HOMEOSTASE DO ZINCO NA LACTAÇÃO</b>	32
<b>2.4. AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL DE ZINCO</b>	34
<b>2.5. METABOLISMO ÓSSEO</b>	36
<b>2.5.1. Regulação do “turnover” ósseo</b>	36
<b>2.5.2. Metabolismo ósseo na lactação</b>	37
<b>2.6. Zinco e massa óssea</b>	38
<b>3. OBJETIVOS</b>	39
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	42
4.1. Voluntárias do estudo	44
4.2. Coleta e processamento das amostras	45
4.3. ANÁLISES LABORATORIAIS	46
4.3.1. Indicadores bioquímicos gerais	47
4.3.2. Indicadores bioquímicos de estado de zinco	47
4.4. DADOS DE INGESTÃO ALIMENTAR	48
4.5. DADOS ANTROPOMÉTRICOS	51
4.6. MASSA ÓSSEA	51
4.6.1. Indicadores Bioquímicos	51
4.6.2. Densitometria óssea	51
4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	51
<b>5.0. RESULTADOS</b>	52
5.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS VOLUNTÁRIAS	53
5.2. ESTADO NUTRICIONAL DE ZINCO E INDICADORES DE MASSA ÓSSEA	54

NOS PERÍODOS LACTACIONAIS AVALIADOS	
5.3. ASSOCIAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS ESTUDADAS	55
<b>6.0. DISCUSSÃO</b>	60
<b>7.0. CONCLUSÃO</b>	74
<b>8.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	76
<b>ANEXOS</b>	85

## **1. INTRODUÇÃO**

Atualmente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza que o leite materno seja adotado como alimento exclusivo nos seis primeiros meses de vida (Ministério da Saúde, 2009). Os benefícios desta estratégia para o lactente são conhecidos e indiscutíveis, porém o seu impacto sobre a saúde da mãe nutriz continua sendo uma preocupação da OMS (Ministério da Saúde, 2009).

A lactação impõe ao organismo materno uma condição de vulnerabilidade nutricional, devido à elevada demanda de energia e nutrientes a fim de satisfazer a transferência de nutrientes para o leite materno, além de atender às necessidades nutricionais maternas (WHO, 2004). Tal demanda pode ser alcançada por meio do aumento da ingestão dietética e/ou da mobilização de estoques maternos (IOM, 2001). Entretanto, nutrizas brasileiras e de outros países apresentam baixa ingestão habitual de micronutrientes na lactação, em especial zinco e cálcio (Krebs *et al*, 1995; Krebs, 1998; Donangelo *et al*, 2005; Bezerra *et al*, 2004).

O zinco está envolvido em inúmeras funções no organismo, pois é requerido para a atividade de mais de 300 enzimas (McCall *et al*, 2000). Entre as funções do zinco, destacam-se o seu papel na divisão celular, na síntese protéica, na resposta imunológica, no metabolismo ósseo e sua proteção contra danos oxidativos (McCall *et al*, 2000; Szckurek, 2001; Yamaguchi, 2010). Portanto, a deficiência de zinco durante a lactação pode exercer impacto negativo sobre a saúde da nutriz (Scheplyagina, 2005).

Grande parte do conteúdo de zinco corporal encontra-se no tecido ósseo, que parece atuar como reservatório do mineral (Yamaguchi, 2010). Além do seu papel estrutural, o zinco estimula a atividade osteoblástica e inibe a osteoclástica, sendo, portanto, fundamental para o metabolismo ósseo (Yamaguchi, 2010). O zinco também atua como co-fator da atividade da fosfatase alcalina óssea, enzima envolvida na deposição mineral nos ossos e tem sido utilizada como indicador bioquímico de formação óssea (Matsui e Yamagushi, 1995; Rossi, 2001, Bezerra *et al*, 2002).

Sabe-se que durante a lactação ocorre um processo de desmineralização temporária do tecido ósseo, como um mecanismo de manutenção da homeostase de cálcio na nutriz, sendo a magnitude dessa perda influenciada pelo período de aleitamento materno, fatores genéticos e nutricionais (Bezerra *et al*, 2008). Dessa forma, as condições que favorecem a reabsorção óssea acabam por favorecer a mobilização de zinco do tecido, conforme ocorre na baixa ingestão de cálcio (Masters *et al*, 1986; Weitassaub, 2001). Portanto, é possível que a baixa ingestão dietética de cálcio

observada em nutrizas brasileiras (Bezerra *et al*, 2002) favoreça a mobilização de zinco do tecido ósseo. Sendo o zinco essencial a este tecido, a sua liberação do osso poderia acentuar a elevada perda óssea observada na lactação. A relação do estado de zinco com a perda de massa óssea tem sido observada em mulheres na pós-menopausa (Strause *et al*, 1994) e em nutrizas adolescentes (Bouglé *et al*, 2004), mas ainda não foi investigada longitudinalmente em nutrizas adultas.

A deficiência de zinco durante a lactação poderia prejudicar a massa óssea materna e sua recuperação posterior. Embora o estado nutricional de zinco durante a lactação tenha sido extensamente investigado (Krebs *et al*, 1995; Krebs, 1998; Donangelo *et al*, 2005; Donangelo e King, 2012), a maior parte dos estudos utilizou somente o zinco plasmático como indicador do estado desse mineral (Wood *et al*, 2000; OMS, 2003). Sabe-se que, por ser afetada por inúmeros fatores (concentração de albumina sérica, infecção, doenças crônicas, uso de glicocorticóides, etc), a concentração de zinco circulante tem valor limitado como indicador isolado de seu estado nutricional (King e Ken, 1999).

Para uma adequada avaliação do estado de zinco, recomenda-se o uso combinado dos seguintes indicadores (Wood, 2000): concentração do mineral no soro/plasma, na urina e em eritrócitos, assim como indicadores funcionais. Estes últimos incluem a determinação da fragilidade osmótica de eritrócito e da atividade de enzimas Zn-dependentes, tais como fosfatase alcalina, superóxido dismutase (SOD), ácido  $\delta$ -aminolevulínico desidratase ( $\delta$ -ALAD) (Wood, 2000; Koury, 2003; Hambidge, 2003; Lowe; Fekete; Decsi, 2009; Kamp *et al.*, 2011.). Entretanto, tal abordagem não tem sido feita de forma consistente, principalmente para a caracterização do estado materno de zinco longitudinalmente na lactação.

Desta forma, a realização de um estudo que avalie o estado nutricional de zinco de nutrizas adultas, através de diferentes indicadores bioquímicos, e sua associação com a massa óssea ao longo da lactação irá contribuir para o conhecimento atual quanto ao metabolismo de zinco durante a lactação e da relação entre o estado nutricional de zinco com a massa óssea. Além disso, o presente estudo pode fornecer subsídios para a elaboração de novas diretrizes para a prevenção e/ou redução da deficiência de zinco e durante a lactação, assim como do risco de desenvolvimento de doenças ósseas em mulheres na pós-menopausa.

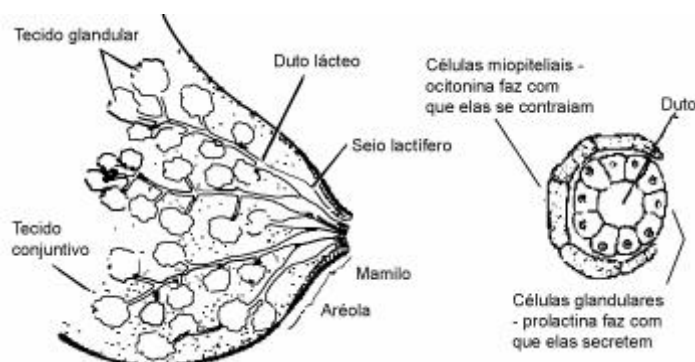
## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 2. LACTAÇÃO

A lactação é um estado fisiológico neuroendócrino no pós-parto, que garante a produção de leite materno pela nutriz. O leite produzido satisfaz as necessidades nutricionais do lactente por até 4-6 meses de vida (IBFAN, 1997; Carvalho *et al.*, 2002).

### 2.1. Fisiologia da lactação

A lactogênese é o conjunto de alterações no epitélio mamário necessárias para a produção de leite, e ocorre desde o início da gestação até o fim da lactação. A lactogênese pode ser dividida em duas fases: lactogênese I e II. A lactogênese I ocorre durante a gestação, quando o epitélio mamário se torna suficientemente diferenciado para dar início a produção e secreção de leite (Neville *et al.*, 2001).



**Figura 1:** Anatomia da glândula mamária. Fonte: Ministério da Saúde, 2001

A lactogênese II é o início da secreção de leite associado com o parto. Em humanos, o nível de progesterona não diminui no pré-parto, mas diminui aproximadamente dez vezes durante os primeiros quatro dias após o nascimento, acompanhado por uma transformação programada do epitélio mamário, levando a sensação de “peito cheio” (Neville *et al.*, 2001).



A iniciação e manutenção da lactação fazem parte de um sistema neuroendócrino. Envolve a inervação do mamilo e tecidos adjacentes, a medula espinhal, o hipotálamo e a hipófise, com seus hormônios, em especial, prolactina e ocitocina (Cury, 2003).

O processo secretório é ativado pelo estímulo de sucção do bebê. A inervação do mamilo e da aréola é abundante, com conexões entre o sistema nervoso autônomo e sensitivo. O estímulo é encaminhado, via medula espinhal, aos neurônios localizados no hipotálamo. Estes inibem a secreção do fator de inibição da prolactina – a dopamina, liberando a sua secreção pela hipófise anterior, que alcança por via sanguínea as células dos alvéolos mamários, estimulando a produção láctea (Cury, 2003).

O leite secretado não flui espontaneamente até os seios lactíferos por causa da pressão capilar, e só acontece através do reflexo de descida do leite (do inglês: let-down reflex), que ocorre por compressão dos alvéolos pelas células epiteliais que os rodeiam. Esta contração é estimulada pela ocitocina, hormônio liberado pela hipófise posterior (Cury, 2003). (Figura 2)



**Figura 2:** Reflexo da descida do leite. Fonte: Ministério da Saúde, 2001

### 2.1.1 Necessidades nutricionais na lactação

As recomendações nutricionais durante o período de lactação estão baseadas na produção de leite e seu conteúdo energético e nutricional, e no estado nutricional materno, assim como o seu gasto energético total (Ribeiro *et al.*, 2003). Desta forma, a dieta da mãe durante a lactação é considerada determinante da reserva energética para esta fase (Ribeiro *et al.*, 2003; Butte *et al.*, 2005).

A nutriz ou lactante possui necessidades nutricionais específicas decorrentes do processo de lactação para satisfazer uma eficiente transferência de nutrientes para o leite materno e assim, atender não somente as necessidades do bebê, mas também às suas demandas nutricionais. Alterações metabólicas durante a gravidez respondem antecipadamente pelos gastos da lactação. Mães que possuem uma alimentação adequada acumulam na gestação reservas, que serão usadas para compensar as necessidades aumentadas nos primeiros meses da lactação (FAO, 2004; Allen, 2005).

Embora possa haver, durante a lactação, depleção seletiva das reservas nutricionais de mães adequadamente nutridas, há pouca evidência de que seja clinicamente significativa, ocorrendo assim dentro de padrões normais de variação (OMS, 1997).

Há evidências de que existam mecanismos compensatórios que permitam a manutenção da lactação com ingestões energéticas e nutricionais mais baixas que as recomendadas e até sem aumento calórico em relação à dieta da mulher não gestante, não lactante. Isto não significa, evidentemente, que as lactantes em geral não devam aumentar a ingestão de alimentos; ao contrário, sugere que o estado nutricional antes e durante a gravidez tenha papel importante no desempenho lactacional (OMS, 1997).

O requerimento energético durante a lactação é definido como o nível de energia dietética que permita produção de leite suficiente para garantir a saúde do bebê e que não venha trazer consequências negativas à saúde materna. As necessidades energéticas da nutriz serão influenciadas pelo seu estado nutricional, duração e intensidade da amamentação (FAO, 2004).

A *Recommended Dietary Allowance* (RDA), ou seja, o adicional calórico que será suficiente para cobrir as necessidades da nutriz em torno de 98% encontra-se em torno de 330 Kcal durante os primeiros seis meses de lactação e 400 kcal a mais, durante os seis meses seguintes de lactação do que a RDA para mulher não gestante (IOM, 2002).

A necessidade adicional de proteínas para a lactação é calculada tomando-se o conteúdo proteico médio do leite materno (nitrogênio x 6,25) que representa 1,3g/100ml no 1º mês e 1,15g/100mL nos meses subsequentes. Além disso, considera-se uma eficiência de conversão de 70% da proteína da dieta para proteína do leite materno e o coeficiente de variação de 12,5% do volume de leite produzido. Desta forma, a FAO/OMS (1985) recomenda um adicional de 16 g de proteína/dia no 1º semestre de lactação, 12g/dia no 2º semestre e 11g/dia a partir do 3º semestre de lactação.

A *Dietary Reference Intakes* (DRI) para carboidratos durante a lactação considerou-se o conteúdo de lactose do leite materno, ficando uma necessidade média estimada (EAR) de 160g/dia e uma ingestão adequada (AI) de 210g/dia. A EAR e AI fornecem calorias suficientes na dieta para um volume adequado de leite, para prevenir a cetonemia e para manter os níveis apropriados de glicose durante a lactação (IOM, 2002).

Não existem DRI para lipídeos durante a lactação porque ela depende da quantidade de energia necessária pela mãe para manter a produção de leite, mas, recomenda-se que a gordura forneça de 20 a 35% das calorias totais (IOM, 2002).

As deficiências nutricionais de micronutrientes na nutriz podem contribuir para a manutenção de baixas reservas de nutrientes nos lactentes, aumentando as chances para o desenvolvimento de carências nutricionais nos primeiros anos de vida, período em que há maior prevalência de agravos à saúde infantil (Silva, 2007).

O impacto negativo da deficiência de alguns micronutrientes na saúde da nutriz é um problema de saúde pública que vem sendo negligenciado, e tem sido motivo de grande preocupação (Allen, 2005). Dentre os micronutrientes essenciais durante a lactação, destacam-se o zinco e o cálcio que serão abordados na próxima seção.

## 2.2. ZINCO

### 2.2.1 Funções fisiológicas

O zinco é um elemento traço essencial, pois desempenha funções importantes em diversos processos biológicos do organismo humano, incluindo a síntese protéica, o metabolismo de DNA e RNA, metabolismo de carboidratos e lipídios, metabolismo energético, defesa antioxidante, participação no sistema imune, entre outras (Mccall *et al.*, 2000; Szckure *et al.*, 2001; Henriques *et al.*, 2003).

Uma das principais funções do zinco é sua ação enzimática, podendo atuar tanto na estrutura, estabilizando a estrutura terciária da enzima, essencial para sua atividade, como co-fator de reações enzimáticas. Nos sítios estruturais, ou “dedos de zinco” (do inglês, *zinc-fingers*), o zinco é coordenado por 4 aminoácidos (geralmente, dois resíduos de cisteína e dois de histidina) assumindo uma geometria tetraédrica (McCall, 2000 ; Salgueiro *et al.*, 2000). Têm sido identificados em receptores nucleares de hormônios, incluindo àqueles para estrogênio, testosterona e vitamina D (Hambidge, 2003). Já foram identificadas mais de 300 metaloenzimas que necessitam de zinco para sua atividade, como a anidrase carbônica, fosfatase alcalina, carboxipeptidases, álcool desidrogenase, proteína C quinase, ácido ribonucléico polimerase, transcriptase reversa e a superóxido dismutase (tem ação anti-radicaís livres) (Mccall *et al.*, 2000) (Tabela 1).

Sendo um dos micronutrientes intracelulares mais abundantes, pode ser encontrado em todos os tecidos corpóreos. O conteúdo total de zinco no organismo varia de 1,5 a 2g, sendo que, cerca de 85% desse mineral está concentrado nos músculos e ossos, e aproximadamente 80% do zinco presente no sangue encontra-se nos eritrócitos (Mccall *et al.*, 2000; Henriques *et al.*, 2003).

**Tabela 1.** Metaloenzimas e proteínas ligantes de zinco.

<b>Enzimas</b>	<b>Função</b>
Anidrase carbônica	Interconversão CO <sub>2</sub> e bicabornato
Álcool desidrogenase	Catabolismo do álcool
Fosfatase alcalina	Hidrólise de grupos fosfatos
Carboxipeptidase A e B	Digestão da proteína dietética
Enzimas de conversão de angiotensina	Regulação da pressão sanguínea
Superóxido dismutase	Remoção de íons superóxido
- aminolevulínico desidratase	Biosíntese do heme
Insulina nas vesículas secretórias	Compartimentalização da insulina
Receptor de hormônio esteroide	Regulação da transcrição gênica
Receptor de ácido retinóico	Regulação da transcrição gênica
Metalotioneína	Homeostase do zinco e detoxificação
Proteína Kinase C	Sinalização celular
Frutose 1,6 difosfatase	Gliconeogênese
Timulina	Hormônio do sistema imune

Adaptado de Brody, 1995 *apud* Kamp, 2006

O zinco possui ação contra danos oxidativos no organismo. A participação do zinco no sistema de defesa antioxidante tem sido amplamente investigada e pesquisas têm destacado o papel desse mineral em mecanismos, tais como: a regulação da síntese da metalotioneína; estabilidade da estrutura terciária da enzima superóxido dismutase, sendo essencial para sua atividade; e a proteção de grupamentos sulfidríla presentes em proteínas de membranas celulares, e na enzima -aminolevulínico desidratase ( -ALAD) (Powell, 2000; Kamp, 2006; Masaki *et al.*, 2007).

Assim, o papel do zinco na estrutura da enzima superóxido dismutase, corresponde a uma de suas principais ações antioxidantes. Esta possui em seu centro ativo um íon Zn<sup>2+</sup>, como componente estrutural, e um íon Cu<sup>2+</sup>, como co-fator de sua atividade, sendo responsável pela transformação de uma espécie altamente reativa (radical íon superóxido ) em uma menos danosa às células (peróxido de hidrogênio ) (Powell, 2000).

A ação antioxidante do zinco é também evidenciada pelo seu papel estrutural na enzima -ALAD. Esta catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas de ácido -aminolevulínico, formando o composto monopirrólico porfobilinogênio (PBG), sendo para isto necessário que os grupamentos sulfidrílas estejam em seu estado reduzido, que são assim mantidos pelo zinco (Kamp e Donangelo, 2008).

O zinco é essencial para a integridade e funcionalidade das membranas celulares. A sua concentração na membrana das células pode ser bastante elevada dependendo do tipo celular e é influenciada pelo estado nutricional de zinco do organismo (Koury *et al.*, 2003). Estudos em ratos e em humanos (Woodhouse *et al.*, 1998; O'Dell, 2000) tem mostrado que a deficiência de zinco resulta em um aumento da fragilidade osmótica de eritrócitos. Como a deficiência de zinco reduz o conteúdo desse elemento nas membranas de eritrócitos, reduzindo concomitantemente a sua estabilidade, sugere-se que o zinco exerça um efeito protetor direto como componente de biomembranas (O'Dell, 2000).

### **2.2.2 Regulação da homeostase do zinco**

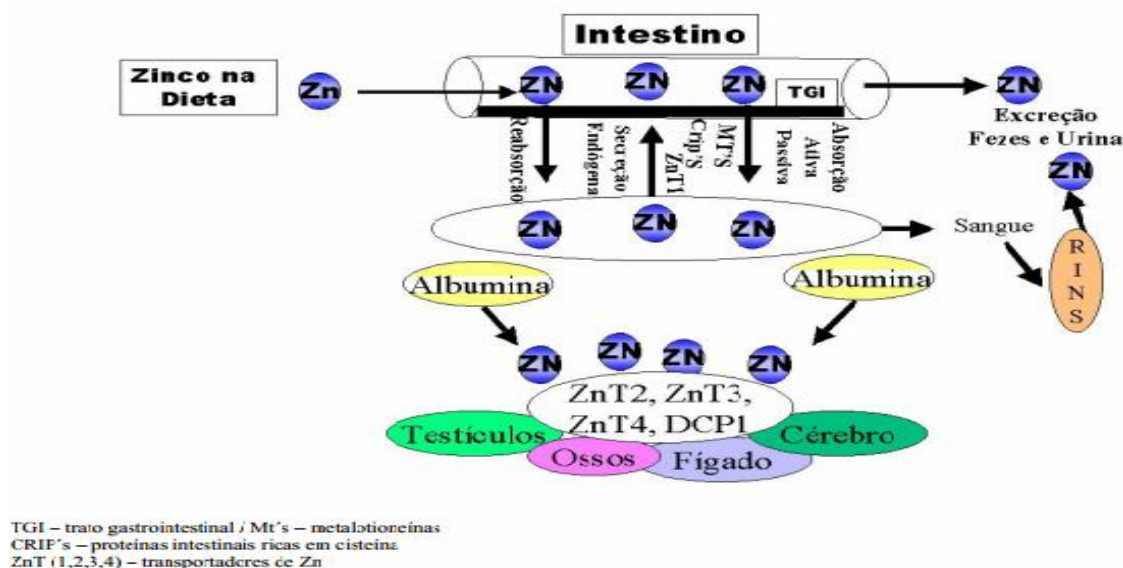
As principais fontes dietéticas de zinco são: carnes bovinas, de frango e peixe, camarão, ostras, fígado, grãos integrais, castanhas, cereais, leguminosas e tubérculos (Krebs, 2000). A absorção do zinco ocorre predominantemente no jejuno e é proveniente de duas fontes: a exógena, correspondente ao zinco dietético, e a endógena, que corresponde àquele zinco secretado pós-prandialmente no lúmen intestinal, proveniente das secreções pancreáticas e intestinais (King *et al.*, 2000; Kamp, 2006). Esse micronutriente é captado na superfície da borda em escova por meio do mecanismo de difusão passiva e por processos mediados por carreadores, sendo que estes mecanismos dependem da quantidade de zinco da dieta. Em situação de baixa concentração luminais de zinco ( $<80\mu\text{mol/L}$ ) predomina o mecanismo mediado por carreadores. Já a absorção por difusão passiva ocorre quando o consumo de zinco está elevado e sua concentração luminal está alta (Salgueiro, 2000). Vale destacar que fatores intraluminais podem influenciar a absorção de zinco, dentre eles, a presença outros elementos traço, proteínas e ácido fítico, exercem um papel importante sob a absorção deste mineral (Pabon *et al.*, 2000).

No interior dos enterócitos, a concentração de zinco é regulada pela metalotioneína intestinal e pela proteína intestinal rica em cisteína (CRIP). Quando o conteúdo de zinco nos enterócitos aumenta, esse mineral permanece ligado à metalotioneína, sendo em seguida excretado nas fezes. Por outro lado, na presença de baixas concentrações do mineral, a metalotioneína regula a transferência do zinco para a proteína intestinal rica em cisteína, a qual funciona como um carreador intracelular de zinco, aumentando assim a sua velocidade de absorção, em seguida este mineral é transportado para a corrente sanguínea (Mafra *et al.*, 2004; Jou *et al.*, 2009).

Após a absorção intestinal, o zinco é transportado pelo fígado através da circulação porta para outros tecidos. No plasma, cerca de 90% do zinco é carregado ligado à albumina e 10% deste mineral está ligado à  $\alpha_2$ -macroglobulina e aminoácidos, especialmente a histidina e a cisteína. A excreção do mineral ocorre por meio do rim, pele e intestino (Dibley, 2001; Islan *et al.*, 2007; Kamp, 2006; Jou *et al.*, 2009).

Os ajustes nesses mecanismos se dão em resposta à quantidade de zinco presente no lúmen intestinal, ao estado nutricional desse mineral no organismo e a estados fisiológicos como gestação e lactação, como forma de garantir uma concentração interna constante de zinco (Krebs, 2000).

Quanto aos aspectos moleculares da absorção de zinco (Figura 3), tem sido investigada a participação das proteínas transportadoras do mineral, que asseguram o carregamento de íons zinco por meio das membranas biológicas. Tais proteínas atuam na captação, no efluxo e na compartimentalização do zinco, contribuindo para a manutenção de seus níveis intracelulares e para sua adequada distribuição nos tecidos, por meio das membranas biológicas. Estas proteínas pertencem a duas famílias de genes: SLC30A e SLC39A, conhecidas como ZnT e Zip (Liuzzi *et al.*, 2004; Seve *et al.*, 2004 Devirgiliis *et al.*, 2007).



**Figura 3:** Esquema da absorção e transporte de zinco no organismo humano. Adaptado de Henrique *et al.* 2003.

Os genes envolvidos na síntese de proteínas transportadoras de zinco foram clonados recentemente. O primeiro gene a ser clonado foi o gene ZnT-1, sendo descoberto em 1995 por Palmiter e Findley. Os transportadores ZnT-1 estão associados com o efluxo de zinco nas células. Nos eritrócitos e nas células tubulares renais, esses transportadores localizam-se predominantemente na membrana basolateral, regulando a absorção e reabsorção desse mineral, sendo encontrado também em vários outros tecidos como, por exemplo, no intestino, rins e fígado. Além do ZnT-1, existem ainda o ZnT-2 que se localiza no intestino, rins e testículos; o ZnT-3 presente nos testículos e cérebro; e o ZnT-4 presente em grandes quantidades nas glândulas mamárias e pode estar envolvido na secreção de zinco no leite (Seve *et al.*, 2004).

Os transportadores da família Zip são responsáveis pela captação intracelular desse mineral. O transportador Zip-1 está presente na maioria dos tecidos humanos, como o intestino delgado e o pâncreas. O Zip-3 está presente em maior concentração no baço e na medula óssea e em menor concentração no intestino delgado e fígado (Palmiter; Findley, 1995; Cousins; McMahon, 2000; Liuzzi; Cousins, 2004). Após a absorção, o zinco é liberado pela célula intestinal, passa para os capilares mesentéricos e é transportado no sangue portal, sendo captado pelo fígado e subsequentemente distribuído para os demais tecidos (King; Keen, 1994; Mafra; Cozzolino, 2004).

### **2.3. REGULAÇÃO DA HOMEOSTASE DO ZINCO NA LACTAÇÃO**

O zinco desempenha um papel crucial durante a embriogênese, o crescimento fetal e secreção de leite, o que aumenta a sua necessidade na gravidez e lactação. Este aumento das necessidades de zinco poderia ser suprido aumentando-se a ingestão de zinco na dieta, juntamente com a realização de ajustes homeostáticos na utilização do mineral (Donangelo *et al.*, 2012).

As necessidades de zinco durante a lactação são maiores do que na gestação (Krebs, 1998). A estimativa dietética de zinco para a nutriz é calculada a partir da quantidade de zinco secretado no leite materno após os ajustes no pós-parto, como a involução uterina e o volume de sangue materno. Embora a concentração de zinco no leite materno diminua durante os primeiros seis meses, a exigência média de zinco absorvido é de 1,35 mg / dia (IOM, 2001; Donangelo *et al.*, 2012). Nas nutrizes com deficiência de zinco, as concentrações normais de zinco são mantidas no leite materno pelo menos nos dois primeiros meses de lactação através da absorção aumentada de



zinco e conversão intestinal (Sian et al, 2002). A necessidade adicional de zinco para um período de seis meses de amamentação exclusiva é de aproximadamente 227 mg, mais que o dobro da quantidade necessária durante a gravidez. Supõe-se que a absorção de zinco média é de 27%, essa necessidade adicional se traduz em um consumo adicional de 4 mg de zinco / dia, um aumento de 50% em relação a mulheres não-grávidas e não-lactantes, sabendo que a DRI para zinco durante a lactação encontra-se em torno de 12 a 14 mg/dia (IOM, 2001).

Pelo fato da lactação ser uma fase de alta demanda de zinco no organismo da nutriz, traz por consequências um mecanismo de estresse fisiológico para manter a homeostase de zinco, principalmente nas primeiras semanas pós-parto (Donangelo *et al.*, 2012). A elevada necessidade de zinco no início da lactação justifica-se pela mobilização de reservas de zinco a partir de tecidos maternos em involução após o parto (útero e sangue materno) e osso trabecular (Moser-Veillon, 1995; Krebs, 1998; Donangelo *et al.*, 2012).

Apesar da transferência de zinco para a circulação materna e glândula mamária, as concentrações de zinco no plasma materno voltam aos níveis pré-gravídicos no pós-parto durante as primeiras semanas (Fung *et al.*, 1997; Krebs, 1999; Donangelo *et al.*, 2005). A concentração de zinco no leite / plasma materno apresenta uma proporção muito elevada (4 vezes ou mais) durante o primeiro mês de lactação, que cai para cerca de 2 vezes em 3 meses, e cerca de 1,5 vezes em 6 meses de lactação (Krebs *et al.*, 1995).

Os estudos em animais e modelos celulares indicam que o receptor 2-macroglobulina, presente nas células epiteliais da glândula mamaria facilita a absorção de zinco e sua transferência para o leite (Beshgetoor, 1999). Importadores de zinco (Zip3) e exportadores de zinco (ZnT-1, ZnT2 e ZnT4) localizados no lúmen alveolar e outras células também desempenham um papel na regulação da concentração de zinco no leite durante toda a lactação (Liuzzi, 2003; Lönnerdal, 2007; Kelleher et al., 2009).

Existem evidências de que os níveis de zinco urinário são mais baixos na lactação do que em mulheres não-lactantes (Krebs *et al.*, 1985). Estudos de traçadores isotópicos foram usados para medir a absorção de zinco durante a lactação (Jackson *et al.*, 1988; Moser Veillon *et al.*, 1995; Fung, 1997; Sian *et al.*, 2002; Donangelo *et al.*, 2005). Em contraste com os estudos de absorção do zinco na gravidez, todos os estudos mostram consistentemente um aumento na absorção de zinco durante a lactação em relação à mulheres grávidas (Fung et al, 1997), com gravidez precoce (Donangelo et

al., 2005), que nunca engravidaram (Sian et al, 2002), e não lactantes no pós-parto (Moser-Veillon et al, 1995). O aumento da eficiência da absorção de zinco parece ser o principal meio para aumentar a retenção de zinco durante a lactação. O total de zinco absorvido foi cerca de 2,4 mg / dia maior na lactação do que as mulheres não grávidas, e é suficiente para fornecer a estimativa de perda líquida de 2 mg de zinco / dia no leite materno. Além disso, a excreção fecal de zinco endógeno foi reduzida nas mulheres lactantes em comparação com grupo que nunca engravidou (Donangelo *et al.*,2012).

## 2.4. AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL DE ZINCO

As deficiências nutricionais de micronutrientes na nutriz podem contribuir para a manutenção de baixas reservas de nutrientes nos lactentes, aumentando as chances para o desenvolvimento de carências nutricionais nos primeiros anos de vida, período em que há maior prevalência de agravos à saúde infantil (Silva, 2007).

O impacto negativo da deficiência de alguns micronutrientes na saúde da nutriz é um problema de saúde pública que vem sendo negligenciado, e tem sido motivo de grande preocupação (Allen, 2005).

Vários métodos laboratoriais são usados para a determinação da adequação de minerais no organismo. Estes métodos podem ser diretos, quando avaliam aspectos relacionados ao metabolismo do mineral, e indiretos, quando determinam parâmetros funcionais. (Allock, 1999; Hambidge, 2003).

Não existe nenhum indicador bioquímico sensível e específico o suficiente para a avaliação do estado de adequação de zinco no organismo. O indicador mais utilizado é a concentração no soro ou plasma (King e Ken, 1999; Wood, 2000; Dibley, 2001; Hambidge, 2003b). A análise do conteúdo de zinco plasmático é recomendada pela WHO/UNICEF/IAEA/IZiNCG (2008) para avaliação do estado nutricional, em escala populacional, uma vez que este indicador bioquímico responde a alterações hormonais e da ingestão dietética do mineral e prediz respostas funcionais para intervenções com o mesmo (Gibson et al., 2008; Lowe *et al.*, 2009). Vale destacar, que apesar de estar bem relacionada com a deficiência de zinco, os níveis de zinco circulantes podem variar devido a diversos fatores, como a concentração de albumina, infecção, doenças crônicas, uso de glicorticóide e de hormônios.

Diferente do plasma, o zinco eritrocitário é um indicador que reflete alterações a médio e longo prazo nos estoques de zinco no organismo, devido à meia-vida longa (120 dias) dos eritrócitos (Mafra *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2005). A excreção de zinco na urina é outro parâmetro também utilizado na avaliação do mineral. A concentração urinária deste oligoelemento está reduzida em situações que desenvolva uma deficiência sistêmica e elevada após o uso de medicamentos e na presença de doenças como o diabetes mellitus (Hambidge 2003; Lowe *et al.*, 2009).

Recentemente, as concentrações de zinco nos leucócitos, nos linfócitos e nos neutrófilos têm sido apontadas como importantes parâmetros bioquímicos para avaliação deste mineral, por conterem grande conteúdo deste oligoelemento. No entanto, estes biomarcadores não têm sido validados, por possuírem uma meia vida

curta. Além disso, a interpretação dos seus resultados deve ser realizada com cuidado, uma vez que alterações no conteúdo plasmático de zinco podem afetar o sistema imune e a concentração deste mineral nos leucócitos (Haase *et al.*, 2006; Kahmann *et al.*, 2008; Lowe *et al.*, 2009).

As evidências sobre a avaliação da atividade de metaloenzimas ligadas ao zinco como indicadores funcionais do estado do mineral têm sido relatadas (Wood, 2000; Dibley, 2001; Hambidge 2003). Dentre as metaloenzimas, temos a atividade da fosfatase alcalina no plasma é uma das determinações empregadas para a avaliação da adequação de zinco no organismo. Esta enzima possui dois íons  $Zn^{2+}$  no seu centro ativo e sua atividade máxima é alcançada quando os sítios ligantes de zinco encontram-se preenchidos (Coleman, 1992; McCall *et al.*, 2000; Wood, 2000; Dibley, 2001; Yousef, 2002). A enzima SOD possui em seu centro ativo um íon  $Cu^{2+}$ , atuando como cofator, e um íon  $Zn^{2+}$ , como componente estrutural, estabilizando sua estrutura terciária da proteína (Powell, 2000). Devido ao papel estrutural do zinco, diferentes estudos têm utilizado a SOD como indicador funcional do mineral (Hambidge, 2003; Lowe; Fekete; Decsi, 2009; Kamp *et al.*, 2011). A determinação da  $\delta$ -ALAD, uma enzima zinco-SH dependente, apesar de ser afetada pelo estado antioxidante do organismo, pode também fornecer informações úteis sobre o estado de zinco no organismo (Xia *et al.*, 1999; O'Dell, 2000). A determinação da fragilidade osmótica de eritrócitos tem sido considerada um bom indicador de estado de zinco em humanos, apesar da variabilidade inter-individual devido a sua associação direta entre a deficiência de zinco e a susceptibilidade de hemólise de eritrócitos (O'Dell *et al.*, 1987; Woodhouse *et al.*, 1998 ; Xia *et al.*, 1999).

Recentemente, pesquisas envolvendo a área da biologia celular e molecular têm evidenciado que a expressão de RNAm das proteínas transportadoras de zinco (ZnTs e Zips) pode ser apontada como uma nova ferramenta para as investigações do estado nutricional relativo ao zinco (Eide, 2006).

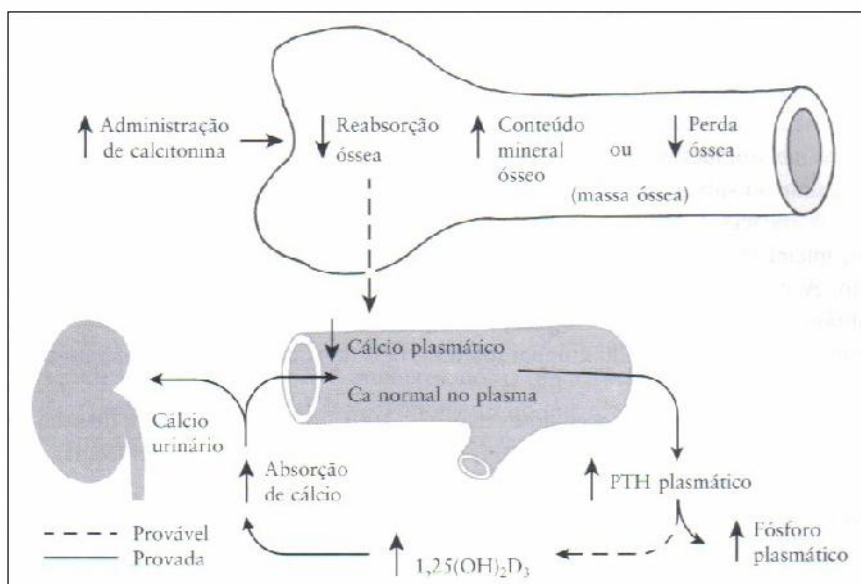
Como todos os indicadores propostos para a avaliação do estado nutricional de zinco sofrem influência de fatores não-nutricionais, recomenda-se então a realização de várias medidas laboratoriais associadas (King e Ken, 1999; Wood, 2000; Dibley, 2001).

## 2.5.METABOLISMO ÓSSEO

O tecido ósseo constantemente sofre processos de formação e degradação óssea, em um processo denominado remodelagem óssea (*turnover* ósseo), que é mediado por células ósseas (osteoblastos, osteoclastos e osteócitos) (Prentice, 2001).

A regulação do “*turnover*” ósseo se dá pela ação de diversos hormônios, fatores locais e a interação entre eles. Dentre os hormônios calcitropicos (PTH, calcitonina), outros podem atuar direta ou indiretamente sobre os osteoclastos e/ou osteoblastos, como o estrogênio, hormônio do crescimento (HC), hormônio tireoideano e glicocorticóides (Compston, 2001).

As concentrações de PTH, calcitonina e  $1,25(OH)_2D$  respondem a mudanças na concentração de íons  $Ca^{+2}$  no plasma. Quando a concentração de  $Ca^{+2}$  está baixa, há um estímulo para a secreção de PTH que, junto com  $1,25(OH)_2D$ , leva o aumento da absorção intestinal, da mobilização de cálcio dos ossos e da reabsorção tubular renal de cálcio (Figura 4). Em contrapartida, o aumento da concentração plasmática de íons  $Ca^{+2}$  estimula a secreção de calcitonina que por sua vez inibe a mobilização de cálcio dos ossos e promove aumento da excreção urinária de cálcio (Weaver, 2001).



**Figura 4:** Ação do PTH e calcitonina sobre os níveis de cálcio no organismo. Adaptado de Woof, 1988.

### 2.5.1 Regulação do “turnover” ósseo

O processo de reabsorção óssea envolve uma série de etapas. A etapa inicial se dá através da proliferação de precursores de osteoclastos, seguindo com a sua diferenciação e maturação, levando assim a degradação de matrizes orgânicas de colágenos e inorgânicas do tecido ósseo, por meio da ação de metaloproteinases da matriz (Tay *et al.*; 2004; Gallagher, 2008; Paula-Silva *et al.*, 2010; Trouvin *et al.*, 2010).

Sabe-se que o sistema RANK/RANKL/OPG é responsável pela modulação da osteoclastogênese. RANK é o receptor expresso na superfície dos osteoclastos, células dendríticas e células T ativadas (Boyle *et al.*, 2003; Lerner, 2004; Wang *et al.*, 2011). O RANKL é um mediador solúvel sintetizado pelos osteoblastos, que ativará os osteoclastos quando se ligar ao seu receptor, o RANK. Esse mediador é necessário para induzir a expressão de genes que especificam a linhagem de osteoclastos, incluindo também os genes que codificam a enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), catepsina K e o receptor para calcitonina, levando à maturação de osteoclastos (Boyle *et al.*, 2003; Lau *et al.*, 2005). A osteoprogesterina (OPG), secretada pelos osteoblastos bloqueia os efeitos do RANKL e impede sua ligação ao receptor RANK, inibindo a diferenciação de osteoclastos (Lerner, 2004; Jin *et al.*, 2007).

Estudos em camundongos observaram que a superexpressão de OPG bloqueia a maturação dos osteoclastos e a deleção do gene para OPG resulta no aumento da remodelação óssea, induzindo o desenvolvimento de osteoporose (Kearns *et al.*, 2008; Anandarajah, 2009).

### 2.5.2 Metabolismo ósseo durante a lactação

A lactação é um período de desmineralização temporária do tecido ósseo, como um mecanismo de manutenção da homeostase de cálcio materna, sendo a perda influenciada pelo tempo de aleitamento materno, fatores genéticos e nutricionais (Bezerra *et al.*, 2008). Adaptações significativas na homeostase do cálcio materna e na remodelação óssea ocorrem para suportar as demandas da gravidez e lactação (O’ Brien *et al.*, 2012). Para compensar a demanda de cálcio na lactação, as adaptações fisiológicas no organismo da nutriz podem incluir aumento da absorção intestinal de cálcio, conservação renal e aumento da mobilização de cálcio dos ossos. (Bezerra *et al.*, 2002).

O *turnover* ósseo está aumentado durante a gestação e a lactação, possibilitando

uma dinâmica de entrada e saída de minerais do tecido ósseo, que contribui para a maior disponibilidade de cálcio para o crescimento fetal e para a produção de leite (Prentice, 2000; O'Brien *et al*, 2012).

Os marcadores bioquímicos de formação e reabsorção óssea é relativamente mais alto durante a lactação do que na gestação independente na ingestão de cálcio (Bezerra *et al.*; 2002). Segundo a RDA (2011), a ingestão de cálcio e vitamina D para lactantes adultas deve estar na faixa de 1000mg/dia e 800UI, respectivamente. O teor de cálcio do leite humano não está relacionado com a dieta materna. Durante lactação, a demanda fisiológica aumenta de 200 a 300 mg de cálcio por dia. Com isso, ocorre aumento da concentração sérica da 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> e, conseqüentemente, da absorção do cálcio, como mecanismo compensatório ao aumento da remodelação óssea materna (Bezerra *et al*, 2002; O'Brien *et al*, 2012).

Diversos estudos têm investigado a atuação do zinco no metabolismo ósseo e sua interação com cálcio. A baixa ingestão de cálcio durante a lactação, pode levar a mobilização de zinco ósseo materno em camundongos (Weitssaub, 2001; Donangelo *et al.*; 2012). Um dos maiores reservatório de zinco do corpo é o tecido ósseo. Estima-se que cerca de 30 mg de zinco, ou cerca de 1 mg/dia, pode ser liberado a partir de tecidos maternos durante a involução no primeiro mês de lactação (IOM, 2001). A quantidade de zinco liberado do osso materno durante a lactação não foi quantificado. Mas, aproximadamente 30% do zinco total do corpo está presente em tecido ósseo, e estima-se que cerca de 4% a 6% de massa óssea materna é perdida durante os 6 meses de lactação completo permitindo que osso materno contribua com cerca de 20% do zinco do leite materno ao longo de um período de 6 meses (Moser-Veillon, 1995; Yamaguchi, 2010; Donangelo *et al*, 2012).

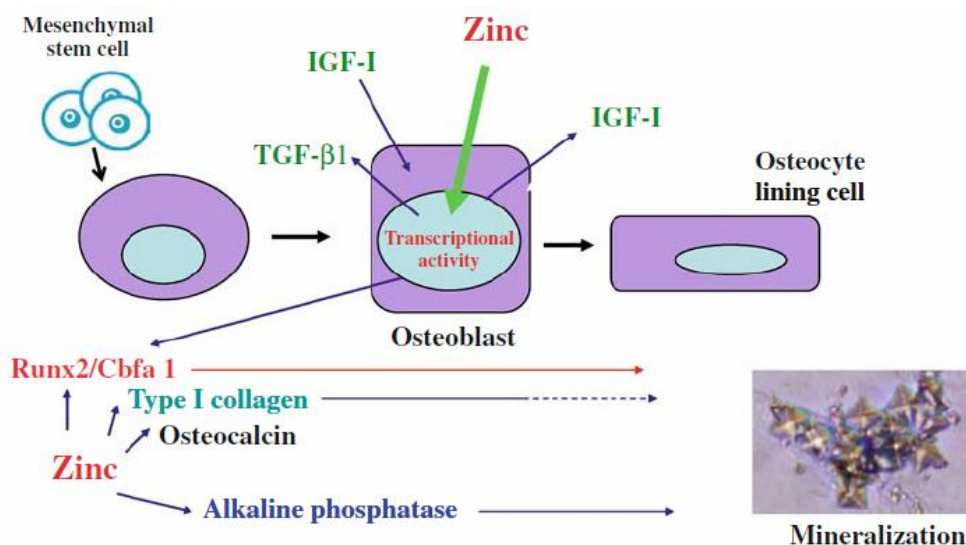
## **2.6 Zinco e massa óssea**

O efeito estimulatório do zinco na formação óssea tem disso demonstrado *in vitro* e em *in vivo*. Além de estimular a proliferação e diferenciação de células osteoblásticas, o zinco promove um efeito inibitório na reabsorção óssea, especificamente nas células precursoras de osteoclastos na medula óssea (Yamaguchi, 1998; Yamaguchi & Gao, 1998; Wang *et al*, 2009).

Yamaguchi (1998) desenvolveu um trabalho experimental, no qual ratos receberam suplementação de sulfato de zinco durante 3 dias e foi observado um aumento dose-dependente do conteúdo de zinco, DNA, colágeno, cálcio e na atividade

da fosfatase alcalina da diáfise femural. Ovesen *et al.* (2001) desenvolveram um estudo para avaliar os efeitos de uma dieta semi-sintética de zinco sobre o metabolismo ósseo. Observou-se que o zinco promoveu um aumento da resistência e do comprimento do fêmur, além de melhorar os índices de crescimento e aumentar o peso corpóreo de ratos em crescimento de maneira dose-dependente. Esses estudos revelam o efeito positivo do zinco sobre a massa óssea

O papel do zinco no controle do metabolismo ósseo, tem sido associado ao aumento da atividade da aminoacil-RNA transportador sintetase nos osteoblastos, a qual está envolvida no primeiro passo da biossíntese proteica. Dentre as proteínas que apresentam sua síntese aumentada tem-se a osteocalcina, o fator de crescimento semelhante a insulina tipo I (IGF-I) e o fator de crescimento beta de transformação (TGF-beta) (Ito *et al.*, 2005; Janssens *et al.*, 2005). Esses fatores de crescimento agem recrutando células pré-osteoblásticas, induzindo a diferenciação e a maturação dessas em osteoblastos maduros, os quais serão capazes de sintetizar colágeno em grande quantidade (Gracitelli *et al.*, 2002). (Figura 5)



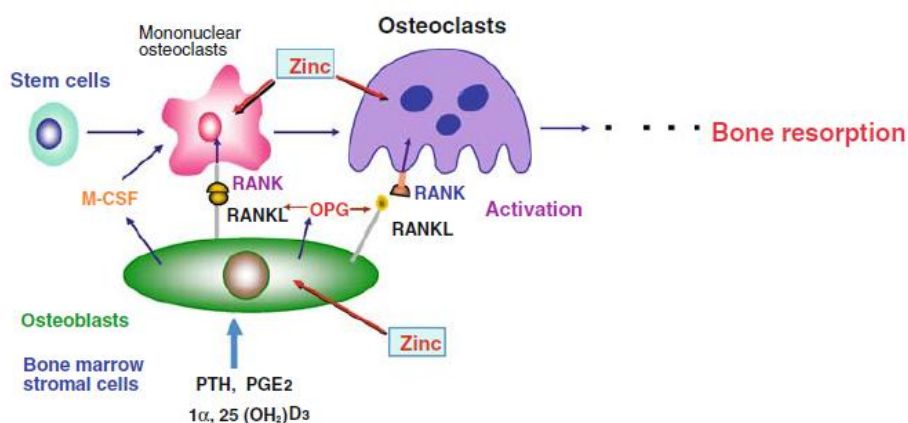
**Figura 5.** Esquema da ação do zinco sobre a formação óssea. O zinco estimula a diferenciação celular, proliferação, a mineralização em osteoblastos. Além de estimular a expressão do gene de várias proteínas, incluindo Runx2/Cbfa1 (Fator de transcrição para diferenciação em células osteoclásticas), colágeno tipo I, fosfatase alcalina e a osteocalcina. O zinco também aumenta produção de IGF-I e TGFβ1 nas células e a síntese de proteínas ativando aminoacil-tRNA sintetase. Fonte: Yamaguchi (2010).



O zinco mostrou aumentar efeito anabólico da vitamina D3 em componentes ósseos em fêmur de ratos in vivo recém-desmamados. A administração de vitamina D3 ou de zinco produziu um aumento significativo na atividade da fosfatase alcalina do osso. O aumento da atividade da fosfatase alcalina foi aumentada pela administração simultânea de vitamina D3 e zinco (Yamaguchi, 2010). O zinco também participa como componente mineral de osso, provavelmente em hidroxiapatita (Murray *et al*, 1981; Sauer *et al*, 1990), que pode ser complexo com flúor; e tanto o zinco e o complexo de zinco fluoreto pode melhorar a cristalinidade de apatita (Lappalainer *et al*, 1983).

O efeito de 1,25-di-hidroxivitamina D3 no aumento da atividade da fosfatase alcalina óssea no conteúdo de DNA foi sinergicamente melhorada após o tratamento com zinco (Yamaguchi *et al*, 1986). Os receptores para 1,25 - dihidroxivitamina D3 possuem no local de interação com o DNA dois dedos de zinco (McDonnell *et al*, 1987). Assim, o zinco pode potencializar a interação do receptor da 1,25-di-hidroxivitamina D3 com o DNA no local. Estes achados sugerem que a combinação de vitamina D3 e de zinco tem um efeito sinérgico na estimulação da mineralização e do crescimento ósseo em ratos in vivo (Yamaguchi, 2010).

O zinco atua também na reabsorção óssea, suprimindo a ação dos osteoclastos, através do seu efeito inibidor sobre o RANKL, um mediador que age na ativação dos osteoclastos, estimulando também a expressão do gene de OPG, que irá bloquear o efeito do RANKL e impedirá a ligação do RANKL ao seu receptor RANK e assim a diferenciação de osteoclastos (Figura 6).



**Figura 6:** Ação do zinco na reabsorção óssea. Fonte: Yamaguchi, 2010.

### **3. OBJETIVOS**

### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o estado nutricional de zinco e sua relação com a massa óssea em nutrizes adultas ao longo da lactação.

### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Determinar a massa óssea e o estado nutricional de zinco, através de variados indicadores bioquímicos funcionais de Zn, de um grupo de nutrizes em dois períodos lactacionais;
- ✓ Investigar o efeito dos períodos lactacionais sobre o estado nutricional de zinco e sobre a massa óssea materna, entre a segunda e a décima quarta semanas de lactação;
- ✓ Investigar a associação entre a massa óssea materna e o estado nutricional de zinco nos dois estágios lactacionais estudados.



## **4. MATERIAL E METODOS**

#### **4.1 Voluntárias do estudo e desenho experimental**

Após aprovação do protocolo experimental pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE)/ UERJ (APÊNDICE I), foram recrutadas 15 mulheres adultas (idade 20-40 anos), atendidas na Policlínica Américo Piquet Carneiro (UERJ) e unidades particulares de saúde.

As voluntárias foram inicialmente abordadas, no último mês de gestação, para identificação da intenção de aleitamento prolongado e explicação do estudo. Neste momento foram coletadas informações pessoais através de um questionário próprio (ANEXO).

Todas as nutrizes participantes do estudo (n = 15) eram aparentemente saudáveis, não apresentavam doenças crônicas, amamentavam de forma exclusiva ou predominante, não faziam uso rotineiro de medicamentos e/ou suplementos nutricionais e eram sedentárias ou praticantes de atividade física leve.

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO), foram coletadas amostras biológicas e realizado o exame de densitometria de dupla emissão de raio-X (DEXA) em dois estágios lactacionais: entre a 2ª e 4ª semana pós-parto (1º período lactacional) e entre a 12ª e 14ª semana pós-parto (2º período lactacional). Ambos períodos foram escolhidos para a avaliação do estudo, visto que, 4 meses é o tempo de amamentação que a maioria das lactantes mantem exclusivamente, devido ao período de licença maternidade da mulher ser de 4 meses.

## 4.2 Coleta e processamento das amostras

As amostras foram coletadas na residência das voluntárias por uma enfermeira especializada e transportadas em isopor com gelo para processamento e análise no Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos – UFRJ. As determinações de minerais em urina, plasma e eritrócitos foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Emissão Ótica- ICP OES da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Uma amostra de sangue (20 ml) foi coletada de cada voluntária pela manhã, após jejum noturno de 10h, por punção venosa à vácuo em um tubo sem anticoagulante, dois contendo heparina e outro com EDTA (BD Vacutainer®) para obtenção de soro, plasma e fração de eritrócitos.

Após a coleta, alíquotas de sangue integral heparinizado foram utilizadas para determinação do hematócrito, da hemoglobina e da atividade da ácido aminolevulínico desidratase( -ALAD) e sua reativação *in vitro* com zinco. O restante foi centrifugado (3000 rpm– 10min) para separação do plasma e alíquotas de plasma foram armazenadas em tubos tipo “Eppendorf“ à -20°C para posterior determinação de zinco, cálcio, albumina e atividade da fosfatase alcalina total e óssea. Após remoção da camada de leucócitos (“buffycoat”), a fração de eritrócitos restante foi ressuspensa em solução salina isotônica (NaCl 0,9%, p/v, em água deionizada), homogeneizada por inversão cuidadosa e centrifugada (3000rpm – 10min). Esta etapa foi efetuada três vezes, garantindo assim a lavagem dos eritrócitos. Uma alíquota de 200µl de eritrócitos íntegros foi reservada no gelo para análise da fragilidade osmótica de eritrócitos. O restante da fração de eritrócitos foi lisada em vórtex após adição de igual volume de água deionizada e armazenada em alíquotas (-20°C) para posterior análise de zinco e em Nitrogênio Líquido para análise de superóxido dismutase.

O soro foi obtido após a centrifugação de amostras de sangue em tubo sem anticoagulante, incubadas a 37°C por duas horas para retração do coágulo, sendo, então alíquotado e armazenado a 20°C para posterior análise de albumina.

Amostras de urina (10 mL) foram coletadas em frascos apropriados e separadas em alíquotas, armazenadas ( 20°C) para análise de zinco, cálcio, fósforo e de creatinina.

Todo material utilizado para coleta, processamento e armazenamento foi previamente lavado em ácido nítrico diluído quatro vezes em água deionizada e posteriormente enxaguado com a mesma.

### **4.3 Análises Laboratoriais**

Todas as análises descritas a seguir foram realizadas em duplicata e controladas com o branco específico para cada análise.

#### **4.3.1 Indicadores bioquímicos gerais**

##### **⇒ Sangue**

##### **✓ Hematócrito em sangue total**

O hematócrito foi determinado pela técnica capilar tradicional através da separação por centrifugação do sangue em centrífuga para microhematócrito (Hemospin, Incibrás) por 12,5 minutos, e expressos em percentual (%v/v) através da razão entre a altura correspondente às hemácias e altura do sangue total. As alturas foram medidas com paquímetro de precisão de 0,001cm.

##### **✓ Hemoglobina em sangue total**

A concentração de hemoglobina foi determinada pelo método de cianometahemoglobina através de Kit comercial (BioClin, Brasil). A técnica está baseada na oxidação do átomo de ferro ( $Fe^{+2}$ ) da molécula de hemoglobina pela adição de 5mL de tampão contendo ferrocianeto de potássio em pH levemente alcalino a 20 $\mu$ L de sangue formando meta-hemoglobina que é convertida em cianometahemoglobina após a reação com cianeto de potássio contido na mesma solução. Após a adição do reagente de cor, as amostras foram homogeneizadas e mantidas à temperatura ambiente, devidamente protegidas da luz, por cinco minutos. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas (PerkinelmerWallac - Victor 2 1420-015) em comprimento de onda de 540 nm e a concentração de hemoglobina foi expressa em g/dL.

##### **✓ Albumina**

A concentração de albumina foi determinada baseada na formação de um complexo corado pela reação da albumina presente na amostra (10 $\mu$ L) com a solução verde de bromocresol (0,14g/dL) em tampão succinato pH 4,2, como reagente de cor (2,5 mL) (Kit comercial BioClin, Brasil). A absorbância foi medida a 628 nm em espectrofotômetro (Beckmam DU, 650). Os resultados foram expressos em g/L.



✓ **Urina**

✓ **Creatinina**

A creatinina foi determinada nas amostras de urina por colorimetria, baseada na reação com ácido pícrico em meio alcalino, de acordo com Husdan e Rapoport (1968). A partir do padrão estoque de creatinina (2mg/mL em HCL 0,1N) (Merck) foram preparadas três soluções padrões diluídas de creatinina (P1 - 5µg/ml; P2 - 10µg/ml; P3 - 20µg/ml). Às alíquotas de 1,5 mL de urina diluída cem vezes, aos padrões diluídos e ao branco, foram adicionados 0,5 mL de hidróxido de sódio (Merck) 0,75N e 0,5 mL de ácido pícrico (Reagen) 0,04N. Após exatamente vinte minutos, a leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 492 nm em microplacas. Os resultados foram expressos em mg/mL ou mmol/mL.

#### 4.3.2 Indicadores Bioquímicos de Estado de Zinco

⇒ **Eritrócito**

✓ **Atividade da enzima ácido  $\delta$ -aminolevulínico desidratase (  $\delta$ -ALAD) e ativação *in vitro* com zinco**

Foi determinada de acordo com método descrito por Tomokuni e Kawanishi (1975). Este método está baseado no papel catalítico da enzima sobre o substrato ácido  $\delta$ -aminolevulínico ( $\delta$ -ALA) formando porfobilinogênio (PBG) que, em seguida é posto a reagir com *p*-dimetil aminobenzaldeído (reagente de Ehrlich), com consequente formação de cromóforo ( $\lambda_{\text{máx}}= 554$  nm). Para a análise, uma alíquota de sangue integral fresco (1 mL) foi diluída com 6,5 mL de água Mili-Q, seguida de agitação em vórtex por 60 s para hemólise completa. Todos os reagentes e o hemolisado foram previamente equilibrados em banho-maria a 37 °C, sendo toda análise realizada nessa temperatura. Para a determinação da atividade da  $\delta$ -ALAD sem e com (Zn-  $\delta$ -ALAD) ativação com zinco, 500 µL do hemolisado foram diluídos 1,5 vez com água deionizada ou com solução 0,5 mmol/L de acetato de zinco, respectivamente. As amostras foram homogeneizadas e, após 10 minutos, a reação enzimática foi disparada com adição de 500 µL de solução de  $\delta$ -ALA (20 mmol/L; em tampão fosfato 0,2 mol/L, pH 6,8). Após 60 min, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 500 µL de solução aquosa de HgCl<sub>2</sub> 0,1 mol/L em TCA 10%. Os tubos foram agitados em vórtex e centrifugados em 12.000 rpm por 5 minutos. A uma alíquota de 200 µL do sobrenadante foram adicionados 600 µL do reagente de Ehrlich, preparado no dia da análise, com *p*-dimetil-

aminobenzoaldeído (0,2 g), ácido acético glacial (8 mL), ácido perclórico 9,0 M (1 mL) e água destilada (1 mL). Após 10 minutos de reação a quantidade de PBG formada foi lida em espectrofotômetro (Shimadzu, UV-1800) a 555nm. A atividade da enzima foi calculada com base na Equação 1 (Tomokuni e Kawanishi, 1975) e expressa em  $\mu\text{mol}$  de PBG/min/L de eritrócito.

$$\text{Atividade} = \text{Absorbância (554 nm)} \times 1823 / \text{Hematócrito (\%)} \quad 1$$

#### ✓ **Zinco eritrocitário**

Para a determinação da concentração de zinco eritrocitário, alíquotas de 250  $\mu\text{L}$  de eritrócitos foram submetidas à hidrólise ácida pela adição de 500  $\mu\text{L}$  de ácido nítrico (ultrapuro Merck). Após a homogeneização, as amostras foram mantidas em banho maria à temperatura de 85 °C por 7 horas. Adicionou-se 1250  $\mu\text{L}$  de água Mili-Q (lisado diluído 8 $\times$ ) e após essa primeira diluição, diluiu-se mais 5 vezes o lisado. Os teores de zinco foram determinados por leitura direta dos hidrolisados em espectrômetro de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) (Perkin Elmer Plasma 1000), e foram expressos em  $\mu\text{mol/L}$ .

#### ✓ **Fragilidade osmótica de eritrócitos (FOE)**

Foi realizada por método adaptado de O'Dell *et al.* (1987), baseado no percentual de hemólise de eritrócitos incubados *in vitro* em meio hipotônico, sob condições padronizadas. Alíquotas da fração de eritrócitos lavadas em solução salina (10  $\mu\text{L}$ ) foram pipetadas na parede de tubos tipo “ependorf” contendo 1mL soluções salinas (NaCl) de concentrações decrescentes (0,9%, 0,38% e 0%). Em seguida todos os tubos foram invertidos simultaneamente, de modo que os eritrócitos entrarão em contato com as soluções ao mesmo tempo. Após 15 minutos, foram centrifugados em microcentrífuga (BeckmanMicrofuge<sup>TM</sup>) por 3 minutos e os sobrenadantes (200  $\mu\text{L}$ ) transferidos para microplaca. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas (PerkinelmerWallac - Victor 2 1420-015) a 540 nm. Os resultados foram expressos em percentual.

#### ✓ **Zn-Cu superóxido dismutase em eritrócitos (SOD)**

Foi utilizado o método de auto-oxidação do pirogalol (Koury *et al*, 2003) . A atividade total de SOD foi determinada pela sua capacidade de inibir a auto-oxidação do ácido pirogálico (pirogalol) pelo ânion superóxido. A reação consiste na adição de 100 µL de tampão Tris/HCl (EDTA 1M; pH 8,0; 5 mM), 20 µL de pirogalol 10 mM e 860 µL de água deionizada a 20 µL de hemolisado. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 420 nm. A quantidade de SOD capaz de produzir 50% de inibição da oxidação do pirogalol por miligrama de hemoglobina é definida como uma unidade de atividade enzimática expressa em U/ mgHb

⇒ **Plasma**

✓ **Zinco plasmático**

Para a determinação da concentração de zinco, alíquotas de 400 µL de plasma foram submetidas à hidrólise ácida pela adição de 1400 µL de ácido nítrico (ultrapuro Merck) 0,5%, preparado com água Mili-Q. Após a homogeneização, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 24 horas para a precipitação das proteínas, que foram então centrifugadas por 10 minutos em microcentrífuga (Beckman Microfuge E<sup>TM</sup>). Após centrifugação, o sobrenadante recolhido foi diluído 5 vezes com água Mili-Q. Os teores de zinco foram determinados por leitura direta dos hidrolisados em espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) (Perkin Elmer Plasma 1000), e foram expressos em µmol/L.

✓ **Fosfatase alcalina total no plasma e de origem óssea**

Foi determinada de acordo com a técnica adaptada de Farley *et al* (1981) que se baseia na formação de p-nitrofenol, como resultado da atividade fosfatásica sobre o substrato p-nitrofenilfosfato. Para a determinação da atividade total, foram utilizadas uma mistura reacional contendo: 1,5 mL do substrato p-nitrofenilfosfato, dissolvido em tampão carbonato de sódio 150 mM, pH 10,3 e 150 µL de tampão Tris/HCL 25mM, pH 8,0. Esta mistura foi incubada à 37°C por 5 minutos e a reação foi iniciada imediatamente após 50 µL de plasma à mistura reacional. A mistura foi lida em espectrofotômetro (Beckman DU 650) a 405 nm durante 10 minutos. A atividade foi expressa em µmol de produto formado (p-nitrofenol) por minuto (U) por litro de plasma (U/L).

O método da atividade da fosfatase alcalina de origem óssea está fundamentado na labilidade da isoforma óssea da fosfatase alcalina frente ao calor. Alíquotas de 100

$\mu$ L de plasma tratada com tampão Tris/HCL 25mM, pH 8,0 e substrato p-nitrofenilfosfato foram incubadas em banho-maria 56 °C por 10 minutos e imediatamente transferidas para um banho de gelo e a reação foi iniciada após a adição de 200  $\mu$ L de amostra de plasma tratada à mistura reacional. A atividade da fosfatase alcalina não óssea (termoestável) foi determinada diretamente no espectrofotômetro em temperatura de 30 °C com leitura das absorbâncias em 405nm tendo como substrato o p-nitrofenilfosfato. A fração óssea, foi determinada indiretamente subtraindo-se a atividade da fosfatase alcalina termoestável da fosfatase alcalina total.

⇒ **Urina**

#### ✓ **Zinco urinário**

Foi determinada pelo mesmo método de zinco plasmático e eritrocitário. Com exceção a preparação, na qual serão utilizadas 1000  $\mu$ L de urina e adicionados nesta, 1000  $\mu$ L de ácido nítrico 0,5 % (Merck) para a hidrólise. Após a homogeneização, descanso de 24 horas e centrifugação. Os teores de zinco foram determinados por leitura direta dos hidrolisados em espectrômetro de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) (Perkin Elmer Plasma 1000), e foram expressos em  $\mu$ mol/L.

#### **4.4. Dados de ingestão alimentar**

A ingestão alimentar das voluntárias foi obtida através do Recordatório de 24 horas (R-24) e Questionário de Frequência Alimentar (QFA) e calculada no software Avanutri<sup>®</sup>.

#### **4.5. Dados antropométricos**

Para se obter o peso e a estatura das voluntárias, pesou-se e mediu-se em balança digital (Filizola<sup>®</sup>) e estadiômetro. Os dados referentes ao Índice de Massa Corporal (IMC) foram obtidos através do exame de densitometria por dupla emissão de raios-X (iDEXA) (GE-Health Care) sob supervisão especializada.

#### **4.6. Massa óssea**

##### **4.6.1 Indicadores bioquímicos**

Os indicadores bioquímicos cálcio plasmático e urinário, fósforo plasmático e urinário foram determinados pelo mesmo método de zinco urinário e plasmático por leitura direta dos hidrolisados em espectrômetro de emissão ótica com plasma

indutivamente acoplado (ICP-OES) (Perkin Elmer Plasma 1000), e foram expressos em  $\mu\text{mol/L}$ .

#### **4.6.2 Densitometria óssea**

A densidade óssea e o conteúdo mineral ósseo, do esqueleto total, da região lombar da coluna vertebral (L1-L4) e fêmur foram determinadas no dia seguinte a coleta através da análise do iDEXA sob supervisão especializada no Laboratório de Avaliação Nutricional (LAN – UERJ).

#### **4.7. Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa computacional Graphpad Prism 4,0. Estatística descritiva foi utilizada para caracterização do grupo estudado. Análise de correlação de Pearson foi realizada para associação entre os indicadores bioquímicos de estado de zinco e os indicadores de massa óssea. Teste *t*-pareado foi realizado para se avaliar o efeito dos estágios lactacionais sobre as variáveis estudadas. Foram considerados nível de significância de 5 % menor ou igual ( $p < 0,05$ ) e tendência de significância ( $p = 0,051$  a  $1,0$ ).

## **5. RESULTADOS**

## 5.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS VOLUNTÁRIAS

As voluntárias do estudo tinham, em média,  $31 \pm 4,7$  anos de idade, sendo consideradas adultas. Todas as nutrizes avaliadas eram primíparas e apresentaram gravidez a termo (idade gestacional do parto:  $39,6 \pm 1,2$  semanas), sendo 54 % dos partos do tipo cesáreo (n=8).

No início do estudo, todas as nutrizes estavam em amamentação exclusiva, porém no 2º período de lactação estudado, 36% do grupo (n=5) relatou aleitamento materno predominante, com uso de fórmula infantil ou de sucos ou de mamadeiras de mingau, uma vez ao dia a partir da 11ª semana de lactação.

A maioria das voluntárias (93%) era sedentária e a partir da 11ª semana de lactação apenas duas relataram prática de pilates e caminhada (duas vezes por semana). No início do estudo nenhuma voluntária era usuária de anticoncepcional hormonal, porém, 36% do grupo (n=5) iniciou o uso a partir da 10ª semana de lactação.

As características gerais das nutrizes estão apresentadas na **Tabela 2**. Em relação ao IMC médio o grupo estudado apresentou diagnóstico de sobrepeso (WHO, 2010) em ambos os estágios lactacionais avaliados. A maioria das nutrizes (73 %) apresentou anemia no início do estudo de acordo com os valores de hemoglobina ( $<12\text{g/dL}$ ; WHO, 1999), mesmo tendo relatado uso de suplementos de ferro durante a gestação (60mg/dia a partir da 20ª semana de gestação), conforme recomendação do Ministério da Saúde (2005). A partir do 3º mês de amamentação, o percentual de voluntárias com anemia reduziu para 35 %, com aumento significativo de 11,6% na concentração de hemoglobina. A concentração média de albumina sérica nos dois estágios lactacionais avaliados encontrou-se dentro da faixa de normalidade (3,5 a 5,5 g/dL; Allock, 1999). Porém, a frequência de subadequação desse indicador no início do estudo e no 2º período de lactação, foi de 57,1% e de 45,4%, respectivamente.

Em média, a subadequação de ingestão habitual do grupo estudado foi de 35,5% para cálcio (1000mg/dia; IOM, 2010), 84% para Vitamina D (15mcg/dia; IOM, 2010) e de 38,2% para zinco (12mg/dia; IOM, 2002) (Tabela 2). Por outro lado, a ingestão média de fósforo e de proteína das voluntárias estava acima da recomendação (IOM, 1997; IOM, 2002). A relação de ingestão de cálcio/fósforo foi considerada baixa (Lobo, 2004).

**Tabela 2.** Características gerais de estado nutricional das nutrizes estudadas<sup>1</sup>

	Estágio da lactação		p <sup>2</sup>
	2 <sup>a</sup> a 4 <sup>a</sup> semana	12 <sup>a</sup> a 14 <sup>a</sup> semana	
	(n=15)	(n=14)	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	26,0 ± 4,1	25,4 ± 3,9	NS
Hemoglobina (g/dL)	11,2 ± 1,6	12,5 ± 1,5	0,04
Hematócrito (%)	38,3 ± 3,7	38,9 ± 3,0	NS
Albumina sérica (g/dL)	3,7 ± 0,9	3,6 ± 0,8	NS
Ingestão habitual:			
Energia (Kcal/dia)	1390 ± 301	—	—
Proteínas (g/dia)	147,9 ± 67,6	—	—
Cálcio (mg/dia)	617,9 ± 360,7	—	—
Fósforo (mg/dia)	885,3 ± 328,1	—	—
Cálcio/Fósforo (g/g)	0,69 ± 0,14	—	—
Zinco (mg/dia)	7,7 ± 3,8	—	—

<sup>1</sup> Dados apresentados como média ± desvio padrão ; IMC: Índice de Massa Corporal.

<sup>2</sup> Significância de comparação entre os estágios lactacionais (teste-t pareado, n = 14; p < 0,05) ; NS, não significativo.

## 5.2. ESTADO NUTRICIONAL DE ZINCO E INDICADORES DE MASSA ÓSSEA NOS ESTÁGIOS LACTACIONAIS AVALIADOS.

Os indicadores bioquímicos de estado nutricional de zinco das voluntárias do estudo estão apresentados na **Tabela 3**. Dentre estes, somente o zinco plasmático possui valores de referência para a população estudada (Hotz *et al*, 2003).

As voluntárias iniciaram o estudo com concentração de zinco no plasma, em média, abaixo do valor de normalidade (> 11,9µmol/L; Hotz *et al*, 2003), sendo esta constatação observada em 66% (n=10) do grupo estudado. Após 10 semanas de estudo, houve uma tendência de aumento na concentração plasmática do mineral, sendo esta normalizada em oito voluntárias. Os outros indicadores de estado nutricional de zinco avaliados, com exceção da fragilidade osmótica de eritrócitos, modificaram significativamente no 2º período de lactação, (tabela 3). Observou-se aumento médio de 21% na excreção urinária de zinco e de 38% no percentual de reativação da -ALAD



com zinco, e redução de 26% na concentração eritrocitária de zinco, de 18% na atividade da -ALAD e de 21% na atividade da SOD.

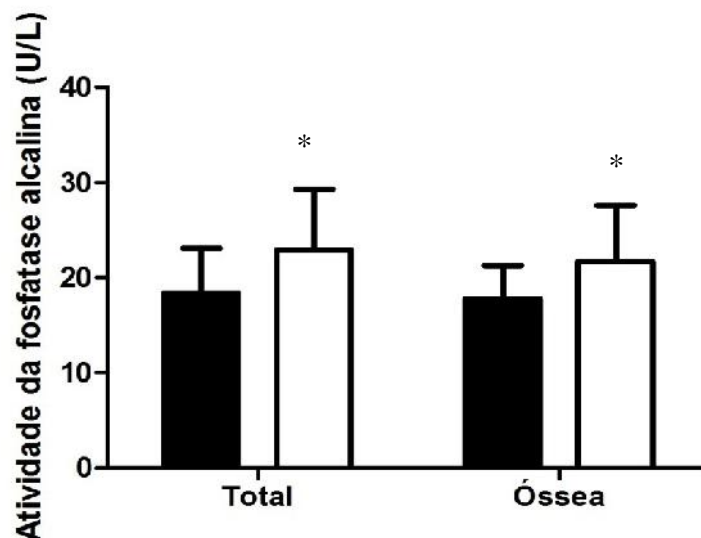
**Tabela 3.** Indicadores bioquímicos de estado nutricional de zinco das nutrízes estudadas<sup>1</sup>.

Indicadores	Estágio da lactação		p <sup>2</sup>
	2 <sup>a</sup> a 4 <sup>a</sup> semana (n=15)	12 <sup>a</sup> a 14 <sup>a</sup> semana (n=15)	
Zinco plasmático (µmol/L)	10,9 ± 2,1	12,2 ± 2,0	0,1
Zinco urinário (µmol/mmol de creatinina urinária)	0,65 ± 0,35	0,79 ± 0,40	0,03
Zinco eritrocitário (µmol/g Hb)	1,09 ± 0,3	0,8 ± 0,3	0,02
Fragilidade osmótica de eritrócitos (%)	38,1 ± 12,9	36,1 ± 11,0	NS
Superóxido dismutase eritrocitária (SOD) (U/mg de eritrócito)	0,83 ± 0,24	0,65 ± 0,18	0,01
-ALAD eritrocitária (µmol/min/L de eritrócito)	32,6 ± 8,5	26,7 ± 6,2	0,002
Zn- -ALAD eritrocitária (%)	9,5 ± 2,0	13,1 ± 3,0	0,002

<sup>1</sup> Dados apresentados como média ± desvio padrão

<sup>2</sup> Significância de comparação entre os períodos lactacionais avaliados (teste-*t* pareado, n = 14; p<0,05); NS: não significativo.

A atividade da enzima fosfatase alcalina total (FAT) e de origem óssea (FAO), ao longo do estudo, está demonstrada na **Figura 6**, por serem indicadores bioquímicos tanto de estado nutricional de zinco como de *turnover* ósseo. Foi observado aumento significativo de 24% na FAT e 22% na FAO no 2º período de lactação,.



**Figura 7:** Atividade da fosfatase alcalina total e de origem óssea no plasma das nutrízes estudadas. ■ 2<sup>a</sup> a 4<sup>a</sup> semana de lactação; □ 12<sup>a</sup> a 14<sup>a</sup> semana de lactação  
\*Significância de comparação entre os estágios lactacionais (teste-*t* pareado,  $n = 14$ ;  $p < 0,05$ ).

Os indicadores de massa óssea das nutrízes do estudo estão apresentados na **Tabela 4**. A concentração plasmática média de cálcio plasmático no início da lactação encontrou-se abaixo da faixa de concentração estipulada (2,25 a 2,75 mM; Brody, 1994; Arnaud & Sanchez, 1996). Foi observado um aumento significativo na concentração plasmática média de cálcio (12%) das voluntárias do estudo, no 2<sup>o</sup> estágio lactacional comparado com o início do estudo. Os demais indicadores bioquímicos de massa óssea não modificaram significativamente ao longo do estudo, porém, observou-se tendência de aumento da concentração de fósforo no plasma e de redução na urina, após 10 semanas de lactação.

O grupo estudado apresentou, em média, escore-z considerado normal (z escore até -1,0) para todas as regiões avaliadas, nos dois estágios lactacionais. O Escore-Z é utilizado para classificar o grau de perda óssea do indivíduo (OMS, 1994), e de acordo com este, 35,7 % apresentaram osteopenia (z-escore -1,0 a -2,5) no início do estudo e 22% no 2<sup>o</sup> período de lactação, na região lombar (L1-L4). Todos os indicadores de DMO foram significativamente afetados pelo progresso da lactação, com redução em torno de 2% no 2<sup>o</sup> período lactacional estudado (tabela 4).

**Tabela 4.** Indicadores de massa óssea e turnover ósseo das nutrizes estudadas<sup>1</sup>

	Estágio da lactação		p <sup>2</sup>
	2 <sup>a</sup> a 4 <sup>a</sup> semana (n=15)	12 <sup>a</sup> a 14 <sup>a</sup> semana (n=14)	
<b>Indicadores Bioquímicos</b>			
Cálcio plasmático (μmol/L)	1,96 ± 0,25	2,2 ± 0,14	0,003
Cálcio urinário (mmol/mmol de creatinina)	98,8 ± 62,7	106,7 ± 82,8	NS
Fósforo plasmático (μmol/L)	3,39 ± 0,60	3,69 ± 0,63	0,1
Fósforo urinário (mmol/mmol de creatinina)	1,4 ± 0,63	1,08 ± 0,25	0,1
<b>Densidade Mineral Óssea (DMO)</b>			
DMO esqueleto total (g/cm <sup>3</sup> )	1,110 ± 0,11	1,100 ± 0,11	0,001
DMO total	-0,011 ± 0,00		
Escore-z total	-0,03 ± 0,9	-0,06 ± 1,0	0,002
DMO Lombar (L1-L4) (g/cm <sup>3</sup> )	1,152 ± 0,18	1,140 ± 0,17	0,02
DMO (L1-L4)	0,028 ± 0,03		
Escore-z L1-L4	-0,02 ± 1,0	-0,26 ± 1,0	0,03
DMO fêmur (g/cm <sup>3</sup> )	0,998 ± 0,09	0,977 ± 0,11	0,01
DMO fêmur	-0,021 ± 0,02		
Escore-z fêmur	-0,27 ± 0,8	-0,4 ± 0,9	0,02

<sup>1</sup>Dados apresentados como média ± desvio padrão; DMO, densidade mineral óssea; ΔDMO, variação da densidade mineral óssea

<sup>2</sup>Significância de comparação entre os períodos lactacionais avaliados (teste-t pareado, p<0,05); NS: não significativo.

### 5.3. ASSOCIAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS ESTUDADAS

A **Tabela 5** apresenta as correlações significativas entre as variáveis investigadas durante o estudo. A correlação negativa entre a atividade da -ALAD e o seu % de reativação *in vitro* com zinco, e as correlações positivas entre o % reativação da -ALAD *in vitro* com zinco com a FAT e com a FAO plasmáticas, foram consistentemente observadas nos dois estágios lactacionais avaliados. Além destas,

foram encontradas, apenas no início do estudo, as seguintes associações negativas: entre a atividade da  $\gamma$ -ALAD reativada com zinco e concentração de albumina no soro; entre a densidade mineral óssea (L1-L4) e a concentração de fósforo plasmático; e entre a concentração de cálcio no plasma e a densidade mineral óssea do esqueleto total. Correlações negativas da atividade da SOD com a concentração urinária de zinco, da concentração de zinco no plasma com a atividade da  $\gamma$ -ALAD e com a FOE, foram observadas somente no segundo estágio lactacional estudado.

**Tabela 5.** Associações entre os indicadores bioquímicos e de massa óssea das nutrízes em cada estágio lactacional investigado. <sup>1</sup>

Variáveis correlacionadas	Estágio da lactação			
	2 <sup>a</sup> a 4 <sup>a</sup> semana (n=15)		12 <sup>a</sup> a 14 <sup>a</sup> semana (n=14)	
	r	p	r	p
$\gamma$ -ALAD X % reativação da $\gamma$ -ALAD <i>in vitro</i> com zinco	-0,6246	0,01	-0,6227	0,01
% reativação da $\gamma$ -ALAD <i>in vitro</i> com zinco X Fosfatase alcalina total no plasma	0,4809	0,06	0,5985	0,02
% reativação da $\gamma$ -ALAD <i>in vitro</i> com zinco X Fosfatase alcalina de origem óssea	0,5754	0,02	0,5731	0,03
Zn-ALAD X albumina no soro	-0,5061	0,05	-----	-----
DMO (L1-L4) X Fósforo plasmático	-0,5735	0,02	-----	-----
Cálcio plasmático X DMO (total)	-0,5422	0,03	-----	-----
SOD X zinco urinário	-----	-----	-0,5222	0,05
Zinco plasmático X $\gamma$ -ALAD	-----	-----	-0,4656	0,09
Zinco plasmático X FOE	-----	-----	-0,5719	0,03

<sup>1</sup>r = coeficiente de correlação; p, nível de significância; Correlação de Pearson, valores significativos ( $p < 0,05$ ) e tendência de significância ( $0,05 < p < 0,10$ ).

## **6. DISCUSSÃO**

## 6.1 CARACTERÍSTICAS DAS VOLUNTÁRIAS NO INÍCIO DA LACTAÇÃO

A lactação é um período de elevada demanda de nutrientes, necessária para satisfazer a sua transferência para o leite e as necessidades nutricionais maternas (OMS, 1997), e também de perda óssea característica (Masters, 1986; Bezerra *et al*, 2002; Bezerra *et al*, 2007). Portanto, para uma adequada investigação do estado nutricional de zinco e da massa óssea durante este período, é importante minimizar os fatores adicionais à lactação que modificam a necessidade e o metabolismo de zinco, assim como o metabolismo ósseo.

No presente estudo, o grupo estudado era composto em sua totalidade por nutrizes adultas, e sabe-se que, desde que satisfeitas as necessidades nutricionais, o metabolismo de nutrientes e do tecido ósseo no organismo adulto ocorre apenas para a manutenção do funcionamento celular normal e da massa óssea pré-existente (Bezerra *et al*, 2007; Donangelo *et al*, 2005).

Da mesma forma, todas as voluntárias eram não usuárias de anticoncepcional hormonal (ACH), conhecido por alterar as concentrações de zinco circulante (Kamp *et al*, 2011), e amamentavam exclusivamente seus lactentes ao seio, ao início do estudo. Sabe-se que as necessidades de zinco durante a lactação são mais elevadas no primeiro semestre. A medida de que o lactente diminui o número de mamadas, a necessidade materna de zinco diminui (IOM, 2001).

Em relação às características gerais de estado nutricional, a maioria das voluntárias avaliadas iniciou o estudo com diagnóstico de sobrepeso (WHO, 2010), de anemia (WHO, 2003) e com baixas concentrações de albumina sérica (Allock, 1999). Tais características podem ainda ter tido influência da gestação e/ou do parto, visto que o estudo iniciou-se em um período muito próximo ao pós-parto (2<sup>a</sup> a 4<sup>a</sup> semana pós-parto).

O diagnóstico de sobrepeso observado no grupo estudado é consistente com a literatura (Janney *et al*, 1997; Kac, 2001; Rea, 2004). A retenção de peso pode ser atribuída ao excesso de líquido retido durante a gestação, que leva em média seis semanas após o parto para o seu reestabelecimento, assim como ao percentual de gordura e à quantidade de tecido mamário que estão aumentados como forma de garantir reserva energética para a lactação (IOM, 2009). Embora, em média, o IMC não

tenha modificado, a perda de peso observada na maioria das voluntárias após 10 semanas de

lactação (em média  $2,2 \pm 0,8$  Kg), sugere que o diagnóstico de sobrepeso no início do estudo, possa ainda ser um reflexo da gestação.

Da mesma forma, a elevada frequência de anemia observada no grupo estudado é consistente com a estimativa de que cerca de 60% das mulheres apresentam este diagnóstico na gestação e lactação (IOM, 2001; Rodrigues, 2010). Dentre as causas mais comuns de anemia na gestação e no pós-parto estão, a deficiência de ferro e as perdas sanguíneas agudas (Rodrigues, 2010). Como todas as voluntárias do estudo relataram o uso de suplementos de ferro durante a gestação e a concentração média de hemoglobina aumentou significativamente após 10 semanas de lactação, acredita-se que o diagnóstico de anemia no início do estudo possa estar relacionado às elevadas perdas sanguíneas no período puerperal imediato (até o 10º dia pós-parto) (Rodrigues, 2010). Estas, em condições normais, diminuem gradativamente à medida que a contratilidade e involução uterina se estabelecem, bem como a cicatrização de tecidos que participam do canal de parto (Rodrigues, 2010).

A concentração média de albumina sérica das nutrizes estudadas é consistente com outros estudos realizados com nutrizes adultas (Krebs, 1995; Bezerra, 2002) e indica adequação no estado nutricional de proteína (Umeta, 2000). Entretanto, no presente estudo observou-se uma elevada frequência de subadequação deste indicador, principalmente no início do estudo. Isto pode ser reflexo de alterações no controle hormonal da síntese hepática de proteínas plasmáticas decorrentes da lactação (Picciano, 1996). No entanto, sendo a albumina o principal carreador de zinco na circulação (Choi *et al*, 1999; King *et al.*, 2000), a redução de sua concentração poderia prejudicar a utilização celular do mineral. No início desse estudo foi observada uma correlação negativa entre a albumina sérica e a atividade da  $\gamma$ -ALAD reativada *in vitro* com zinco, consistente com esta hipótese. Sendo a  $\gamma$ -ALAD uma enzima sulfidril dependente e a manutenção dos grupos sulfidrila no estado reduzido dependente do teor de zinco na proteína (Xia *et al*, 1999; O'Dell, 2000), a maior necessidade de zinco adicional para a atividade da enzima naquelas voluntárias com menores concentrações de albumina sérica, sugere um prejuízo na utilização celular de zinco.

Embora alguns fatores determinantes do metabolismo de zinco e da massa óssea tenham sido controlados no presente estudo, as recomendações nutricionais de zinco (IOM, 2001) e de cálcio (IOM, 2010) não foram alcançadas através da ingestão

habitual, e as de fósforo e proteínas (IOM, 1997; IOM, 2002) foram excedidas, o que podem ter contribuído para alguns achados.

A elevada frequência de subadequação de ingestão de zinco e de cálcio pelas voluntárias avaliadas foi também observada em estudos anteriores em nutrizes adultas brasileiras (Pires *et al*, 2002; Bezerra, 2002; Bezerra *et al.*, 2007; Donangelo *et al*, 2005; Scheplyagina, 2005). Sabe-se que o estado nutricional de zinco materno e a manutenção da sua homeostase, estão diretamente relacionados com a ingestão do mineral (Sian *et al*, 2001). Desta forma, a subadequação de ingestão de zinco observada no presente trabalho poderia contribuir para alterações no metabolismo de zinco, visando a transferência do mineral para o leite materno (Donangelo *et al*; 2005) em detrimento da manutenção de sua homeostase no organismo materno, favorecendo assim, a sua deficiência (Scheplyagina, 2005). Tem sido sugerido que, mesmo quando a ingestão de zinco encontra-se adequada, as necessidades de zinco aumentadas no início da lactação podem ser parcialmente supridas mobilizando *pools* de zinco materno, como sangue e tecido ósseo (Donangelo e King, 2012).

Desta forma, a baixa ingestão dietética de cálcio e de zinco observada no presente estudo poderia também comprometer a massa óssea das nutrizes estudadas. Como o tecido ósseo é um importante reservatório de cálcio e de zinco no organismo (Anderson, 1991; Bezerra *et al*, 2002), quando a recomendação de ingestão desses minerais não é alcançada, estes são liberados do osso para satisfazer as necessidades orgânicas (Weitssaub *et al*, 2001; Donangelo e King 2012). Na lactação, o metabolismo desses minerais está voltado, principalmente, para a lactogênese, além de satisfazer as necessidades maternas (Beshgetoor *et al*, 1997), tornando a perda óssea inevitável (Bezerra *et al*; 2002; Bezerra *et al*, 2007). Além disso, foi observado em camundongos, que a mobilização de zinco ósseo durante a amamentação é estimulada pela baixa ingestão de cálcio (Weisstaub, 2001), o que poderia exacerbar a perda óssea, devido ao papel funcional do zinco no tecido ósseo (Yamaguchi *et al*, 2010; Yamaguchi *et al*, 2008; Bouglé *et al*, 2004). Embora a relação da baixa ingestão de zinco com a perda óssea durante a lactação seja pobremente investigada, esta tem sido sugerida por alguns autores (Bouglé *et al*, 2004; Weisstaub, 2001) e já estabelecida em mulheres na pós-menopausa (Ueland, 2004; Yamaguchi *et al*, 2010). Portanto, a baixa ingestão de cálcio e zinco no presente estudo, além de comprometer o estado nutricional de zinco, poderia acentuar ainda mais a perda óssea nas nutrizes avaliadas.



A elevada ingestão habitual de fósforo e de proteínas observadas nas voluntárias desse estudo poderia comprometer o metabolismo ósseo. Este comprometimento estaria relacionado a um prejuízo na utilização de cálcio pelo organismo materno, tanto por diminuir a sua absorção intestinal, secundário à elevada ingestão de fósforo, como por aumentar a sua excreção urinária, devido à dieta hiperproteica. Sabe-se que quando a relação Ca:P na dieta é baixa, como observado no nosso estudo, a absorção intestinal de cálcio é reduzida e a capacidade de manutenção da massa óssea podem ser prejudicadas (Anderson, 1991). A elevada concentração de fosfato sérico estimula a secreção do hormônio paratireóideo (PTH), que por consequência, leva a redução da massa óssea devido a mobilização de cálcio ósseo para o sangue (Calvo *et al*; 1990). Para evitar o prejuízo na absorção de cálcio, recomenda-se que a razão Ca:P na dieta seja de 1:1 (Lobo, 2004), porém, em nosso estudo esta foi de 0,69, sugerindo ineficiência na absorção de cálcio.

Sabe-se que a ingestão proteica pode influenciar a excreção urinária e o balanço de cálcio, aumentando a taxa de filtração glomerular do mineral e diminuindo a reabsorção renal (Benabe & Martinez-Maldonado, 1991) por mecanismos mediados pelo aumento da carga ácida renal sob a forma de sulfatos e fosfatos (Barzel & Massey, 1998). Assim, a ingestão elevada de proteína no presente trabalho poderia diminuir a retenção de cálcio no organismo das nutrízes, comprometendo a utilização do mineral pelo organismo da nutriz. Portanto, a elevada ingestão de fósforo e de proteínas associada à baixa absorção de cálcio e de zinco pode trazer consequências negativas para a saúde óssea das nutrízes avaliadas.

## **6.2. EFEITO DO ESTÁGIO LACTACIONAL SOBRE O ESTADO NUTRICIONAL DE ZINCO E A MASSA ÓSSEA DAS NUTRIZES ADULTAS AVALIADAS**

A deficiência de zinco durante a lactação pode trazer consequências negativas para a saúde materna, como prejuízos à saúde óssea, ao sistema imunológico e ao estado antioxidante da mãe (McCall *et al*, 2000; Szckurek, 2001; Silva 2007). Tem-se notado um grande esforço da comunidade científica para avaliar o efeito da lactação sobre o estado de zinco da nutriz (Krebs, 1985; Krebs *et al*, 1995; Fung *et al*, 1997; Donangelo *et al*, 2005). Entretanto, este efeito, assim como a caracterização do estado de zinco de lactantes, não está totalmente claro, pois a maioria dos estudos utiliza apenas a concentração do mineral no soro/plasma para a avaliação do seu balanço no organismo

(Wood *et al*, 2000; OMS, 2003).

Para uma adequada avaliação do estado nutricional de zinco, recomenda-se associar a sua concentração no soro/plasma a diferentes indicadores bioquímicos funcionais do mineral (Wood *et al*; 2000), conforme realizado no presente estudo. Portanto, o estado nutricional de zinco foi avaliado através da determinação de sua concentração em diferentes *pools* de zinco (plasma, eritrócitos e urina), além da avaliação de indicadores funcionais de zinco em plasma e eritrócitos.

As nutrizes correspondem ao segmento populacional de maior risco de desenvolvimento de deficiência de zinco. Isto porque a amamentação exclusiva por seis meses impõe uma necessidade adicional de zinco de aproximadamente 227mg, mais do que o dobro da quantidade requerida durante a gestação (IOM, 2001). Esta elevada demanda de zinco durante a lactação pode ser alcançada através do aumento da ingestão dietética e/ou de ajustes homeostáticos maternos (Krebs, 1998; IOM, 2001; Donangelo e King, 2012). Como a baixa ingestão de zinco é frequentemente observada durante a lactação, assim como o foi no presente estudo, a transferência de zinco para o leite e a manutenção da homeostase materna dependeriam, principalmente, dos ajustes no metabolismo do mineral. Neste sentido, tem sido demonstrado, através de estudos de cinética e em ratos (Davies *et al*, 1977; Moser-Veilon *et al*, 1995; Krebs *et al*, 1998), que durante a lactação ocorre aumento na eficiência de absorção intestinal de zinco, redução da perda intestinal e renal do mineral, além da mobilização e redistribuição dos *pools* de zinco corporais (Krebs, 1998; Davies *et al*, 1977; Moser-Veilon *et al*, 1995; IOM, 2001; Donangelo e King, 2012).

Dentre os indicadores bioquímicos de estado de zinco avaliados neste trabalho, o zinco plasmático é único que possui valor de referência para a população estudada (Hotz *et al*, 2003). Portanto, a baixa concentração média de zinco no plasma das voluntárias, no início do estudo, indica que as mesmas apresentaram estado marginal de zinco (Hotz *et al*, 2003). No 2º período de lactação, a concentração média de zinco no plasma neste estudo foi considerada adequada (Gibson, 1990; Hotz, 2003) Resultados semelhantes ao nosso foram também encontrados em outros estudos com nutrizes avaliadas entre a 7 e 8ª semana de lactação (Donangelo *et al*, 2005) e 15 dias após o parto (Krebs *et al*, 1995; Khosravi, 2006). Tem sido descrito que a elevada demanda de zinco no organismo da nutriz, impõe um significativo estresse nos mecanismos fisiológicos para a manutenção da homeostase do mineral, principalmente nas primeiras semanas de lactação (Donangelo e King, 2012). No início da lactação, a secreção de

zinco no leite é maior e, diminui com o progresso da amamentação (Krebs, 1998; Donangelo e King, 2012). Portanto, este fato associado à baixa ingestão relatada pelas voluntárias do presente estudo pode ter contribuído para o estado marginal de zinco apresentado. Além disso, tem sido sugerido que a suplementação com ferro e o uso de medicamentos pode prejudicar o estado nutricional de zinco (Bloxam *et al*, 1989; Dawson *et al*, 1989; O'Brien *et al*, 1999; Wood, 2000; Dibley, 2001; Hambidge, 2003b). Isto é relevante, visto que todas as voluntárias deste estudo usaram suplementos de ferro (da 20<sup>a</sup> semana de gestação à 1<sup>a</sup> semana pós-parto) e, anti-inflamatório não esteroide e antibióticos na 1<sup>a</sup> semana pós parto, o que pode também ter contribuído para a elevada frequência de subadequação do zinco plasmático no primeiro estágio lactacional investigado.

Apesar de diversos estudos avaliarem a excreção urinária de zinco durante a lactação (Fung *et al*, 1997; Donangelo *et al*, 2005; Krebs, 1999, Moser-Veillon, 1995), os dados ainda são conflitantes, sugerindo que o papel da função renal na homeostase de zinco durante a gravidez e a lactação precisa ser melhor investigado (Donangelo *et al*, 2005). A excreção urinária de zinco no início desse estudo foi maior do que a relatada em outros estudos em nutrízes no primeiro mês de lactação (Krebs *et al*, 1995; Donangelo, *et al*, 2005). No presente estudo, o aumento na excreção urinária de zinco após 10 semanas de lactação indica baixa conservação renal do mineral, o que poderia também contribuir para prejudicar o estado de zinco das nutrízes. Este resultado é consistente com o estudo de Klein *et al* (1995), que observou em nutrízes adultas em 6 meses de lactação que a conservação renal de zinco durante esta fase é relativamente baixa.

O zinco eritrocitário é considerado um dos indicadores mais apropriados para avaliar o estado de zinco no organismo, já que, devido à meia-vida longa dessas células (120 dias), reflete alterações, em médio e longo prazos, nos estoques de zinco no organismo. Entretanto, são escassos os estudos que o utilizaram para avaliar o estado de zinco em nutrízes (Santos; Sardinha; Colli, 2005; Wood *et al*, 2000). No presente trabalho, a concentração média de zinco eritrocitário foi semelhante às observadas por Donangelo *et al* (2005), em nutrízes adultas na 7<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semana de lactação, e por Maia *et al* (2007) em nutrízes adolescentes no 3<sup>o</sup> mês de lactação.

Da mesma forma, poucos estudos utilizam a atividade da enzima  $\delta$ -ALAD como indicador do estado de zinco durante a lactação (Krebs *et al*, 1995; Pires *et al*, 2002). A  $\delta$ -ALAD é considerada um indicador funcional de estado de zinco, por ser uma enzima

zinco-sulfidrila dependente, com o zinco essencial para a estabilidade dos grupamentos tióis da enzima e, conseqüentemente, para a manutenção de sua atividade (O'Dell, 2000). Segundo os valores de referência da atividade da  $\delta$ -ALAD para população adulta não exposta ao chumbo (37,6 a 74,4  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L}$  de eritrócito; Siqueira *et al*, 2003), em média, a atividade da enzima observada no presente estudo foi baixa. No entanto, nossos resultados foram semelhantes aos encontrados por Pires *et al* (2002) e por Krebs *et al* (1995), com lactantes adultas, avaliadas entre a 7<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semana pós-parto e 15 dias após o parto, respectivamente. Essa baixa atividade da enzima pode estar associada à elevada taxa de eritropoiese observada neste período, já que a  $\delta$ -ALAD participa da síntese do grupamento heme da hemoglobina (Siqueira *et al*, 1999; Siqueira *et al*, 2003).

A enzima SOD possui em seu centro ativo um íon  $\text{Cu}^{2+}$ , atuando como cofator, e um íon  $\text{Zn}^{2+}$ , como componente estrutural, estabilizando sua estrutura terciária da proteína (Powell, 2000). Devido ao papel estrutural do zinco, diferentes estudos têm utilizado a SOD como indicador funcional do mineral (Hambidge, 2003; Lowe; Fekete; Decsi, 2009; Kamp *et al.*, 2011, entretanto, na lactação os dados são escassos. A atividade média da SOD observada no nosso estudo é consistente com o estudo de Maia *et al* (2007), que avaliou nutrizes adolescentes no 3<sup>o</sup> mês de lactação.

Sabe-se que a estabilidade das membranas de eritrócitos está diretamente associada ao seu conteúdo de zinco (O'Dell, 2002). Vale destacar que não há relatos na literatura sobre a avaliação da fragilidade osmótica de eritrócitos (FOE) em nutrizes adultas. Desta forma, a FOE foi usada em nosso estudo como indicador bioquímico funcional de zinco, como realizado em estudos anteriores com mulheres não lactantes (Kamp e Donangelo, 2008; Koury, 2003). Entretanto, é importante ressaltar que a FOE é muito variável, podendo ser alterada por inúmeros outros fatores (Powell, 2000)

Diferentes estudos têm usado a atividade da fosfatase alcalina plasmática como indicador de estado de zinco (Fairweather-Tait, 1988; Prasad, 1991; Kamp *et al*, 2011), já que a enzima possui dois íons de  $\text{Zn}^{2+}$  no seu centro ativo e sua atividade é alcançada quando todos os sítios ligantes de zinco encontram-se preenchidos (McCall *et al*, 2000). Entretanto, os estudos que utilizam a atividade da fosfatase alcalina na lactação, o fazem com uma abordagem diferente, ou seja, a utilizam como indicador de *turnover* ósseo. Em nosso estudo, a atividade da FAT e da FAO foram semelhantes às observadas em outros estudos com nutrizes adultas no primeiro mês de lactação (Krebs *et al*, 1995; Bezerra *et al*, 2002).

Ao avaliarmos o efeito do estágio lactacional sobre os indicadores bioquímicos de zinco, observamos que no 2º período de lactação houve: tendência de aumento no zinco plasmático; redução significativa da concentração de zinco em eritrócito e na atividade das enzimas eritrocitárias, -ALAD e SOD; e aumento significativo na excreção urinária de zinco, no percentual de reativação da -ALAD *in vitro* com zinco e na atividade da fosfatase alcalina total e de origem óssea.

A concentração plasmática média de zinco no 2º período de lactação sugere que o grupo estudado teve seu estado de zinco normalizado. Tem sido descrito que as concentrações de zinco no plasma materno retornam aos níveis pré-gravídicos nas primeiras semanas pós-parto (Moser-Veillon, 1995; Fung *et al*, 1997; Krebs, 1999; Donangelo *et al*, 2005). Portanto, a tendência de aumento na concentração média de zinco plasmático das nutrízes, no segundo estágio lactacional investigado, é consistente com a literatura e pode ser atribuída à redução progressiva da secreção do mineral no leite durante a lactação (Krebs, 1998; Donangelo e King, 2012).

Por outro lado, a redução significativa do teor de zinco eritrocitário observada após 10 semanas de lactação, tempo inferior ao necessário para o *turnover* de eritrócitos, indica depleção de zinco dessas células. Não há relatos na literatura do efeito da lactação sobre este indicador, mas esta redução, associada à baixa ingestão de zinco, sugere prejuízo ao estado de zinco com o progresso da lactação. Consistentemente, a redução na atividade da -ALAD eritrocitária e o aumento do seu percentual de reativação *in vitro* com zinco observados, também sugerem diminuição da concentração de zinco disponível no meio celular para manter a atividade da enzima. Estes resultados associados às correlações negativas observadas entre esses dois indicadores nos dois estágios lactacionais investigados, corroboram ainda a utilidade da atividade da -ALAD como indicador funcional de zinco, conforme previamente já sugerido (Kamp *et al*, 2011). A redução observada na atividade da SOD no 2º estágio lactacional também é consistente com a redução da disponibilidade intracelular de zinco para manter a atividade da enzima. A correlação negativa entre a atividade da SOD e a excreção urinária de zinco, observada apenas no 2º estágio lactacional, também sugere prejuízo no estado de zinco com o progresso da lactação. Entretanto, é importante ressaltar que a SOD tem sido usada como indicador de estado antioxidante, devido ao seu papel na redução de íons superóxidos a peróxido de hidrogênio (Powell, 2000). Da mesma forma, a atividade da -ALAD tem sido utilizada como indicador de estado antioxidante (Kamp e Donangelo, 2008), uma vez que esta é dependente de grupamentos tióis em

estado reduzido (Thomas, 1999). Portanto, a redução da atividade da SOD e da -ALAD observadas no presente estudo, pode também sugerir um prejuízo ao estado antioxidante com o progresso da lactação.

Vale destacar que o zinco urinário além de ser um indicador bioquímico do estado nutricional de zinco, pode refletir alterações no metabolismo ósseo já que níveis elevados têm sido associados à perda de massa óssea em mulheres pós-menopausa (Herzberg *et al*, 1996). Embora a perda de massa óssea tenha sido observada em nosso estudo, não foi encontrada correlação entre indicadores de massa óssea e zinco urinário.

Conforme mencionado acima, a atividade da fosfatase alcalina tem sido usada, principalmente, como indicador de *turnover ósseo* em estudos com nutrízes. A atividade da fosfatase alcalina total no plasma como indicador de síntese e mineralização óssea tem sido aplicada geralmente, em condições em que ocorrem grandes aumentos de *turnover ósseo*, como a doença de Paget (Robins & New, 1997). No entanto, em caso de mudanças sutis no metabolismo ósseo, como ocorre na lactação, a determinação da atividade total desta enzima é menos útil e por isso a sua isoforma óssea merece maior atenção quando se avalia metabolismo ósseo (Bezerra, 2002). O aumento significativo na atividade da FAT e FAO, observado no 2º estágio lactacional investigado, é consistente com literatura (Kalkwarf *et al*, 1997; Prentice *et al*, 1998; Cross, 1995; Sowers, 1998; Bezerra, 2002) e indica elevada taxa de *turnover ósseo*, característica da lactação

No presente estudo, observamos consistentemente, nos dois estágios lactacionais, correlações positivas entre o percentual de reativação da -ALAD *in vitro* com zinco e atividade da FAT plasmática, corroborando a sua utilização da FAT como indicador funcional de zinco..

Portanto, as respostas dos indicadores eritrocitários de zinco e da excreção urinária de zinco no 2º período de lactação, sugerem que o estado nutricional de zinco foi prejudicado durante a lactação. Entretanto, quando avaliados em conjunto, os resultados dos indicadores bioquímicos de zinco podem também ser secundários a desvios do mineral de seus diferentes *pools* no organismo, conforme sugerido previamente (Krebs, 1998; IOM, 2001; Donangelo e King, 2012). Corroborando esta hipótese, no presente estudo foi observado que o zinco plasmático se correlacionou negativamente com a -ALAD e com a fragilidade osmótica de eritrócitos (FOE), somente após no 2º período de lactação. Sendo a -ALAD uma enzima eritrocitária

zinco dependente, assim como a estabilidade de membranas de eritrócitos o é, estes resultados sugerem que a tendência de aumento na concentração plasmática de zinco possa ter sido devido ao desvio do zinco do eritrócito para o plasma, indicando redução da concentração de zinco disponível no meio celular para manter a atividade da enzima. Da mesma forma, as correlações positivas entre o percentual de reativação da  $\delta$ -ALAD *in vitro* com zinco e atividade da FAT plasmática também sugerem que o aumento significativo da FAT tenha sido às custas do desvio do zinco eritrocitário para o plasma.

Indicadores bioquímicos séricos e/ou plasmáticos e urinários, de formação e degradação óssea têm sido utilizados em muitos estudos na lactação para avaliar, mesmo que de forma indireta, o *turnover* ósseo (Kent *et al*, 1990, Sowers, 1995; Donangelo, 1996, Bezerra, 2002; Bezerra, 2007).

Sabe-se que o Escore-Z é utilizado para classificar o grau de perda óssea do indivíduo (OMS, 1994). Apesar das nossas voluntárias terem apresentado perda óssea considerada normal, vale ressaltar que o diagnóstico de osteopenia foi apresentado por algumas nutrizes. Nossos resultados são consistentes com a literatura, visto que durante a lactação o *turnover* ósseo está elevado como forma de manter a homeostase de cálcio materna (Bezerra *et al*, 2002; Bezerra e Donangelo, 2007). No segundo estágio da lactação, o número de voluntárias com osteopenia reduziu, porém 22% ainda a apresentavam. Nossos resultados foram semelhantes ao estudo de Bezerra *et al* (2002) em nutrizes adultas não suplementadas e com baixa ingestão de cálcio (Ritchie *et al*, 1998; Krebs *et al*, 1997; Kalkwarf *et al*, 1997; Affinito *et al*, 1996; Laskey *et al*, 1998). A perda óssea nos seis primeiros meses da lactação tem sido documentada com uma perda estimada de 4 a 6% (Cross *et al*, 1995; Ritchie *et al*, 1998; Vargas-Zapata *et al*, 2004). A redução significativa da densidade mineral óssea (2 %) em todas as regiões avaliadas no 2º período de lactação corroboram o que vem sendo descrito na literatura, que na lactação há redução da densidade mineral óssea como forma de garantir a homeostase de cálcio materna (Donangelo, 1996, Bezerra, 2002; Bezerra, 2004).

Sabe-se que a homeostase de cálcio durante a lactação é regulada por diversos mecanismos, dentre eles, a diminuição da excreção renal de cálcio, manutenção da absorção intestinal de cálcio, aumento do *turnover* ósseo e ação de vários hormônios séricos, dentre eles o paratormônio (PTH), que age sobre o tecido ósseo e nos rins para aumentar a concentração sanguínea de cálcio (Cross *et al*, 1995; Ritchie *et al*, 1998; Vargas-Zapata *et al*, 2004; Naylor *et al*, 2000; Bezerra *et al*, 2002; Krebs *et al*, 1997; Prentice *et al*, 1998; Bezerra e Donangelo, 2007).

A concentração de cálcio encontra-se inalterada ou ligeiramente elevados durante a lactação (Specker *et al*, 1991; Gril *et al*, 1992; Bezerra *et al*, 2002; Bezerra e Donangelo, 2007). Nossas voluntárias apresentaram estado marginal de cálcio no plasma, segundo faixa de normalidade (2,25 a 2,75 mM; Brody, 1994; Arnaud & Sanchez, 1996) no início da lactação. Após 10 semanas de lactação, os níveis de cálcio plasmático aumentaram significativamente, se mantendo dentro da faixa de normalidade, indicando que independente da ingestão de cálcio na dieta, o aumento do *turnover* ósseo parece ser o principal mecanismo para atender a demanda de cálcio na lactação (King, 1992; Bezerra *et al*, 2004; Bezerra *et al*, 2004; Bezerra e Donangelo, 2007). Estes resultados sugerem que nesta fase há elevação da reabsorção óssea, e desvio de cálcio e de outros minerais, como o zinco, do tecido ósseo. Além disso, a correlação negativa observada entre a DMO (L1-L4) com a concentração de fósforo plasmático e a DMO total com a concentração plasmática de cálcio, corrobora tal hipótese levantada;

Avaliando nossos resultados em conjunto, os indicadores bioquímicos funcionais de zinco e de massa óssea sugerem uma redistribuição nos *pools* de zinco, à custa de enzimas eritrocitárias, em sentido favorável para minimizar a perda óssea característica deste período como um possível mecanismo do organismo da nutriz atender a elevada taxa de *turnover* ósseo da lactação. Entretanto, não observamos nenhuma correlação significativa entre os indicadores de massa óssea e os de estado de zinco que confirmasse a nossa hipótese de que a massa óssea materna estaria relacionada ao estado nutricional de zinco.



## **7. CONCLUSÃO**

- As nutrizes investigadas iniciaram o estudo com indicadores bioquímicos de estado nutricional de zinco e de massa óssea, assim como ingestão habitual de zinco e cálcio considerados subadequados e foram consistentes com a literatura. A densidade mineral óssea indicou que a perda óssea relativa ao período de lactação avaliado foi considerada de pequena magnitude.
- A lactação afetou o metabolismo de zinco e ósseo das nutrizes, e parece ter levado a uma redistribuição nos *pools* de zinco, à custa de enzimas eritrocitárias. A redução na atividade das enzimas eritrocitárias e o aumento na atividade de enzimas do plasma são consistentes com a hipótese levantada.
- No sentido de manter a homeostase de cálcio materna durante a lactação, observou-se a redução da massa óssea das nutrizes no 2º período de lactação. Esses resultados são consistentes com a elevada taxa de *turnover* ósseo descrita na literatura durante esta fase.
- Não foi observada relação entre o estado nutricional de zinco com a massa óssea. Mais estudos são necessários para uma melhor investigação.
- O presente trabalho demonstrou pela primeira vez a avaliação conjunta do estado nutricional de zinco por diferentes indicadores bioquímicos funcionais, associados a sua concentração no plasma, urina e eritrócitos. Isto permitiu uma melhor compreensão do metabolismo de zinco durante a lactação e uma avaliação global e adequada do estado nutricional de zinco destas nutrizes.

## **8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ✓ Affinito, Pietro et al. Changes in bone mineral density and calcium metabolism in breastfeeding women: a one year follow-up study. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 81, n. 6, p. 2314-2318, 1996.
- ✓ Allen, L.H. Multiple micronutrients in pregnancy and lactation: an overview. **The American journal of clinical nutrition**, 81(suppl): 1206S–12S, 2005.
- ✓ Allock, N.W. Laboratory tests for assessing nutritional status. In: *Modern Nutrition in Health and Disease* (Shills, M.E., Olson, J.A., Shike, M. & Ross, A.C., eds) pp.923-935. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1999.
- ✓ Anandarajah, Allen P. Role of RANKL in bone diseases. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 20, n. 2, p. 88-94, 2009.
- ✓ Anderson, John JB. Nutritional biochemistry of calcium and phosphorus. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 2, n. 6, p. 300-307, 1991.
- ✓ Arnaud, CD, Sanchez, SD. Calcium and phosphorus. In: *Present knowledge in nutrition*. 7th edn. Washington, DC: **Nutrition Foundation** : p 245-255, 1996.
- ✓ Barzel, Uriel S.; Massey, Linda K. Excess dietary protein can adversely affect bone. **The Journal of nutrition**, v. 128, n. 6, p. 1051-1053, 1998.
- ✓ Benabe, J. E. et al. Renal effects of dietary protein excess and deprivation. In: **Seminars in nephrology**. p. 76. 1991
- ✓ Beshgetoor, D.; Lönnerdal, B. Identification of an 2-macroglobulin receptor in human mammary epithelial cells. **The Journal of nutrition**., 129, 152–157. 1999.
- ✓ Birch EE, et al. A randomized controlled trial of early dietary supply of long-chain polyunsaturated fatty acids and mental development in term infants after weaning at 6 weeks of age, **The American journal of clinical nutrition**, 75:570, 2002.

- ✓ Beshgetoor, Donna; Lönnerdal, Bo. Effect of marginal maternal zinc deficiency in rats on mammary gland zinc metabolism. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 8, n. 10, p. 573-578, 1997.
  
- ✓ Bezerra, F.F.; Laboissiere, F.P.; King, J.C; Donangelo, C.M.. Pregnancy and lactation affect markers of calcium and bone metabolism differently in adolescent and adult women with low calcium intakes. **The Journal of nutrition** 132: 2183 - 2187, 2002.
  
- ✓ Bezerra, F. F., Donangelo, C.M. Calcium homeostasis and bone mass during pregnancy and in adult and adolescent women. **Perinatol.Reprod.Hum.**, 21: 201-208, 2007.
  
- ✓ Bouglé, Dominique L. et al. Zinc status and bone mineralisation in adolescent girls. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 18, n. 1, p. 17-21, 2004.
  
- ✓ Boyle, william j.; Simonet, w. scott; Lacey, David L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 337-342, 2003.
  
- ✓ Bloxan, D.L.; Williams, N.R., Waskett, R.J.D., Pattinson-Green, P.M., Moraji, Y. e **Stewart, S.G.** Maternal zinc during iron supplementation in pregnancy. A preliminary study. **Clin. Sci.** 76: 59-65, 1989. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Manual operacional do Programa Nacional de Suplementação de Ferro / **Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde**, Departamento de Atenção Básica. - Brasília : Ministério da Saúde, 2005.
  
  
- ✓ Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Saúde da criança: nutrição infantil: aleitamento materno e alimentação complementar / **Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica.** – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2009. 112 p. : il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Cadernos de Atenção Básica, n. 23)
  
  
- ✓ Brody, T. Inorganic Nutrients. In: **Nutritional Biochemistry**, Chapter 9, pp. 485-623. Edited by Brody, T – **Academic Press**, San Diego, California, 1994.
  
  
- ✓ Brody, T. Zinc and Copper. In: **Nutritional Biochemistry**. 581-592. 1995.
  
  
- ✓ Butte, N. F.; King, J. C. Energy requirements during pregnancy and lactation. **Public Health Nutr.**, v. 8, n. 7A, p. 1010-1027, Oct 2005.

- ✓ Calvo, MS.; Kumar, R; Heath, H. Persistently elevated parathyroid hormone secretion and action in young women after four weeks of ingesting high phosphorus, low calcium diets. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 70, n. 5, p. 1334-1340, 1990.
- ✓ Carvalho, Renato Marcus; Tamez, Renato Marcus. Amamentação: bases científicas para a prática profissional. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2002
- ✓ Compston, JE. Sex steroids and bone. **Physiol Rev**, 81: 419-447, 2001.
- ✓ Cousins, R.J.; McMahon, R.J. Integrative aspects of zinc transporters. **The Journal of nutrition.**, Philadelphia, v.130, s. 5, p.1384-7, 2000.
- ✓ Choi PT, Yip G, Quinonez LG, Cook DJ. Crystalloids vs colloids in fluid resuscitation: a systematic review. **Crit Care Med**; 27(1):200-10. 1999
- ✓ Cross, N. A., Hillman, L. S., Allen, S. H., Krause, G. F. & Vieira, N. E. Calcium homeostasis and bone metabolism during pregnancy, lactation, and postweaning: a longitudinal study. **The American journal of clinical nutrition.**, 61: 514-523, 1995.
- ✓ Davies NT, Williams RB. The effect of pregnancy and lactation on the absorption of zinc and lysine by the rat duodenum in situ. **Br J Nutr** 1977;38:417-23
- ✓ Davis, C. D.; Milne, D. B.; Nielsen, F. H. Changes in dietary zinc and copper affect zinc-status indicators of postmenopausal women, notably, extracellular superoxide dismutase and amyloid precursor proteins. **The American journal of clinical nutrition**, Bethesda, v.71, n. 3, p. 781-8, 2000.
- ✓ Dawson, Earl B.; Albers, James; McGanity, William J. Serum zinc changes due to iron supplementation in teen-age pregnancy. **The American journal of clinical nutrition**, v. 50, n. 4, p. 848-852, 1989.
- ✓ Dervigiliis, C. et al. Zinc fluxes and zinc transporter genes in chronic diseases. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 622, n. 1-2, p. 84-93, 2007.
- ✓ Dibley MJ. Zinc. In: Bowman BA, Russell RM, eds. **Present Knowledge in Nutrition**, 8th edn. Washington, DC: ILSE Press, pp. 329-343 , 2001
- ✓ Donangelo, C.M; King, J.C. Maternal zinc intakes and homeostatic adjustments during pregnancy and lactation. **Nutrients** : 4, 782-798, 2012.
- ✓ EIDE, D.J. Zinc Transporters and the cellular trafficking of zinc. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v.1763, n.7, p.711-722, 2006.

- ✓ Fairweather-Tait SJ. Zinc in human nutrition. **Nutr Res Rev**; 1:23-37. 1988
- ✓ Farley, J.R., Chestnut, C.H. e Baylink, D. J. Improved method for quantitative determination in serum of alkaline phosphatase of skeletal origin. **Clin Chem**. 27 (12): 2002-2007, 1981
- ✓ Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, Dietary Reference. Dietary reference Intake (DRI) for phosphorus, magnesium and fluoride, uncorrected errors, **National Academy Press**, Washington, DC, 1997.
- ✓ Food And Agriculture Organization. Human Energy Requirements. Report of a joint **FAO/WHO/UNU** expert Consultation. Rome:FAO/WHO, 2004
- ✓ Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D, **National Academies Press**, Washington, DC, 2011.
- ✓ Fung, E.B.; Ritchie, L.D.; Woodhouse, L.R.; Roehl, R.; King, J.C. Zinc absorption in women during pregnancy and lactation: A longitudinal study. **The American journal of clinical nutrition**,. 66, 80–88. 1997.
- ✓ Gallagher, J. Chris. Advances in bone biology and new treatments for bone loss. **Maturitas**, v. 60, n. 1, p. 65-69, 2008.
- ✓ Gibson, R. S. et al. Indicators of zinc status at the population level: a review of the evidence. **Br J Nutr**, New York, v.99, suppl. 3, p. 14S-23S, 2008
- ✓ Gracitelli, Mauro EC et al. Parathyroid hormone and osteoporosis: solving the puzzle. Physiologic rationale for the therapeutic use of PTH in osteoporosis. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 3, p. 215-220, 2002.
- ✓ Grill, Vivian et al. Parathyroid hormone-related protein: a possible endocrine function in lactation. **Clinical Endocrinology**, v. 37, n. 5, p. 405-410, 1992.
- ✓ Grudtner VS, Weingrill P, Fernandes AL.. Aspectos da absorção no metabolismo do cálcio e vitamina D. **Rev Bras Reumatol** Mai/Jun; 37(3):143-151. 1997
- ✓ Haase, H.; Mocchegiani, E.; Rink, L. Correlation between zinc status and immune function in the elderly. **Biogerontol**, Boston, v.7, n.5-6, p.421-428, 2006.
- ✓ Hambidge, M. Biomarkers of trace mineral intake and status. **The Journal of nutrition** Philadelphia v. 133, suppl 3, p. 948S-955S, 2003

- ✓ Husdan, H. e Rapoport, A. Estimation of creatinine by the Jaffe reaction. A comparison of three methods. **Clin Chem.** 14:222-238. 1968
- ✓ Hempe JM, Cousins RJ. Cysteine-rich intestinal protein and intestinal metallothionein: an inverse relationship as a conceptual model for zinc absorption in rats. **The Journal of nutrition**; 122: 89-95. 1992
- ✓ Henriques, G. S; Hirata, M. H.; Cozzolino, S. N. F. Aspectos recentes da absorção e Biodisponibilidade do zinco e suas correlações com a fisiologia da isoforma testicular da enzima conversora de angiotensina. **The Journal of nutrition.**, Campinas, v.16, n. 3, p.333-345, jul./set., 2003
- ✓ Herzberg, Mala *et al.* The effect of estrogen replacement therapy on zinc in serum and urine. **Obstetrics & Gynecology**, v. 87, n. 6, p. 1035-1040, 1996.
- ✓ Hotz, Christine; Peerson, Janet M.; Brown, Kenneth H. Suggested lower cutoffs of serum zinc concentrations for assessing zinc status: reanalysis of the second National Health and Nutrition Examination Survey data (1976–1980). **The American journal of clinical nutrition**, v. 78, n. 4, p. 756-764, 2003.
- ✓ Instituto of Medicine, food and nutrition board: dietary reference intakes for energy and the macronutrients, carbohydrate, fiber, fat, and fatty acids, Washington, DC, **National Academy Press.** 2002
- ✓ Islam, M.S.; Loots, D.T. Diabetes, metallothionein, and zinc interactions: a review. *Biofactors*, Oxford, v.29, n.4, p.203-212, 2007.
- ✓ ITO, Atsuo et al. Zinco contendo fosfato tricálcico e materiais relacionados para promover a formação óssea. **atual Física Aplicada** , v 5, n. 5, p. 402-406, 2005.
- ✓ Janney CA, Zhang D, Sowers M. Lactation and weight retention. **The American journal of clinical nutrition**, 1997; 66(5):1116-24.
- ✓ Janssens, Katrien et al. Transforming growth factor- 1 to the bone. **Endocrine reviews**, v. 26, n. 6, p. 743-774, 2005.
- ✓ Jackson, M.J.; Giugliano, R.; Giugliano, L.G.; Oliveira, E.F.; Shrimpton, R.; Swainbank, I.G. Stable isotope metabolic studies of zinc nutrition in slum-dwelling lactating women in the Amazon valley. **Br. J. Nutr.** 59, 193–203. 1988.
- ✓ Jin, Qiming et al. RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis. **Journal of periodontology**, v. 78, n. 7, p. 1300-1308, 2007.
- ✓ Jou, Ming-Yu et al. Tissue-specific alterations in zinc transporter expression in intestine and liver reflect a threshold for homeostatic compensation during dietary zinc deficiency in weanling rats. **The Journal of nutrition**, v. 139, n. 5, p. 835-841, 2009



- ✓ Kac, Gilberto; Velásquez-Meléndez, Gustavo; Coelho, M. A. S. C. Fatores associados à obesidade abdominal em mulheres em idade reprodutiva. **Rev Saúde Pública**, v. 35, n. 1, p. 46-51, 2001.
- ✓ Kahmann, L. et al. Zinc supplementation in the elderly reduces spontaneous inflammatory cytokine release and restores T cell functions. **Rejuvenation Res**, New York, v.11, n.1, p.227-237, 2008.
- ✓ Kalkwarf HJ, Specker BL, Bianchi DC, Ranz J & Ho M. The effect of calcium supplementation on bone density during lactation and after weaning. *New England Journal of Medicine* 337: 523–528, 1997.
- ✓ Kamp F, Donangelo CM. Supplementing young women with both zinc and iron protects zinc-related antioxidant indicators previously impaired by iron supplementation. **The Journal of nutrition**. 2008;138:2186–2189
- ✓ Kamp F, Louvain, TS, Donangelo, CM. Effect of oral contraceptive use and zinc supplementation on zinc, iron and copper biochemical indices in Young women. **e-ESPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism** 6 e253-e258. 2011.
- ✓ Kearns, Ann E.; Khosla, Sundeep; Kostenuik, Paul J. Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. **Endocrine reviews**, v. 29, n. 2, p. 155-192, 2008
- ✓ Kent, G. Neil et al. Human lactation: forearm trabecular bone loss, increased bone turnover, and renal conservation of calcium and inorganic phosphate with recovery of bone mass following weaning. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 5, n. 4, p. 361-369, 1990.
- ✓ Kelleher, S.L.; Lopez, V.; Lönnerdal, B.; Dufner-Beattie, J.; Andrews, G.K. Zip3 (Slc39a3) functions in zinc reuptake from the alveolar lumen in lactating mammary gland. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 2009, 297, R194–R201.
- ✓ King, J. C; Keen, C. L. Zinc In: Shils, M. E; Olson, J. Á.; Shike, M., eds. **Modern nutrition in health and disease**. 8ed: Philadelphia: Lea & Febiger; 1994, p. 214-30.
- ✓ King JC. Determinants of maternal zinc status during pregnancy. **The American journal of clinical nutrition**; 71: 1334S-43S, 2000.
- ✓ King, J.C. Zinc absorption and kinetics during pregnancy and lactation in Brazilian women. **The American journal of clinical nutrition**, 82, 118–124. 2005

- ✓ Khosravi, H.; Galali, Beman A.; Efekhari, M. H. Effects of dietary zinc supplement during lactation on longitudinal changes in plasma and milk zinc concentrations. **Nutrition**, v. 16, p. 71-75, 2006.
- ✓ Klein, Catherine J. et al. A longitudinal study of urinary calcium, magnesium, and zinc excretion in lactating and nonlactating postpartum women. **The American journal of clinical nutrition**, v. 61, n. 4, p. 779-786, 1995.
- ✓ Koury, J. C; Donangelo, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 16, n. 4, 2003.
- ✓ Kovacs, C. S. & Kronenberg, H. M. Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation. **Endocr. Rev.** 18: 832–872. 1997
- ✓ Krebs, N.F.; Hambidge, K.M.; Jacobs, M.A.; Rasbach, J.O. The effects of a dietary zinc supplement during lactation on longitudinal changes in maternal zinc status and milk concentrations. **The American journal of clinical nutrition**,41, 560–570. 1985
- ✓ Krebs, N.F.; Reidinger, C.J.; Hartley, S.; Robertson, A.D.; Hambidge, K.M. Zinc supplementation during lactation: Effects on maternal status and milk zinc concentrations. **The American journal of clinical nutrition**,611, 1030–1036. 1995
- ✓ Krebs, N. Zinc supplementation during lactation. **The American journal of clinical nutrition**,68, 509S–512S. 1998
- ✓ Krebs, N. Zinc transfer to the breastfed infant. **J. Mammary Gland Biol. Neoplasia**, 4, 259–268. 1999
- ✓ Krebs, NF. Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. *The Journal of nutrition* . May;130 (5S Suppl):1374S-7S.2000
- ✓ Koury, J. C. ; Donangelo, Carmen Marino . Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, São Paulo, v. 16, n.4, p. 433-441, 2003.
- ✓ Lappalainen R, Knuutila M, Lammi S, Alhava EM (1983) Fluoride content related to the elemental composition, mineral density and strength of bone in healthy and chronically diseased persons. **J Chronic Dis** 36:707–713
- ✓ Laskey, M. Ann et al. Bone changes after 3 mo of lactation: influence of calcium intake, breast-milk output, and vitamin D-receptor genotype. **The American journal of clinical nutrition**, v. 67, n. 4, p. 685-692, 1998.

- ✓ Lau, Yu Sin et al. Phenotypic and molecular studies of giant-cell tumors of bone and soft tissue. **Human pathology**, v. 36, n. 9, p. 945-954, 2005.
- ✓ Lee, H.H. et al. Zinc absorption in human small intestine. **Am J Physiol.**, Washington, v.256, p. 87-91, 1989.
- ✓ Lerner, Ulf H. New molecules in the tumor necrosis factor ligand and receptor superfamilies with importance for physiological and pathological bone resorption. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 15, n. 2, p. 64-81, 2004.
- ✓ Liuzzi, J.P.; Bobo, J.A.; Cui, L.; McMahon, R.J.; Cousins, R.J. Zinc transporters 1, 2 and 4 are differentially expressed and localized in rats during pregnancy and lactation. **The Journal of nutrition** 133, 342–351. 2003.
- ✓ Liuzzi, J. P.; Cousins, R. J. Mammalian zinc transporters, **Annu. Rev. Nutr.**, Palo Alto, v. 24, p. 151 -172, 2004.
- ✓ Lobo, Adriana Soares; Tramonte, Vera Lúcia Cardoso. Efeitos da suplementação de e da fortificação de Alimentos sobre a biodisponibilidade de minerais, os efeitos da suplementação e fortificação de alimentos sobre a biodisponibilidade de minerais. **Rev. Nutr** , v.17, n. 1, p. 107-113, 2004.
- ✓ Lönnerdal, B. Trace element transport in the mammary gland. **Annu. Rev. Nutr.**, 27, 165–177. 2007
- ✓ Lowe, N. M.; Fekete, K.; Decsi, T. Methods of assessment of zinc status in humans: a systematic review. **Am J Clin Nutr**, USA, v. 89, n.6, p. 2040S-2051S, 2009
- ✓ Maia PA, Figueredo R, Anastácio AS, Silveira CLP, Donangelo CM. Zinc and copper metabolism in pregnancy and lactation of adolescent women. **Nutrition**; 23:248–253. 2007
- ✓ Mafra, D.; Cozzolino, S. M. F. Importância do zinco na nutrição humana. **Rev. Nutr.**, Campinas, v.17, n.1, p.79-87, 2004.
- ✓ Maret, W. (2000). The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. **The Journal of nutrition**. 130: 1455S-1458S.
- ✓ Masters, D.G., Keen, C. L.; Lonnerdal, B.; *et al.* Release of zinc from maternal tissues during zinc deficiency or simultaneous zinc and calcium deficiency in the pregnant rat. **The Journal of nutrition**, 116: 2148-2154, 1986.
- ✓ McCall KA, Huang C, Fierke CA. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. **The Journal of nutrition**;130.Suppl:1437-46, 2000

- ✓ McDonnell DP, Mongelsdorf DJ, Pike JW, Haussler MR, O'Malley BW .Molecular cloning of complementary DNA encoding the avian receptor for vitamin D. **Science** 235:1214–1217. 1987
- ✓ McMahan, R. J.; Cousins, R. J. Mammalian Zinc Transporters. **The Journal of nutrition** , Philadelphia,v. 128, n. 4, p. 667-670, 1998.
- ✓ Moser-Veillon, P.B. Zinc needs and homeostasis during lactation. **Analyst**, 120, 895–897, 1995
- ✓ Moser-Veillon, P.B.; Patterson, K.Y.; Veillon, C. Zinc absorption is enhanced during lactation. **FASEB J.**, 9, A729. 1995
- ✓ Mundy, GR and Guise, TA. Hormonal control of calcium homeostasis. **Clin Chem**, 45: 1347 – 1352, 1999.
- ✓ Murray EJ, Messer HH . Turnover of bone zinc during normal and accelerated bone loss in rats. **The Journal of nutrition** 111:1641–1647. 1981
- ✓ National Academy of Sciences, Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc; **National Academic Press**: Washington, DC, USA, 2001.
- ✓ Naylor, K. E. et al. The effect of pregnancy on bone density and bone turnover. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 15, n. 1, p. 129-137, 2000.
- ✓ Neville, M. C. (2001). Anatomy and Physiology of Lactation. In: *Breastfeeding*. Part I: The evidence for breastfeeding”. **Pediatric Clinics of North America**. 48 (1): 13 – 34.
- ✓ O'Brien, Kimberly O. et al. Prenatal iron supplements impair zinc absorption in pregnant Peruvian women. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 9, p. 2251-2255, 2000.
- ✓ O'Dell, B.L., Browning, J.D. e Reeves, G.P. Zinc deficiency increase the osmotic fragility of rat erythrocyte. **The Journal of nutrition**. 117: 1883-1889, 1987.
- ✓ O'Dell . Role of zinc in plasma membrane function. **The Journal of nutrition** ; 130:1432S-6S , 2000.
- ✓ Olney, RC. Regulation of bone mass by growth hormone. **Med Pediatr Oncol**, 41: 228-234, 2003.

- ✓ Organização Mundial de saúde. Alimentação infantil: bases fisiológicas. **IBFAN - International Baby Food Action Network**, Genebra, 1997.
- ✓ Organización Mundial de la Salud. Necesidades de energia y de proteínas. Genebra, **FAO/OMS/UNU**, 220p. (Série de Informes Técnicos 724) . 1985
- ✓ Ovesen, J.; Moller-Madsen, B.; Thomsen, JS., Danscher, G.; Mosekilde, L. The positive effects of zinc skeletal strength in growing rats. **Bohe**, v 29, n.6, p 565-570, 2001.
- ✓ Pabón ML, **Lönnerdal B**. Bioavailability of zinc and its binding to casein in milks and formulas. **J Trace Elem Med Biol**. Oct;14(3):146-53, 2000.
- ✓ Paula-Silva, Francisco Wanderley Garcia; Da Silva, Léa Assed Bezerra; KAPILA, Yvonne Lorraine. Matrix metalloproteinase expression in teeth with apical periodontitis is differentially modulated by the modality of root canal treatment. **Journal of endodontics**, v. 36, n. 2, p. 231-237, 2010.
- ✓ Palmiter, R. D.; Findley, S. D, Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. **EMBO J.**, Oxford, v. 14, n.4, p. 639-49, 1995.
- ✓ Picciano, M.F. Pregnancy and lactation. In: Present Knowledge in Nutrition. Edited by Ziegler, EE and Filer, LJ. **International Life Science Institute (ILSI)**. Washington, DC.37: 384 – 397, 1996.
- ✓ Pires, Jandyra B.; Miekeley, Norbert; Donangelo, Carmen M. Calcium supplementation during lactation blunts erythrocyte lead levels and -aminolevulinic acid dehydratase zinc-reactivation in women non-exposed to lead and with marginal calcium intakes. **Toxicology**, v. 175, n. 1, p. 247-255, 2002.
- ✓ Powell SR. The antioxidant properties of zinc. **The Journal of nutrition**.;130(5):1447-54. 2000
- ✓ Powers, K. S; Hamilton, N. K. Antioxidants and exercise. **Clin Sports Med.**; Hanover, v.18, n. 3, p.525-36, 1999
- ✓ Prasad AS. Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model. **The American journal of clinical nutrition**,53(2):403-12. 1991
- ✓ Prentice, A. Calcium in pregnancy and lactation. **Annu. Rev. Nutr.** 20: 249–272, 1998

- ✓ Rea, Marina F. Os benefícios da amamentação para a saúde da mulher. **J Pediatr (Rio J)**, v. 80, n. 5 Suppl, p. S142-6, 2004.
- ✓ Ribeiro, L. C.; Devincenzi, M. U.; Garcia, J. N.; Hadler, M. C. C. M.; Yamashita, C.; Sigulem, D. M. Nutrição e alimentação na lactação. **Compacta nutr.**, v. 4, n. 1, 2003.
- ✓ Ritchie, LD; Fung, EB; Halloran, BP; Turnlund, JR; Van Loan, MD; Cann, CE; King, JC. A longitudinal study of calcium homeostasis during human pregnancy and lactation and after resumption of menses. **The American journal of clinical nutrition**, 67 (4): 693-701, 1998.
- ✓ Robins SP & New SA . Markers of bone turnover in relation bone health. **Proceedings of the Nutrition Society** 56, 903–914, 1997.
- ✓ Rodrigues, Lilian P.; Jorge, S. R. P. F. Deficiência de ferro na gestação, parto e puerpério. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v. 32, n. Supl 2, p. 53-56, 2010.
- ✓ Salgueiro, M. J. et al. Zinc as an essential micronutrient: a review. **Nutr Res.**, Elsevier, v. 20, n.5, p.737-55, 2000.
- ✓ Santos, H.G.; Sardinha, F.A.A.; Colli, C. Zinco eritrocitário (validação de um método de análise) e zinco dietético na avaliação do estado nutricional de mulheres adultas. **Rev Bras Cienc Farm**, São Paulo, v.41, n.2, p. 205-213, 2005
- ✓ Sauer GR, Wuthier RE. Distribution of zinc in the avian growth plate. **J Bone Miner Res** 5(Suppl 2):S162, 1990.
- ✓ Scheplyagina, Larissa A. Impact of the mother's zinc deficiency on the woman's and newborn's health status. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 19, n. 1, p. 29-35, 2005.
- ✓ Seve, M. et al. In silico identification and expression of SLC30 family genes: Na expressed sequence tag data mining atrategy for the characterization of zinc transporters tissue expression. **BMC Genomics.**, London, v. 5, p.32, 2004.
- ✓ Sian, L.; Krebs, N.F.; Westcott, J.E.; Fengliang, L.; Tong, L.; Mileer, L.V.; Sonko, B.;Hambidge, M. Zinc homeostasis during lactation in a population with a low zinc intake. **The American journal of clinical nutrition**, 75, 99–103. 2002
- ✓ Silva, L. de S. V. da et al. Micronutrientes na gestação e lactação. **Rev. Bras. de Saúde Mat.Inf.** Recife, v. 7, n. 3, p.237-244, jul./set. 2007.
- ✓ Siqueira M.E.P.B.; Pessoa. P.P.M. Reference values for d aminolevulinic acid dehydratase in blood in a population of south Minas Gerais. Brazil. *Revista Brasileira de Toxicologia*. São Paulo, v.12. n.2, dez; Suplemento; 1999

- ✓ Siqueira M.E.P.B.; Maia, P.P.; Oliveira, D.P., e Luengo, D.M.L. Deta-aminolevulinic acid dehydratase activity in the general population of Southern Minas Gerais, Brazil. **Industrial Health**, 41: 19-23, 2003.
- ✓ Sowers, Mary Fran et al. Elevated parathyroid hormone-related peptide associated with lactation and bone density loss. **Osteoporosis International**, v. 6, p. 91-91, 1996.
- ✓ Specker, Bonny L.; Tsang, Reginald C.; HO, Mona L. Changes in calcium homeostasis over the first year postpartum: effect of lactation and weaning. **Obstetrics & Gynecology**, v. 78, n. 1, p. 56-62, 1991.
- ✓ Szckurek, E.I. ; Bjornsson, C.S. ; Taylor, C.G. Dietary zinc deficiency and repletion modulate metallothionein immunolocalization and concentration in small intestine and liver of rats. **The Journal of nutrition.**, Philadelphia, v. 131, p. 2132-8, 2001.
- ✓ Thomas, J.A. Oxidative stress and antioxidant defense. In: **Modern Nutrition in Health and Disease** (Shills, M.E., Olson, J.A., Shike, M. & Ross, A.C., eds) pp. 801-811. Lippincott Wiliams & Williams & Wilkins, Baltimore, MD. 1999.
- ✓ Tomokuni, K. & Kawanishi, T. Relationship between activation of delta aminolevulinic acid dehydratase by heating and blood lead level. **Arch. Toxicol.** 34, 253-258. 1975.
- ✓ Trouvin, Anne-Priscille; Goëb, Vincent. Receptor activator of nuclear factor- B ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. **Clinical interventions in aging**, v. 5, p. 345, 2010
- ✓ Ueland, Thor. Bone metabolism in relation to alterations in systemic growth hormone. **Growth hormone & IGF research**, v. 14, n. 6, p. 404-417, 2004.
- ✓ Umeta M. Zinc supplementation and stunted infants in Ethiopia: a randomised controlled trial. **Lancet**; 355:2021-6. 2000
- ✓ Vargas Zapata, CL, Donangelo, CM, Woodhouse, LR, et al. Calcium homeostasis during pregnancy and lactation in Brazilian women with low calcium intakes: A longitudinal study. **The American journal of clinical nutrition**, 80: 417-422; 2004
- ✓ Wang XF, Wang Q, Ghasem-Zadeh A, Evans A, McLeod C, Iuliano-Burns S, Seeman E. Differences in macro- and microarchitecture of the appendicular skeleton in young Chinese and white women. **J Bone Miner Res** 24:1946–1952. 2009

- ✓ Wang, Z.; Mccauley, L. K. Osteoclasts and odontoclasts: signaling pathways to development and disease. **Oral diseases**, v. 17, n. 2, p. 129-142, 2011
- ✓ Weaver, CM. Calcium. In: Bowman, BA and Russel, RM eds. Present Knowledge in nutrition, 8<sup>th</sup>ed. Washington DC, **ILSI Press**, pp 273-280, 2001.
- ✓ Weisstaub, A *et al.* Influence of low dietary calcium during pregnancy and lactation of zinc levels in maternalblood and bone in rats. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology** Volume 17, Issue 1, Pages 27-32, 2003
- ✓ Wood, RJ. Assessment of marginal zinc status in humans. **The Journal of nutrition**; 130: 1350S-54S; 2000
- ✓ Woodhuse, L.R., Sutherland, B., Lederer, L.J., lowe, N.M e King, J.C. (1998). The effect of zinc intake on erythrocyte fragility in human. **FASEB J.** 12: A1270.
- ✓ Woolf, AD, Dixon, ASJ. Osteoporose: Um Guia Clínico. **Conhecimentos Fisiológicos Prévios**. 1<sup>a</sup> Edição. Londres: Editora Martin Dunitz. p. 20-25; ; 1988
- ✓ WHO study group. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO Technical Report Series no. 843. Geneva: **World Health Organization**, 1994:1-129.
- ✓ World Health Organization. Prevention and control of iron deficiency anaemia in women and children. Report of the **UNICEF/WHO/WHO** Regional Consultation. Geneva: WHO, 1999.
- ✓ World Health Organization. Nutrition Landscape Information System (NLIS) country profile indicators: **interpretation guide**. Geneva: WHO, 2010.
- ✓ Xia J., Browning J. D., O'Dell B. L. Decreased plasma membrane thiol concentration associated with increased fragility of erythrocytes in zinc-deficient rats. **The Journal of nutrition**.129:814 1999.
- ✓ Yamaguchi M, Inamoto K .Differential effects of calcium-regulating hormones on bone metabolism in weanling rats orally administered zinc sulfate. **Metabolism** 35:1044–1047. 1986
- ✓ Yamaguchi M. Role of zinc in bone formation and bone resorption. **J Trace Elem Exp Med** 11:119–135. 1998
- ✓ Yamaguchi M, Gao YH . Potent effect of zinc acexamate on bone components in the femoral-metaphyseal tissues of elderly female rats. **Gen Pharmacol** 30:423–427.1998



- ✓ Yamaguchi, Masayoshi. Role of nutritional zinc in the prevention of osteoporosis. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 338, n. 1-2, p. 241-254, 2010.
- ✓ Yasuda, H; Shima, N; Nakagawa, N; Yamaguchi, K; Kinosake, M; Goto, S; Tsuda, E; Morinaga, T; Udagawa, N; Takahashi, N; Suda, T; Higashio, K. A novel molecular mechanism modulating osteoclast differentiation and function. **Bone**, 25: 109 -113, 1999.

**ANEXOS**

**ANEXO 1****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

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

**TRABALHO DE PESQUISA: “Estado antioxidante e de zinco materno durante a lactação: relação com a massa óssea e com a composição do leite materno”**

Você está sendo convidada a participar de uma pesquisa que investigará a influência da lactação sobre o estado antioxidante, estado de zinco e massa óssea maternos e sobre a composição e capacidade antioxidante do leite humano. O desenvolvimento desta pesquisa contribuirá para esclarecer a influência do estado antioxidante e do estado de zinco maternos sobre a massa óssea materna e sobre a composição e capacidade antioxidante do leite materno, considerado o alimento ideal durante os seis primeiros meses de vida. Espera-se ainda, fornecer dados para a comunidade científica que contribuam para o estímulo de práticas educativas no atendimento pré-natal como forma de prevenção, em longo prazo, da osteoporose e de outras doenças crônicas relacionadas ao estresse oxidativo, no organismo materno; e para garantir uma eficiente transferência de nutrientes e substâncias antioxidantes para o lactente amamentado ao seio. Este estudo está sendo realizado pelas Nutricionistas Danúbia Incutto e Vivianne Magalhães Gomes sob a orientação do Professor Dr. Alexandre Guedes Torres e da Dr<sup>a</sup> Fernanda Kamp, ambos da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

O trabalho terá uma duração de seis meses, no qual você será avaliada em três diferentes períodos da lactação (entre duas a quatro semanas, entre 12 a 14 semanas e entre 22 a 24 semanas após o parto). Em cada dia de estudo, após jejum noturno de 10 horas, serão coletadas amostras de sangue (10mL), de urina (10mL) e de leite materno (10mL), e realizada a densitometria óssea. As coletas de sangue serão realizadas por um enfermeiro registrado, em local apropriado, utilizando material descartável e procedimento de assepsia. A área ao redor do local em que for inserida a agulha poderá ficar vermelha, um pouco inchada e porventura com pequeno hematoma, porém, sem risco à sua saúde. A densitometria óssea é um exame simples, indolor, que ajuda a prevenir a osteoporose. Todas as informações coletadas e obtidas, através de questionários e das análises laboratoriais e densitométricas realizadas, serão mantidas em sigilo e não serão divulgadas isoladamente, e, sim como resultado conjunto, sem a possibilidade de identificação daqueles que participaram do estudo.

Esclarecemos ainda que este estudo não oferece risco à sua saúde e que não haverá despesas por parte dos participantes, nem retorno financeiro. Você terá acesso a todos os resultados das análises realizadas e, se desejar, receberá uma orientação nutricional personalizada. A recusa na participação da pesquisa não acarretará prejuízo algum. Além disso, você poderá se retirar da pesquisa a qualquer momento, sem constrangimentos.

Declaro estar ciente das informações deste Termo de Consentimento e concordo voluntariamente em participar deste estudo.

\_\_\_\_\_  
Nome completo

\_\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário

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

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido do voluntário para participação no estudo.

\_\_\_\_\_  
Nome completo

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável pelo estudo

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

Você poderá, a qualquer momento, entrar em contato com os responsáveis pela pesquisa das seguintes formas: Nutricionistas Danúbia Incutto (21- 9939-7052/ [danubiaincutto@gmail.com](mailto:danubiaincutto@gmail.com)) e Vivianne Magalhães Gomes (21- 8057-8357 / [vivi.magalhaes1804@gmail.com](mailto:vivi.magalhaes1804@gmail.com) ; Prof. Dr. Alexandre Guedes Torres (21 – 2562-8213/ [a.torres.ufrj@gmail.com](mailto:a.torres.ufrj@gmail.com)) e Dr<sup>a</sup> Fernanda Kamp (21- 2562-7351/ [fernandakamp@yahoo.com.br](mailto:fernandakamp@yahoo.com.br))  
Endereço: Avenida Athos da Silveira Ramos, 149. Centro de Tecnologia, Bloco A, Sala 528<sup>a</sup>.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o comitê de ética em pesquisa (CEP) pelo telefone (21) 3971-1690 ou e-mail [cepsmsrj@yahoo.com.br](mailto:cepsmsrj@yahoo.com.br)

## ANEXO 2

### QUESTIONÁRIO DE IDENTIFICAÇÃO DA VOLUNTÁRIA – T0

DATA: \_\_/\_\_/\_\_

<b>DADOS PESSOAIS</b>	
Nome:	
Código no estudo:	
Endereço:	
Telefone:	Celular:
Data de nascimento: __/__/__	Idade:       anos
<b>DADOS SOCIO-ECONÔMICOS</b>	
1- Cor: ( ) branca       ( ) pardo       ( ) negro	
2- Escolaridade: ( ) 1º grau ( ) 2º grau ( ) 3º grau ( ) completo       ( ) incompleto	
3- Trabalha: ( ) sim ( ) não	Carteira assinada: ( ) sim ( ) não
Atividade\cargo:	Quantas pessoas dependem da renda:
4- Estado Civil:	
5- Renda familiar: ( ) < 1 salário mínimo       ( ) 1-3 salários mínimos ( ) >3 salários mínimos       ( ) >5 salários mínimos	
<b>ANAMNESE</b>	
6- Função intestinal: ( ) regular       ( ) irregular	
7- Usa algum tipo de laxante ou fibras? ( ) sim ( ) não	
Qual e em que frequência?	Há quanto tempo?
8- Faz uso de algum medicamento e\ou suplemento nutricional? ( ) sim ( ) não	
Quais e em que frequência?	Há quanto tempo?
9- Usuária de anticoncepcional oral? ( ) sim ( ) não	
Qual?	Há quanto tempo?
10- Pratica atividade física? ( ) sim ( ) não	
Qual e em que frequência?	Há quanto tempo?
11- Tabagista? ( ) sim ( ) não	Quantidade: _____ / dia
12- Etilista? ( ) sim ( ) não	Quantidade: _____ Frequência: _____
13- Usuária de drogas? ( ) sim ( ) não	Quais e frequência? _____
<b>14- História patológica:</b>	
( ) Sífilis	( ) Hepatite (A) (B) (C)
( ) HIV	( ) Tuberculose
( ) Doenças parasitárias	( ) pneumonia
( ) Diabetes	( ) Hipertensão
( ) DRC	Outras:
15- Idade da menarca:       anos	
16- Número de gestações:       Número de paridade:	
<b>DADOS DA GESTAÇÃO</b>	
Fez pré-natal: ( ) sim ( ) não	
Desde quando?	Aonde?
Alguma doença durante a gestação: ( ) sim ( ) não	
Quais?	
Peso pré-gestacional:	Ganho de peso total:

Idade gestacional no parto:	Parto: ( ) normal ( ) cesáreo
Usou algum medicamento e/ou suplemento nutricional durante a gestação? ( ) sim ( ) não Quais?	Quanto tempo?
<b>DADOS DO RECÉM-NASCIDO</b>	
Peso ao nascer:	Comprimento ao nascer:
Apgar:	
<b>DADOS ANTROPOMÉTRICOS MATERNO ATUAIS</b>	
Peso: _____ Kg	Altura: _____ m      IMC: _____ kg/m <sup>2</sup>

Observações:

---



---



---



---



---



---

### QUESTIONÁRIO DE RETORNO DA VOLUNTÁRIA – T1

DATA: \_\_/\_\_/\_\_

<b>ANAMNESE</b>	
Função intestinal: ( ) regular	( ) irregular
Usa ou usou algum tipo de laxante ou fibras? ( ) sim	( ) não
Qual e em que frequência?	Há quanto tempo?
Usa ou usou algum medicamento ou suplemento nutricional? ( ) sim	( ) não
Qual e em que frequência?	Há quanto tempo?
Usuária de anticoncepcional oral? ( ) sim	( ) não
Qual?	Há quanto tempo?
Pratica atividade física? ( ) sim	( ) não
Qual e em que frequência?	Há quanto tempo?
Alguma doença nos últimos três meses? ( ) sim	( ) não
Quais?	
Amamentação: ( ) sim	( ) não
	( ) exclusiva ( ) predominante
<b>DADOS ANTROPOMÉTRICOS MATERNO ATUAIS</b>	
Peso: _____ Kg	Altura: _____ m      IMC: _____ kg/m <sup>2</sup>

Observações:

---



---



---



---



---



---

**ANEXO 3****QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR**

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

IDENTIFICAÇÃO	
Voluntária:	Número:
Entrevistador:	

I. LEITE E DERIVADOS	Quantidade	Tipo	Modo Prep./ consumo	Diariamente	Semanalmente	Mensalmente	Raram
1. Leite							
2. Leite de soja							
3. Iogurte							
4. Creme de leite							
5. Canjica							
6. Queijo							
7. Requeijão, polenguinho							
8. Cream cheese							
II. CARNES, PESCADOS E OVOS	Quantidade	Tipo	Modo Prep./ consumo	Diariamente	Semanalmente	Mensalmente	Raram
9. Ovo							
10. Frango							
11. Carne bovina							
12. Carne suína							
13. Fígado bovino							
14. Vísceras de frango							
15. Frios							
16. lingüiça/salsicha							
17. Bacon/toucinho							
18. Hambúrguer/nuggets							
19. Peixe							
20. Atum, sardinha							
21. Camarão (cozido, frito)							
22. Carne seca							
23. Dobradinha							
24. Língua							
25. Mocotó							
III. VERDURAS E LEGUMES	Quantidade	Tipo	Modo Prep./ consumo	Diariamente	Semanalmente	Mensalmente	Raram
26. Hortaliças							
27. Abóbora							
28. Abobrinha							
29. Alho							
30. Alho-poró, aipo							
31. Cebola							
32. Brócolis							
33. Couve-flor							
34. Couve-mineira							
35. Cenoura							
36. Beterraba							
37. Berinjela							
38. Repolho							
39. Tomate							
40. Jiló, maxixe							
41. Nabo							
42. Pepino							
43. Chuchu							
44. Vagem							
45. Quiabo							
46. Palmito, champignon							
47. Rabanete							
48. Pimentão							
IV. FRUTAS E SUCOS NATURAIS	Quantidade	Tipo	Modo Prep./ consumo	Diariamente	Semanalmente	Mensalmente	Raram
49. Abacaxi							
50. Abacate							
51. Acerola							

52.	Ameixa fresca/seca							
53.	Amora							
54.	Banana							
55.	Caju							
56.	Caqui							
57.	Carambola, cereja, cupuaçu							
58.	Damasco seco							
59.	Fruta do conde							
60.	Goiaba							
61.	Jaboticaba, jaca, jambo							
62.	Kiwi							
63.	Laranja/tangerina							
64.	Maçã							
65.	Mamão							
66.	Manga							
67.	Maracujá							
68.	Melancia							
69.	Melão							
70.	Morango							
71.	Pêra							
72.	Pêssego							
73.	Uva/uva passa							
<b>V. BEBIDAS E SUCOS ARTIFICIAIS/POLPAS</b>		<b>Quantidade</b>	<b>Tipo</b>	<b>Modo Prep./ consumo</b>	<b>Diariamente</b>	<b>Semanalmente</b>	<b>Mensalmente</b>	<b>Raram</b>
74.	Suco de polpa de frutas concentrado							
75.	Suco artificial em pó							
76.	Água de coco							
77.	Caldo de cana							
78.	Suco de xaropes							
79.	Refrigerantes							
80.	Cerveja, choop							
81.	Vinho							
82.	Outras bebidas							
83.	Chá/ mate							
84.	Café							
<b>VI. PÃES, CEREAIS, TUBÉR. E LEGUMINOSAS</b>		<b>Quantidade</b>	<b>Tipo</b>	<b>Modo Prep./ consumo</b>	<b>Diariamente</b>	<b>Semanalmente</b>	<b>Mensalmente</b>	<b>Raram</b>
85.	Pão							
86.	Pão doce/sonho							
87.	Torradas							
88.	Barra de cereal							
89.	Cereais/sucrilhos							
90.	Milho verde							
91.	Pipoca							
92.	Batata							
93.	Arroz							
94.	Polenta/angú							
95.	Canjiquinha							
96.	Aipim/mandioca							
97.	Farinhas/farofa							
98.	Macarrão							
99.	Macarrão instantâneo							
100.	Inhame							
101.	Pirão de mandioca							
102.	Feijão/leguminosas							
<b>VII. ÓLEOS E GORDURAS</b>		<b>Quantidade</b>	<b>Tipo</b>	<b>Modo Prep./ consumo</b>	<b>Diariamente</b>	<b>Semanalmente</b>	<b>Mensalmente</b>	<b>Raram</b>
103.	Azeitonas							
104.	Azeite de oliva							
105.	Óleo vegetal							
106.	Margarina							
107.	Manteiga							
108.	Maionese							
<b>VIII. DOCES, SALGADOS E GULOSEIMAS</b>		<b>Quantidade</b>	<b>Tipo</b>	<b>Modo Prep./ consumo</b>	<b>Diariamente</b>	<b>Semanalmente</b>	<b>Mensalmente</b>	<b>Raram</b>
109.	Chocolates							
110.	Achocolatado em pó							
111.	Sobremesas							

cremosas							
112. Sorvetes cremosos							
113. Doce de frutas							
114. Doces de bar							
115. Salgadinhos de bar							
116. Biscoito salgado							
117. Biscoito doce							
118. Bolo							
119. Torta salgada							
120. Pizza							
121. Pão de queijo							
122. Cachorro quente							
123. Gelatina							
<b>XV. PREPARAÇÕES E MISCELÂNEAS</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Tipo</b>	<b>Modo Prep./ consumo</b>	<b>Diariamente</b>	<b>Semanalmente</b>	<b>Mensalmente</b>	<b>Raram</b>
124. Açúcar para adição							
125. Sopa, caldo instantân.							
126. Molhos industrializado							
127. Molho de tomate							
128. Adoçante artificial							
129. Estrogonofe							
130. Panqueca							
131. Extrato de soja							
132. Proteína de soja							
133. Vinagre							
134. Sal para adição							
<b>X. FRUTAS OLEAGINOSAS</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Tipo</b>	<b>Modo Prep./ consumo</b>	<b>Diariamente</b>	<b>Semanalmente</b>	<b>Mensalmente</b>	<b>Raram</b>
135. Castanha do Pará/cajú							
136. Nozes, amêndoas							
137. Amendoim							



**ANEXO 4****RECORDATÓRIO DE 24 HORAS**

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

<b>IDENTIFICAÇÃO</b>	
<b>Voluntária:</b>	<b>Número:</b>
<b>Entrevistador:</b>	

<b>DESJEJUM</b>	<b>ALIMENTOS/BEBIDAS</b>	<b>QUANTIDADE</b>	<b>COLAÇÃO</b>	<b>ALIMENTOS/BEBIDAS</b>	<b>QUA</b>
<b>Local:</b>			<b>Local:</b>		
<b>Hora:</b>			<b>Hora:</b>		
<b>ALOMOÇO</b>	<b>ALIMENTOS/BEBIDAS</b>	<b>QUANTIDADE</b>	<b>LANCHE</b>	<b>ALIMENTOS/BEBIDAS</b>	<b>QUA</b>
<b>Local:</b>			<b>Local:</b>		
<b>Hora:</b>			<b>Hora:</b>		
<b>JANTAR</b>	<b>ALIMENTOS/BEBIDAS</b>	<b>QUANTIDADE</b>	<b>CEIA</b>	<b>ALIMENTOS/BEBIDAS</b>	<b>QUA</b>
<b>Local:</b>			<b>Local:</b>		
<b>Hora:</b>			<b>Hora:</b>		
<b>OUTROS</b>	<b>ALIMENTOS/BEBIDAS</b>	<b>QUANTIDADE</b>	<b>OUTROS</b>	<b>ALIMENTOS/BEBIDAS</b>	<b>QUA</b>
<b>Local/Hora</b>			<b>Local/Hora</b>		
<b>Local/Hora</b>			<b>Local/Hora</b>		
<b>OBSERVAÇÕES</b>					

**ANEXO 5**