

Associação entre os níveis séricos do marcador de permeabilidade intestinal zonulina e alimentação.

Association between serum levels of zonulin intestinal permeability marker and diet.

Titulo Reduzido: Zonulina e Alimentação.

Patrícia Assmann¹, Bruna Bellincanta Nicoletto. ²

1. Graduação em Nutrição, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.
2. Graduação em Nutrição, Área do Conhecimento de Ciências da Vida, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.

Autor Correspondente: Bruna Bellincanta Nicoletto, Rua Francisco Getulio Vargas, 1130 –
UCS. bbngehrke@ucs.br

RESUMO

Introdução: A zonulina é uma proteína que modula a abertura das junções estreitas no intestino delgado, associada a aumento da permeabilidade intestinal. **Objetivo:** Avaliar a associação entre consumo alimentar e níveis séricos de zonulina. **Métodos:** Estudo transversal, incluindo 73 indivíduos. As concentrações séricas de zonulina foram avaliadas por teste de ELISA. A ingestão alimentar foi avaliada por questionário de frequência alimentar validado para a população do sul do Brasil. Análises de comparação entre grupos com baixa e alta zonulina (de acordo com a mediana), análises de correlação e análise de componentes principal focada foram utilizadas para verificar a associação de componentes dietéticos com níveis de zonulina. Análises de sensibilidade foram realizadas incluindo apenas bons relatores, utilizando índice de Goldberg e Black entre 0,76 e 1,24. **Resultados:** O grupo de menores níveis de zonulina apresentou maior consumo de gorduras totais (78,11±14,27vs.70,34±18,90 g/dia; p=0,043), ácidos graxos poli-insaturados (20,91±7,21vs.

17,51±7,15 g/dia; p=0,047) e saturados [22,7 (20,7 – 24,9) vs.20,9 (18,7- 23,7); p=0,036], assim como entre os bons relatores (p<0,05). Houve correlação negativa dos níveis de zonulina com índice glicêmico da dieta (-0,261; p=0,026) e (-0,340; p=0,043), ácido graxo poli-insaturado (-0,241; p=0,040) e (-0,480; p=0,003) respectivamente na amostra total e entre os bons relatores, Lipídeos Totais (-0,341; p=0,042) entre os bons relatores. Na análise de componentes principais focada, houve uma relação inversa entre ácidos graxos poli-insaturados e zonulina, no grupo de bons relatores.

Conclusão: A maior ingestão de ácidos graxos poliinsaturados está associada a menores níveis de zonulina sérica em seres humanos.

Palavras Chave: Zonulina, Permeabilidade intestinal, microbiota, dieta, consumo de alimentos.

ABSTRACT

Introduction: Zonulin is a protein that modulates the opening of narrow junctions in the small intestine, associated with increased intestinal permeability. **Objective:** To evaluate the association between food consumption and serum zonulin levels. **Methods:** Cross-sectional study, including 73 individuals. Zonulin concentrations were assessed by serum samples, using the ELISA kit. Food intake was assessed using a food frequency questionnaire validated for the population of southern Brazil. Comparison analyzes between groups with low and high zonulin, correlation analyzes and focused main component analysis were used to verify the association of dietary components and food groups with zonulin levels. Sensitivity analyzes were performed including only good rapporteurs, using Goldberg and Black index between 0.76 and 1.24. **Results:** The group with the lowest zonulin levels had the highest consumption of total fats (78.11±14.27 vs. 70.34±18.90 g/day; p=0.043), polyunsaturated fatty acids (20.91±7.21 vs. 17.51±7.15 g/day; p=0.047) and saturated [22.7(20.7 - 24.9) vs. 20.9(18.7-23.7); p=0.036], as well as among good rapporteurs (p<0.05). There was a negative correlation between zonulin levels and the glycemic index of the diet (-0.261;p=0.026) and (-0.340; p=0.043), polyunsaturated fatty acid (-0.241; p=0.040) and (-0.480; p=0.003) respectively in

the total sample and among the good rapporteurs, Total Lipids (-0.341; p=0.042) among the good rapporteurs. In the main component analysis focused, there was an inverse relationship between polyunsaturated fatty acids and zonulin, in the group of good rapporteurs. **Conclusion:** The highest intake of polyunsaturated fatty acids is associated with lower levels of serum zonulin in humans.

Key Words: Zonulin, intestinal permeability, microbiota, diet, food consumption

INTRODUÇÃO

O intestino é o maior reservatório de microrganismos do corpo, habitado por variadas espécies de bactérias. Ele é estruturado por uma linha, que forma uma camada de células epiteliais entre o ambiente e o hospedeiro. A maioria das células epiteliais da mucosa formam barreiras com vazamentos, sendo essas necessárias a troca de fluidos [1,2,3].

A zonulina, é uma proteína presente nas células epiteliais que revestem o intestino delgado, tendo como principal função modular a abertura das junções estreitas (*tight junctions*) do intestino. O aumento de sua liberação está associado a piora da integridade da barreira intestinal. Dessa forma, a zonulina vem sendo estudada como um marcador sérico da permeabilidade intestinal [4,1,5]

Através da abertura das junções estreitas, ocorre o vazamento excessivo de antígenos, podendo levar a um aumento da inflamação e ativação do sistema imunológico. Como consequência, doenças atópicas, doença celíaca, doença inflamatória intestinal, além de obesidade, diabetes mellitus e câncer podem estar associadas ao aumento da permeabilidade intestinal [4,6]

Entre os vários estímulos do lúmen intestinal que podem desencadear a liberação da zonulina, um estudo identificou a exposição do intestino delgado a bactérias *Escherichia coli* e *Salmonella typhi*. Além disso apontou a gliadina como gatilho poderoso na liberação de zonulina [7]. Abordagens trazem o consumo de prebióticos e próbióticos como fatores de proteção, por outro lado, há evidências sobre a restrição do consumo de alguns alimentos, como gorduras, açúcares, ou possivelmente

também os carboidratos com difícil absorção no intestino, conhecidos como FODMAPs prejudicariam a permeabilidade intestinal e conseqüentemente elevariam a zonulina sérica. [6].

Um assunto relativamente novo e escasso, este trabalho teve o objetivo de avaliar a associação entre consumo alimentar e níveis séricos de zonulina.

MÉTODOS

Desenho do estudo e amostra

Estudo transversal, baseado em estudos prévios [8,9]. O estudo original comparou pacientes com doença renal do diabetes com um grupo de pacientes com diabetes sem alteração renal e um grupo de pacientes sem diabetes, em relação aos níveis séricos e urinários de progranulina [8]. A partir dessa população, um segundo estudo foi realizado, incluindo somente os pacientes com taxa de filtração glomerular estimada maior que 60 mL/min/1,73m² [9] a fim de avaliar o consumo alimentar em relação aos níveis de progranulina. A amostra incluiu 85 indivíduos recrutados entre outubro de 2013 e novembro de 2014 do ambulatório do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (RS). Foram excluídos deste estudo pacientes que não tinham dados disponíveis em relação aos níveis séricos de zonulina, além de idade inferior a 18 anos e diagnóstico de câncer, pancreatite, infecções agudas, gravidez, abuso de álcool ou drogas, além de pacientes com taxa de filtração glomerular estimada menor que 60 mL/min/1,73m² e pacientes com consumo calórico acima de 6000 kcal/dia.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil. Todos os pacientes receberam informações a respeito da pesquisa e concordaram com a disponibilização dos dados, assinando o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Coleta de dados

A coleta dos dados demográficos e clínicos foram realizados através de questionário padrão e revisão médica. As variáveis incluídas foram idade, sexo, diagnóstico e duração do diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial, pressão arterial sistólica e diastólica e uso de medicamentos antidiabéticos, anti-hipertensivos e antidislipidêmicos. O diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 foi realizado através dos critérios da *American Diabetes Association* [10]. A hipertensão foi definida pela pressão arterial $\geq 140/90$ mmHg ou uso de medicamentos anti-hipertensivos [11].

As medidas antropométricas foram avaliadas pela mesma nutricionista em todos os pacientes, incluindo peso, altura e circunferência da cintura. Calculou-se o índice de massa corporal (IMC), que consiste na equação (kg / m^2) [12]. A circunferência da cintura foi medida no ponto médio entre a costela mais baixa e a crista ilíaca, usando uma fita métrica flexível e inelástica. A composição corporal foi mensurada com um método de análise de impedância bioelétrica segmentar direta por múltiplas frequências (InBody 230; Biospace, Seoul, Coréia) para avaliar o percentual de gordura corporal (% GC) e a gordura do tronco (kg). As medidas foram realizadas com o paciente em jejum, sem sapatos, vestindo roupas leves, em condição estável. O IMC recomendando pela OMS está na faixa entre $18,5 \text{ kg} / \text{m}^2$ e $25 \text{ kg} / \text{m}^2$, sendo classificado como eutrofico, abaixo dessa faixa, o indivíduo é considerado com baixo peso e acima dessa faixa sobrepeso, ou ainda obesidade, quando os valores estão acima ou iguais a $30 \text{ kg} / \text{m}^2$ [12].

As amostras de sangue foram coletadas após 12 horas de jejum noturno. Foram realizados os seguintes exames laboratoriais: proteína C reativa de alta sensibilidade (hsCRP), glicemia plasmática em jejum, hemoglobina glicada (HbA1c), colesterol total, colesterol HDL, triglicerídeos, proteinúria, albuminúria e creatinina sérica e urinária. O colesterol LDL foi calculado pela fórmula de Friedewald quando os níveis de triglicerídeos eram inferiores a $400 \text{ mg} / \text{dL}$. A TFG foi avaliada pela equação Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) [13].

O sangue foi centrifugado e as amostras obtidas foram armazenadas em duplicata a -80°C . As concentrações de zonulina foram avaliadas por amostras séricas, utilizando o kit de ELISA para zonulina. A sensibilidade do teste foi de 2,92 ng/mL e a faixa do teste foi 6,25-400 ng/mL, enquanto que a variabilidade entre testes foi menor que 12% para amostras séricas. Todas as amostras de zonulina foram feitas em duplicata.

O consumo alimentar foi avaliado a partir de um questionário quantitativo de frequência alimentar (QFA) previamente construído e validado em pacientes do sul do Brasil [14]. O QFA foi composto por 98 itens alimentares, dividido em 9 categorias: cereais; tubérculos, raízes e derivados; legumes; frutas; feijão; carne e ovos; leite e produtos lácteos; óleos e gorduras, doces e bebidas e cobriram os últimos 12 meses de consumo alimentar. A ingestão foi obtida pelo QFA e convertida em consumo diário para o nutriente para cálculo de composição nutricional. Para tal estimativa utilizou-se primeiro a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos [15]. Quando algum alimento não era fornecido no TACO, a segunda e a terceira opção foram, respectivamente, suporte à Decisão Nutricional [16] e o Banco de Dados Nacional de Nutrientes do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos [17]. Os componentes alimentares avaliados foram: energia total, proteína, gordura e seus tipos, carboidratos e fibras. Foram identificados também alimentos com e sem glúten na sua composição.

Como análises de sensibilidade, bons relatores do QFA foram avaliados. Para identificar indivíduos que relataram adequadamente sua ingestão de energia foi utilizada a relação entre consumo e gasto de energia. Os pontos de corte Goldberg e Black foram utilizados para esta avaliação. Primeiro, a taxa metabólica basal (TMB) já obtida por bioimpedância bioelétrica (InBody 230; Biospace, Seul, Coréia) foi multiplicada pelo índice de atividade física de acordo com o FAO /Recomendação da OMS / UNU, para estimar o gasto de energia. Então, a ingestão de energia obtida

pelo QFA foi dividida pelo gasto de energia. Pacientes com valores entre 0,76 e 1,24 foram considerados bons relatores [18,19].

Análise estatística

A associação entre zonulina sérica e consumo alimentar foi avaliada através de análise de componentes principais focada (ACPF) [20], com a utilização do programa R versão 3.2.3. A ACPF realizada considerou a composição nutricional: energia (kcal / dia), proteína (g / dia), carboidratos (g / dia), gorduras (g / dia) e ingestão de fibras (g / dia) e a presença de glúten nos alimentos. Além disso, a ACPF foi realizada para os diferentes tipos de lipídios: ácidos graxos saturados (SFA), ácidos graxos monoinsaturados (MUFA), ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), ácidos graxos trans (TFA) e colesterol, todos em gramas por dia. Como análises de sensibilidade, as mesmas foram realizadas para o grupo de pacientes considerado de bons relatores. Os gráficos gerados pela ACPF apresentaram um círculo vermelho que delimita a significância estatística da correlação no nível de 5%. Os pontos dentro do círculo vermelho mostram associações significativas com a variável de foco (zonulina), os verdes têm associação positiva, e os amarelos negativa. Os dados de consumo de energia e nutrientes foram ajustados para consumo de energia de acordo com o método residual de Willett [21], utilizando o programa Statistical Package for the Social Sciences versão 20.0.

A amostra foi dividida de acordo com a mediana dos níveis séricos de zonulina para comparação entre as variáveis sociodemográficas, antropométricas, clínicas e de consumo alimentar e analisadas usando o programa Statistical Package for the Social Sciences versão 20.0. Para avaliar a normalidade das variáveis contínuas pelo teste de Shapiro Wilk, os grupos foram comparados pelos testes T de Student ou Mann-Whitney, conforme apropriado. Os dados com distribuição normal foram apresentados a partir da média \pm desvio padrão (DP), enquanto os dados com distribuição assimétrica foram apresentados como mediana (intervalo interquartil, P25-P75). As variáveis

categóricas foram comparadas entre os grupos pelo teste do qui-quadrado e apresentadas como números absolutos e porcentagens. O nível de significância estatística estabelecido foi de 5%.

RESULTADOS

Dos 85 pacientes elegíveis do estudo prévio [9], 73 apresentaram dados disponíveis quanto aos níveis de zonulina e foram incluídos no presente estudo. A idade média da amostra foi de $61,1 \pm 8,9$ anos, sendo 42 (57,5%) mulheres. A mediana do IMC resultou em 30,17 (26,39 – 34,61) kg/m^2 , sendo categorizado em eutrofia (n=9, 12,3%), sobrepeso (n=27; 37%) e obesidade (n=37; 50,7%). A maioria da amostra foi composta por pacientes com diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 (n=53; 72,6%), sendo o tempo da doença estimado em 13,0 (7,5-21,0) anos. A mediana de zonulina encontrada foi de 110,0 (68,25 – 175,73) mcg/mL.

A tabela 1 apresenta as características sociodemográficas, clínicas e antropométricas dos sujeitos do estudo. Entre os pacientes com níveis de zonulina > 110 mcg/mL, houve maior prevalência de homens e de pacientes com diabetes mellitus tipo 2. Este grupo também exibiu menores valores de percentual de gordura corporal e HDL, em comparação aos indivíduos com zonulina ≤ 110 mcg/mL (tabela 1).

Na tabela 2, é apresentada a associação dos níveis de zonulina com os componentes dietéticos. Características como energia total, proteína, carboidrato, fibra e IG da dieta não foram diferentes entre os grupos. No entanto, a ingestão de lipídeos totais, ácidos graxos poli-insaturados e ácidos graxos saturados foram maiores entre os pacientes com valores de zonulina ≤ 110 mcg/mL.

A análise de sensibilidade foi realizada incluindo apenas os bons relatores (n=36). Entre os pacientes com menores níveis de zonulina (n=19), a ingestão de lipídeos totais ($83,6 \pm 16,0$ vs. $70,0 \pm 18,2$; $p=0,023$) ácidos graxos poliinsaturados ($22,9 \pm 7,9$ vs $16,1 \pm 5,5$; $p=0,005$) e saturados ($23,6$ vs

19,9; $p=0,049$) também foram maiores, em comparação aos indivíduos com valores elevados de zonulina ($n=17$).

A tabela 3 apresenta os dados de correlação entre os níveis séricos de zonulina e variáveis de consumo alimentar na amostra total e entre os bons relatores. Houve correlação negativa dos níveis de zonulina com o índice glicêmico da dieta e o consumo de ácidos graxos poli-insaturados tanto entre a amostra total e entre os bons relatores. Entre os bons relatores, os níveis de zonulina ainda se correlacionaram negativamente com o consumo total de lipídeos, e positivamente com o consumo total de carboidratos.

Na ACPF dos bons relatores, houve associação inversa entre níveis de zonulina e o consumo de ácidos graxos poli-insaturados, afirmando os resultados anteriores. (Figura 1). Nenhuma outra associação foi observada na ACPF.

DISCUSSÃO

No presente estudo foi possível explorar a relação entre a ingestão alimentar e níveis séricos de zonulina. O maior consumo de gorduras totais foi associado com níveis menores de zonulina, sendo representado principalmente pela classe dos ácidos graxos poli-insaturados. Além disso, o maior consumo de ácido graxo saturado também foi observado entre os pacientes com menores níveis de zonulina na amostra total e entre os bons relatores. Ainda, foi encontrada uma correlação positiva no consumo de carboidratos e zonulina entre os bons relatores e negativa entre no consumo de alimentos com alta carga glicêmica nos dois grupos.

A zonulina é um marcador de permeabilidade intestinal, sendo assim, quanto maior os níveis de zonulina sérica, maior a permeabilidade e a passagem de antígenos com potencial inflamatório [22]. Estudos apontam o consumo de ácido graxo poli-insaturado, mais especificamente do subgrupo ômega 3, como fator protetor da integridade da barreira intestinal. Sua ingestão é capaz de melhorar

a função da barreira epitelial, diminuindo as bactérias do grupo Bacterioides e aumentando as Firmicutes, regulando ainda a expressão de junções estreitas. Além disso, estudam-se os efeitos da suplementação alimentar do ômega 3 para prevenir o vazamento da barreira epitelial intestinal, e o tratamento da microbiota através de técnicas de transplante fecal, inicialmente sendo realizadas em camundongos, para efeitos de prevenção de doenças inflamatórias, como obesidade e diabetes [23,24]. No presente estudo, não se encontra dados específicos do consumo de ômega 3- subgrupo das gorduras poli-insaturadas, mas encontrou-se relação entre consumo de gorduras poli-insaturadas em seu montante com diminuição de níveis séricos de zonulina, podendo ter predominância no consumo dietético desse subgrupo.

Uma revisão composta por ensaios clínicos randomizados, [25] avaliou os efeitos das gorduras em um total de 387 pacientes, sendo sua maioria (76%) composta por homens. O estudo concluiu que a própria gordura é capaz de alterar a permeabilidade, por danificar diretamente as junções estreitas. Quando avaliado o consumo de gorduras saturadas, se obteve concentrações plasmáticas elevadas de LPS- lipopolissacarídeo [25], uma molécula também conhecida como endotoxina que se encontra abundantemente na membrana externa das bactérias gram-negativas, responsável por estimular o sistema imunológico inativo, ativando receptores e induzindo a liberação de citocinas inflamatórias [22], enquanto nas refeições ricas em gorduras poli-insaturadas suas concentrações foram menores. O estudo [25] concluiu que a ingestão de gordura saturada pode ser considerada como um fator de risco alimentar para o desenvolvimento de endotoxemia metabólica, já a ingestão de gorduras poli-insaturadas parece exercer um efeito protetor. No presente estudo resultados diferentes foram encontrados em relação as gorduras saturadas, já que essas se relacionaram a valores mais baixos de zonulina sérica, ou seja, menores níveis de zonulina caracterizam menor permeabilidade intestinal, por outro lado, resultados semelhantes foram encontrados em relação às gorduras poli-insaturadas e melhora na permeabilidade intestinal, que no presente estudo se caracteriza pela diminuição de zonulina sérica.

Recentes estudos vêm associando o consumo da dieta cetogênica para a saúde da microbiota intestinal. A microbiota é definida como a colonização de micro-organismos vivos no intestino, composto por bactérias “boas” e “ ruins”. [6]. A disbiose é o aumento do número de bactérias ruins e diminuição das bactérias benéficas, nela a barreira intestinal perde sua seletividade, permitindo a passagem de substâncias indevidas para a corrente sanguínea, aumentando a permeabilidade intestinal [26]. A dieta cetogênica é caracterizada pelo elevado teor de gorduras em sua composição, sendo composta pelas três fontes de gorduras: monoinsaturadas, poli-insaturadas e saturadas e baixo consumo de carboidratos, sendo esses consumidos no máximo em 10% da dieta total. Um estudo realizado em camundongos saudáveis, induziu a eles o consumo de uma dieta cetogênica no período de 16 semanas. Os ratos apresentaram efeitos benéficos na composição da microbiota intestinal, mais especificamente com o aumento das cepas benéficas [27].

No estudo de Morki e colaboradores [28], foram avaliados valores séricos de zonulina em mulheres através da coleta de sangue e o teste ELISA. A amostra foi dividida em dois grupos, com alto e baixo teor de zonulina. Foram encontradas diferenças significativas na ingestão alimentar entre os grupos, sendo consumo maior de proteína, carboidratos, gorduras, vitamina B12 e sódio, associadas com o aumento de zonulina. Já o consumo de fibras foi associado a valores mais baixos de zonulina. Entretanto o consumo de gorduras não teve correlação significativa quando avaliado separadamente com zonulina, fazendo com que sua relação negativa perdesse força. No presente estudo, o macronutriente carboidrato também teve correlação positiva com zonulina, já proteína e fibras não tiveram valores associados, podendo ser convergentes por conta de características diferentes entre os grupos estudados, sendo que no presente estudo a população era variada, com predominância masculina e com diabetes mellitus tipo 2, já o estudo de Morki e colaboradores [28], eram somente mulheres, incluindo participantes atletas e que apresentam diagnóstico de anorexia, além de que o consumo alimentar foi avaliado através de recordatório 24 horas, o que se distingue do estudo atual.

Quando avaliado o consumo dietético e níveis aumentados de zonulina, destaca-se a gliadina, uma proteína presente em grãos, mais conhecida como uma fração do glúten, que aumenta a permeabilidade intestinal, pois auxilia na liberação de zonulina pré-formada nas linhas celulares intestinais [29]. O estudo realizado por Hollon e colaboradores [30] confirma essa hipótese, através da avaliação de pacientes com e sem doença celíaca. Coletando biópsias de uma parte do intestino, foi encontrado um aumento da permeabilidade intestinal após a exposição à gliadina, resultados semelhantes foram encontrados em todos os grupos, ou seja, o aumento da permeabilidade intestinal, que consequentemente aumenta a zonulina circulante. Neste estudo, ao serem avaliados alimentos fontes de glúten na ACPF, não foram observadas associações significativas.

Cada vez mais estudos abordam a relação entre saúde do intestino e doenças inflamatórias. No presente estudo foi encontrado níveis altos de zonulina em participantes com diabetes mellitus tipo 2. A microbiota vem sendo associada no desenvolvimento de condições pré-diabéticas, como a resistência à insulina, fatores que dificultam a interação entre microbiota e sistema imunológico que podem levar ao aumento de distúrbios metabólicos [31]. Um estudo realizado na China envolvendo pacientes com e sem diabetes mellitus tipo 2, avaliou a relação entre resistência a insulina e o marcador de permeabilidade intestinal zonulina, através do Kit ELISA, mesmo método utilizado no presente estudo. A associação entre zonulina e resistência à insulina pode ser medida através da inflamação. O estudo concluiu que os níveis de zonulina estavam aumentados em pacientes recém diagnósticos com a doença, além disso, também relacionou o aumento de zonulina com valores aumentados de IMC, relação cintura quadril, triglicérides e inversamente relacionada com níveis de HDL-C, como encontrado no presente estudo[31].

O presente estudo contou com algumas limitações. Primeiro o tamanho da amostra foi pequena, os bons relatores somaram um número menor ainda, limitando o estudo. Segundo, a amostra é oriunda de um estudo transversal já realizado, o que fez com que as características da amostra tenham sido direcionadas ao estudo anterior. Terceiro, o QFA mesmo sendo um formulário estudado

e bem conhecido, limita o estudo, tendo em vista que ele é extenso e confuso para a maioria da população, que tem dificuldade de lembrar a sua frequência alimentar.

Em conclusão, a ingestão de lipídeos, representado principalmente pelas gorduras poli-insaturadas, parece estar associado com níveis mais baixos de zonulina sérica. O assunto em discussão é relativamente novo, sendo sugeridos outros estudos, de maior tamanho amostral e de desenho prospectivo.

REFERÊNCIAS

1. Sturgeon C, Fasano A. Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. *Tissue Barriers*. 2016 Oct 21;4(4):1251384.
2. Meroni M, Longo M, Dongiovanni P. Alcohol or Gut Microbiota: Who Is the Guilty? *Int J Mol Sci*. 2019 Sep 14;20(18):4568
3. Kong S, Zhang YH, Zhang W. Regulation of Intestinal Epithelial Cells Properties and Functions by Amino Acids. *Biomed Res Int*. 2018 May 9; 2018:2819154.
4. Wood Heickman LK, DeBoer MD, Fasano A. Zonulin as a potential putative biomarker of risk for shared type 1 diabetes and celiac disease autoimmunity. *Diabetes Metab Res Rev*. 2020 Jul;36(5): 3309.
5. Mörkl S, Lackner S, Meinitzer A, Mangge H, Lehofer M, Halwachs B, et.al. Gut microbiota, dietary intakes and intestinal permeability reflected by serum zonulin in women. *Eur J Nutr*. 2018 Dec; 57(8) : 2985-2997.

6. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke JD, Serino M, et.al. Intestinal permeability - a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol.* 2014 Nov 18; 14: 189.
7. Fasano A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol Rev.* 2011 Jan;91(1):151-75.
8. Nicoletto BB, Krolikowski TC, Crispim D, Canani LH. Serum and Urinary Progranulin in Diabetic Kidney Disease. *PLoS One.* 2016 Oct 24;11(10): 0165177.
9. Nicoletto BB, Sarmiento RA, Pedrollo EF, Krolikowski TC, Canani LH. Association between progranulin serum levels and dietary intake. *PLoS One.* 2018 Aug 17;13(8):0202149.
10. American Diabetes Association. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care.* 2016; 39 Suppl 1:S13±S22.
11. Marcus Vinícius BM, Weimar Kunz SBS, Frida Laine P, Cibele ISR, Andrea Araujo B, Mário Fritsch TN.et al. Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Cardiol.* Ed 7°. 107(3Supl.3):1-83, 2016. Acesso em 05/10/2020. Disponível em <
http://publicacoes.cardiol.br/2014/diretrizes/2016/05_HIPERTENSAO_ARTERIAL.asp>.
12. World Health Organization. [internet]. Acesso em: 03 de jun.2020. Disponível em <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/nutrition/a-healthy-lifestyle/body-mass-index-bmi, 2020>.

13. Levet AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3rd, Feldman HI. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 2009 May 5;150(9):604-12.
14. Sarmiento RA, Riboldi BP, da Costa Rodrigues T, de Azevedo MJ, de Almeida JC. Development of a quantitative food frequency questionnaire for Brazilian patients with type 2 diabetes. *BMC Public Health.* Aug 9; 13: 740;2013.
15. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. 4º edição. Campinas. UNICAMP; 2011.
16. Philippi ST. Tabela de composição de alimentos: suporte para decisão nutricional. São Paulo. Universidade de São Paulo; 2002.
17. Rizek HF, Perloff BP. Composition of foods: agriculture handbook. No 8. Washington, DC. United States Department of Agriculture; 2006.
18. Goldberg GR, Black AE, Jebb SA, Cole TJ, Murgatroyd PR, Coward WA, et al. Critical evaluation of energy intake data using fundamental principles of energy physiology: 1. Derivation of cut-off limits to identify under-recording. *Eur J Clin Nutr.* 45:569±581; 1991.
19. Black AE. The sensitivity and specificity of the Goldberg cut-off for EI:BMR for identifying diet reports of poor validity. *Eur J Clin Nutr.* 54:395±404; 2000.
20. Canuto Raquel, Camey Suzi, Gigante D.P, Menezes Ana M. B, Olinto Maria T A. Análise de Componente Principal Focada: um método gráfico para explorar padrões alimentares. *Cad. Saúde Pública [online].* 2010, vol.26, n.11, pp.2149-2156. ISSN 0102-311X.

21. Willett WC, Howe GR, Kushi LH. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr.* 1997;65(Suppl):1220S-8S).
22. Leech B, McIntyre E, Steel A, Sibbritt D. Risk factors associated with intestinal permeability in an adult population: A systematic review. *Int J Clin Pract.* Oct;73(10): 13385. 2019.
23. Bellenger J, Bellenger S, Escoula Q, Bidu C, Narce M. N-3 polyunsaturated fatty acids: An innovative strategy against obesity and related metabolic disorders, intestinal alteration and gut microbiota dysbiosis. *Biochimie.* Apr;159:66-71. 2019.
24. Bidu C, Escoula Q, Bellenger S, Spor A, Galan M, Geissler A. et.al. The Transplantation of ω 3 PUFA-Altered Gut Microbiota of fat-1 Mice to Wild-Type Littermates Prevents Obesity and Associated Metabolic Disorders. *Diabetes.* Aug;67(8):1512-1523. 2018.
25. Cândido TLN, da Silva LE, Tavares JF, Conti ACM, Rizzardo RAG, Gonçalves Alfenas RC. Effects of dietary fat quality on metabolic endotoxaemia: a systematic review. *Br J Nutr.* Oct 14;124(7):654-667; 2020.
26. Vancamelbeke M; Vermeire S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* V.11(9), p. 821–834., 2017.
27. Paoli A, Mancin L, Bianco A, Thomas E, Mota JF, Piccini F. Ketogenic Diet and Microbiota: Friends or Enemies? *Genes (Basel).* Jul 15;10(7):534. 2019.

28. Mörkl S, Lackner S, Meinitzer A, Mangge H, Lehofer M, Halwachs B. Gut microbiota, dietary intakes and intestinal permeability reflected by serum zonulin in women. *Eur J Nutr.*Dec;57(8):2985-2997; 2018.
29. Visser J, Rozing J, Sapone A, Lammers K, Fasano A. Tight junctions, intestinal permeability, and autoimmunity: celiac disease and type 1 diabetes paradigms. *Ann N Y Acad Sci.*May;1165:195-205; 2009.
30. Hollon J, Puppa EL, Greenwald B, Goldberg E, Guerrerio A, Fasano A. Effect of gliadin on permeability of intestinal biopsy explants from celiac disease patients and patients with non-celiac gluten sensitivity. *Nutrients.* Feb 27;7(3):1565-76; 2015.
31. Salgaço MK, Oliveira LGS, Costa GN, Bianchi F, Sivieri K. Relationship between gut microbiota, probiotics, and type 2 diabetes mellitus. *Appl Microbiol Biotechnol.* Dec;103(23-24):9229-9238.32;2019.

Tabela 1. Características demográficas, clínicas e antropométricas dos sujeitos do estudo

	Zonulina ≤ 110 mcg/mL (n=37)	Zonulina > 110 mcg/mL (n=36)	Valor p
Zonulina (mcg/mL)	70.2 (53.0 – 82.2)	175.7 (137.6 – 386.3)	-
Idade (anos)	62.5 ± 10.1	59.8 ± 7.5	0.202
Sexo masculino, n (%)	9 (24.3)	22 (61.1)	0.001
Diabetes mellitus tipo 2, n (%)	23 (62.2)	30 (83.3)	0.043
Hipertensão n (%)	27 (79.4)	32 (88.9)	0.276
Pressão arterial sistólica (mmHg)	137 (124 – 142)	140 (121 – 150)	0.606
Pressão sanguínea diastólica (mmHg)	80 (68 – 80)	80 (73 – 90)	0.061

Índice de massa corporal (kg/m ²)	31.2 (26.4 – 37.6)	29.6 (26.4 – 32.9)	0.305
Circunferência da cintura (cm)	104.7 ± 14.8	103.7 ± 12.9	0.751
Gordura corporal %	39.7 ± 8.6	32.3 ± 9.5	0.001
Gordura do tronco (kg)	16.8 ± 5.7	14.6 ± 5.1	0.082
Glicose plasmática em jejum (mg/dL)	126.0 ± 53.1	146.5 ± 60.73	0.126
HbA1c (%)	7.24 ± 1.71	7.88 ± 1.69	0.108
Colesterol total (mg/dL)	175.9 ± 34.8	188.0 ± 47.3	0.216
LDLc (mg/dL)	101.5 ± 30.6	109.0 ± 41.5	0.383
HDLc (mg/dL)	43.0 (36.0 – 51.5)	38.0 (33.3 – 44.0)	0.042
Triglicerídeos (mg/dL)	135.0 (100.5 – 188.5)	151.0 (110.8 – 236.0)	0.368
PCRus (mg/dL)	3.34 (2.10 – 10.80)	2.45 (0.95 – 5.17)	0.098
IL-6 (pg/mL)	3.12 (3.12 – 3.77)	3.12 (3.12 – 3.38)	0.339
TFGe (mL/min)	98.6 ± 18.8	96.4 ± 15.0	0.587

PCRus: proteína C reativa ultra sensível; IL-6: interleucina-6; TFGe: taxa de filtração glomerular estimada.

Tabela 2. Consumo alimentar de acordo com os níveis de zonulina (amostra total)

	Zonulina \leq 110	Zonulina $>$ 110	Valor p
	mcg/mL	mcg/mL	
	(n=37)	(n=36)	
Energia (kcal/dia)	1911 (1433 – 2412)	1948 (1414 – 2634)	0,783
Proteína (g/dia)	80,49 \pm 15,02	78,80 \pm 15,77	0,642
Proteína (g/kg)	1,00 \pm 0,25	0,96 \pm 0,24	0,465
Lipídeos (g/dia)	78,11 \pm 14,27	70,34 \pm 18,90	0,043
Ácidos graxos poli-insaturados (g/dia)	20,91 \pm 7,21	17,51 \pm 7,15	0,047
Ácidos graxos monoinsaturados (g/dia)	23,3 (20,6 – 26,2)	21,1 (18,1 – 26,2)	0,120
Ácidos graxos saturados (g/dia)	22,7 (20,7 – 24,9)	20,9 (18,7 – 23,7)	0,036
Ácidos graxos trans (g/dia)	1,6 (1,2 – 2,3)	1,5 (1,1 – 1,8)	0,122
Carboidratos (g/dia)	247,50 \pm 35,50	262,11 \pm 51,02	0,159
Fibras (g/dia)	25,39 \pm 7,61	25,56 \pm 7,96	0,924
Índice glicêmico da dieta	49 (45 – 52)	46,5 (44,3 – 49,5)	0,204

Tabela 3. Correlações entre zonulina sérica e consumo alimentar

Variável	Amostra total r (p) n=73	Bons relatores r (p) n=36
Energia	-0,001 (0,990)	0,175 (0,307)
Proteínas	-0,026 (0,824)	0,060 (0,729)
Lipídeos	-0,182 (0,123)	-0,341 (0,042)
Ácidos graxos poli-insaturados	-0,241 (0,040)	-0,480 (0,003)
Ácidos graxos monoinsaturados	-0,119 (0,314)	-0,215 (0,207)
Ácidos graxos saturados	-0,090 (0,449)	-0,105 (0,542)
Ácidos graxos trans	-0,212 (0,072)	-0,082 (0,636)
Colesterol total	-0,110 (0,355)	0,018 (0,918)
Carboidratos	0,189 (0,110)	0,346 (0,039)
Índice glicêmico da dieta	-0,261 (0,026)	-0,340 (0,043)