UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

Influência do Polimorfismo Arg325Trp no gene do ZnT8 (*SLC30A8)* no estado nutricional relativo ao zinco de pacientes com diabetes tipo 2 e sua relação com parâmetros glicêmicos e insulinêmicos.

Verônica da Silva Bandeira

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientadora:

Profa. Tit. Silvia Maria Franciscato Cozzolino

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bandeira, Verônica da Silva
B214i Influência do polimorfismo Arg325Trp no gene do ZnT8 (SLC30A8) no estado nutricional relativo ao zinco de pacientes com diabetes tipo 2 e sua relação com parâmetros glicêmicos e insulinêmicos / Verônica da Silva Bandeira. -- São Paulo, 2015.
94p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Cozzolino, Silvia Maria Franciscato

1. Nutrição : Avaliação nutricional : Ciência dos alimentos 2. Zinco 3. Diabetes mellitus I. T. II. Cozzolino, Silvia Maria Franciscato, orientador.

641.1 CDD

Verônica da Silva Bandeira

Influência do Polimorfismo Arg325Trp no gene do ZnT8 (*SLC30A8)* no estado nutricional relativo ao zinco de pacientes com diabetes tipo 2 e sua relação com parâmetros glicêmicos e insulinêmicos.

Versão Original

Comissão Julgadora da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Silvia Maria Franciscato Cozzolino
Orientadora/Presidente

_____

1º Examinador

_____

2º Examinador

São Paulo, _____de_____.

“O coração do homem planeja o seu caminho, mas o SENHOR lhe dirige os passos.”

Provérbios 16:9

Para meus pais, Ana Lúcia e Robson, meus grandes incentivadores.

Ás minhas amadas irmãs, Juliane, Débora e Ludmila.

Ao meu eterno amor, Igor!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer ao meu único Deus, por ter me dado forças e graça para realizar mais um sonho, por colocar em meu caminho pessoas especiais, por permitir que minha fé não desfalecesse nessa jornada. Senhor, te amo!

À minha querida orientadora Silvia Cozzolino, que me aceitou como aluna dando essa oportunidade. Grande exemplo de profissional, sua humildade e dedicação são admiráveis. Durante todos esses anos, com seus ensinos pude melhorar e serei eternamente agradecida.

Ao Dr. Simão Lottenberg, meu carinho, pois me acolheu no Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. Essa parceria foi efetiva para realização das coletas dos pacientes e andamento deste trabalho.

À minha família, pai Robson, mãe Ana Lúcia, irmãs: Juliane, Débora e Ludmila. Vocês são essenciais na minha vida, meu porto seguro, aconchego constante, amo demais!

Ao amor da minha vida, Igor Marques, pelo apoio e carinho! Que mesmo de longe, você fez seu amor me alcançar, me fez sorrir, me encheu de alegria. Obrigada por ser meu refúgio nos momentos de angústias, por ser simplesmente assim, meu doce amor.

Às minhas eternas amigas, meus amores! Liliane Viana Pires, amada Lili, sua participação neste trabalho foi essencial, do início ao fim, discussões, sabatinas, toda a dedicação que teve por mim, conselhos, explicações, sou extremamente agraciada por Deus por ter me dado você, maravilhosa amiga, obrigada por tudo! Luciane Luca de Alencar, Lú, e Leila Leiko Hashimoto, Lelis, minhas amigas e parceiras de coletas, vocês fizeram meus dias de trabalho mais

felizes. Conheci as três no Laboratório de Nutrição e Minerais e foi uma das melhores coisas que aconteceu na minha vida. Agradeço a Deus pela amizade construída e alicerçada, por estarem comigo nos momentos de alegrias, tristezas, pelos aprendizados, pelos conselhos, pelo apoio, por estarem lado a lado na realização desse sonho. Nunca esquecerei o abraço cheiroso da Lili, o sorriso cativante da Lú e o doce olhar da Lelis, enfim, por tudo, TUDO e mais além, nossas conversas e abraços sinceros! Amo vocês!

A Kaluce Almondes, meu sincero carinho! Obrigada Kaka pela grande ajuda e empenho neste trabalho, Deus abençoe você, beijo no coração!

Aos colegas do Laboratório de Nutrição e Minerais, quero agradecer a todos pelo aprendizado com as discussões científicas foi de grande valia para meu crescimento profissional. Grande beijo com carinho: Ariana Rocha, Bárbara Cardoso, Bruna Reis, Cristiane Cominetti, Graziela Biude, Isabela Saraiva, Janaína Donadio, Kátia Kallou, Larissa Bezerra, Margarete Soares e Rafael Barofaldi.

Ao técnico do Laboratório de Nutrição e Minerais, Alexandre Pimentel, pela disponibilidade e aprendizado nas análises.

Aos funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental: Cleonice, Mônica, Edilson, Roberta e a amável Lurdinha, com seus sorrisos e conversas me alegraram muito.

Aos participantes da pesquisa que permitiram a realização desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS
LISTA DE FIGURAS
LISTA DE TABELAS
RESUMO

1. REVISÃO DA LITERATURA 1
1.1 Diabetes *Mellitus* tipo 2 1
1.2 Zinco 7
1.3 Zinco, Diabetes e Transportador de zinco 8 10
1.4 Polimorfismo Arg325Trp (rs13266634) 12
1.5 Referências 16
2. OBJETIVOS 23
2.1 Geral 23
2.2 Específicos 23
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS 24
3.1 Protocolo experimental 24
3.2 Avaliação Antropométrica 26
3.3 Avaliação da ingestão alimentar 27
3.4 Controle de contaminação 27
3.5 Coleta de Materiais Biológicos e Análises Bioquímicas 28
3.6 Parâmetros bioquímicos de avaliação do *status* de zinco 29
3.7 Determinações dos parâmetros glicêmicos 30
3.8 Índice de resistência à insulina- HOMA-IR e Função das células β (HOMA-β) 30
3.9 Determinação do SNP Arg325Trp no gene *SLC30A8* do ZnT8 (rs13266634) 30
3.10 Determinação dos parâmetros lipídicos 31
3.11 Avaliação Estatística 31
3.12 Referências 32
4. RESULTADOS 35
ARTIGO 1 35
ARTIGO 2 54
APÊNDICE A 73
APÊNDICE B 75
APÊNDICE C 78
ANEXO 1 79

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT	Proteína quinase B
AMDR	Faixa Aceitável de Distribuição dos Macronutrientes
ANOVA	Análise de variância de uma via
ATP	Trifosfato de Adenosina
C	Citosina
CRIP	Proteína Intestinal rica em cisteína
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EAR	Necessidade Média Estimada
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GLUT	Transportador de glicose
GWAS	Estudo de Associação do Genoma
HDL	Lipoproteína de alta Densidade
HOMA	Modelo de Avaliação da Homeostase
IDF	Federação Internacional de Diabetes
IFNγ	Interferon gama
IL	Interleucinas
IMC	Índice de Massa Corporal
IR	Receptor de Insulina
IRS-1	Substrato do Receptor de Insulina – 1
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
NacL	Cloreto de Sódio
NK	Natural Killer
OMS	Organização Mundial da Saúde
PC1 e 2	Pró Hormônio Covertase 1 e 2
PI3K	Fosfatidilinositol-3-Quinases
SLC e ZIP	Transportadores de zinco
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único

T	Timina
TACO	Tabela de Composição de Alimentos
TG	Triglicerídeos
TNFα	Fator de Necrose Tumoral
TOTG	Teste Oral de Tolerância a Glicose
VET	Valor Energético Total
ZnT8	Transportador de zinco 8

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Número de pessoas com diabetes (20-79 anos) pela *International Diabetes Federation*, 2013..... **2**

Figura 2. Regiões e projeções globais do número de pessoas com diabetes (20-79 anos), 2013 e 2035 pela IDF (2013)..... **3**

Figura 3. Mecanismo de estímulo da secreção de insulina associado ao zinco pelas células β do pâncreas por meio da concentração extracelular de glicose (Adaptado de Guyton, 2006)..... **6**

Figura 4. Estrutura do ZnT8 (Figueiredo, 2011)..... **11**

CASUISTICA E MÉTODOS

Figura 1. Fluxograma do estudo..... **25**

ARTIGO 2

Figura 1. Proporção de indivíduos com DM2 de acordo com a recomendação de contribuição energética de macronutrientes avaliados nas dietas (n=82)..... **62**

Figura 2. Correlações entre as concentrações de zinco no plasma e hemoglobina glicada (A), de zinco urinário e glicose (B), hemoglobina glicada (C) e o HOMA-IR (D)..... **63**

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1. Estudos com a frequência do polimorfismo (rs13266634) que codifica para o gene *SLC30A8* (ZnT8) em Asiáticos com DM2..... **14**

Tabela 2. Estudos com a frequência do polimorfismo (rs13266634) que codifica para o gene *SLC30A8* (ZnT8) em Europeus com DM2..... **14**

Tabela 3. Distribuição do genótipo (rs13266634) do gene *SLC30A8* e da frequência do alelo de risco C em europeus não diabéticos que eram parentes de indivíduos com DM2..... **15**

ARTIGO 1

Tabela 1. Características clínicas e distribuição dos genótipos do *SNP* Arg325Trp do gene *SLC30A8* do ZnT8 dos indivíduos com DM2..... **42**

Tabela 2. Composição corporal dos pacientes com DM2 de acordo com os genótipos do *SNP* Arg325Trp que codifica para o gene *SLC30A8*..... **43**

Tabela 3. Parâmetros do *status* de zinco, glicêmicos e insulinêmicos dos indivíduos com DM2 de acordo com os genótipos do *SNP* Arg325Trp que codifica para o gene *SLC30A8* do ZnT8..... **44**

ARTIGO 2

Tabela 1. Características clínicas, bioquímicas do controle glicêmico e do *status* de zinco dos indivíduos com DM2..... **61**

Tabela 2. S*tatus* de zinco no plasma, eritrócitos, urina e zinco dietético em relação aos parâmetros insulinêmicos e glicêmicos de indivíduos com DM2..... **64**

BANDEIRA, V.S. **Influência do Polimorfismo Arg325Trp no gene do ZnT8 (*SLC30A8)* no estado nutricional relativo ao zinco de pacientes com diabetes tipo 2 e sua relação com parâmetros glicêmicos e insulinêmicos**. 2015. 94p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

RESUMO

Estudos têm investigado possíveis associações do estado nutricional relativo ao zinco de indivíduos com diabetes e o controle metabólico da doença, e mais recentemente tem-se procurado avaliar a influência do polimorfismo Arg325Trp no gene que codifica para o transportador de zinco 8 (ZnT8) no mecanismo de secreção da insulina. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar a presença desse polimorfismo e associá-lo com o estado nutricional relativo ao zinco de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 e aos parâmetros glicêmicos e insulinêmicos. Este estudo foi de natureza transversal, constituído por 82 pacientes com idades entre 29 e 59 anos, de ambos os gêneros com diagnóstico de diabetes *mellitus* tipo 2, atendidos no Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital da Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Foi realizada a genotipagem do polimorfismo Arg325Trp no gene do ZnT8 e avaliadas as concentrações de zinco no plasma, eritrócitos e urina, a glicemia de jejum, percentual de hemoglobina glicada, resistência à insulina, função das células β e o perfil lipídico. Realizou-se a avaliação da composição corporal por meio da bioimpedância e de medidas antropométricas. A ingestão alimentar foi avaliada por meio do método recordatório de 24 horas aplicado durante 3 dias não consecutivos, incluindo um dia de final de semana. Os resultados mostraram que a maioria dos indivíduos com DM2 encontrava-se com sobrepeso, apresentavam baixas concentrações de zinco nos eritrócitos, elevada excreção urinária e concentrações de zinco no plasma adequadas. Não houve diferença significativa nesses parâmetros quando se considerou os indivíduos de acordo com os genótipos do SNP avaliado. No entanto, ao avaliar os parâmetros de medida do *status* de zinco dos pacientes, aqueles que apresentavam deficiência tinham percentual de hemoglobina glicada mais elevado. Assim sendo, pode-se concluir que o zinco pode favorecer o controle glicêmico. O polimorfismo Arg325Trp no gene *SLC30A8* que codifica para ZnT8 não influenciou o estado nutricional relativo ao zinco e os parâmetros glicêmicos e insulinêmicos dessa população.

Palavras-chave: zinco, diabetes *mellitus* tipo 2, controle glicêmico, polimorfismo Arg325Trp, hemoglobina glicada.

BANDEIRA, V.S. **Polymorphism Arg325Trp the influence on ZnT8 gene (SLC30A8) in the nutritional status of zinc in patients with type 2 diabetes and its relation to glucose and insulinemic parameters**. 2015. 94p. Thesis (MS) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2015.

ABSTRACT

Studies have investigated the possible association of zinc nutritional status of individuals with diabetes and metabolic disease control, and more recently have been made to evaluate the influence of Arg325Trp polymorphism in the gene encoding the zinc transporter 8 (ZnT8) in the mechanism of insulin secretion. The objective of this study was to analyze the presence of this polymorphism and associate it with the nutritional status of zinc in patients with type 2 diabetes mellitus and glucose and insulinemic parameters. This study was cross-sectional nature, consisting of 82 patients aged between 29 and 59 years, of both genders diagnosed with type 2 diabetes mellitus treated at the Endocrinology and Metabolism Clinics of the Hospital of St. University Medical Faculty Service Paulo. Arg325Trp polymorphism genotyping was performed in ZnT8 gene and evaluated zinc concentrations in plasma, erythrocytes and urine, fasting blood glucose, glycated hemoglobin percentage, insulin resistance, β cell function and the lipid profile. There was the assessment of body composition by bioelectrical impedance and anthropometric measures. Dietary intake was assessed using the 24-hour recall method applied for 3 non-consecutive days, including a day of the weekend. The results showed that the majority of subjects with T2DM found to overweight, had low zinc concentration in erythrocytes, high urinary excretion and zinc concentrations in the appropriate plasma. There was no significant difference in these parameters when considering the individuals according to the SNP genotypes evaluated. However, when assessing the zinc status as parameters of patients, those with disabilities had higher percentage of glycated hemoglobin. Thus, it can be concluded that zinc may favor glycemic control. The Arg325Trp polymorphism in the SLC30A8 gene encoding ZnT8 did not influence the nutritional status of zinc and glycemic parameters and insulinemic this population.

Keywords: zinc, diabetes mellitus type 2, Arg325Trp polymorphism, glycated hemoglobina.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Diabetes *Mellitus* tipo 2

O diabetes *mellitus* tipo 2 ou diabetes tipo 2 (DM2) é uma doença metabólica crônica que pode levar a complicações micro e macrovasculares, sendo caracterizada pela hiperglicemia decorrente de falhas na secreção e/ou ação de insulina (SBEM, 2011; ADA, 2015). Dentre os fatores que podem influenciar o desenvolvimento dessa doença estão o estilo de vida (hábitos alimentares inadequados, sedentarismo, tabagismo) e a obesidade, os quais apresentam impacto negativo sobre a qualidade de vida. A predisposição genética também é fator associado ao seu desenvolvimento, porém ainda não totalmente elucidada (ADA, 2015).

Projeções dos números de casos de diabetes no mundo são alarmantes. Segundo Shaw *et al.* (2010) e Chen *et al*. (2012), o número de casos de diabetes no mundo poderá atingir 439 milhões de indivíduos em 2030. As projeções da Organização Mundial da Saúde (OMS) também são preocupantes para o aumento no número de casos de diabetes em todo o mundo (366 milhões de indivíduos), sendo que 90% dos casos serão do tipo 2 da doença (WILD *et al.* 2004; SHAW *et al.*, 2010; CHEN *et al*., 2012). A *International Diabetes Federation* (IDF) apresentou estimativas do número de indivíduos com DM2, considerando que atualmente cerca de 382 milhões de pessoas (40 e 59 anos) ou 8,3% de adultos têm diabetes, de que esse número passaria para 592 milhões de pessoas em 2035 (Figura 1 e 2). Dados apresentados em 2014 mostram que 1 a cada 12 pessoas possui essa doença, com expectativa de aumento mundial para 205 milhões de pessoas em 2035. Para os casos não diagnosticados, a IDF calculou que existem 175 milhões de pessoas (46,3 %) sem o conhecimento de que está com a doença. É grande o número de indivíduos que estão evoluindo para o aparecimento de complicações da doença pela falta do controle metabólico, servindo de alerta futuro para o impacto do diabetes na morbimortalidade desses indivíduos, já que, essa doença causou 5,1 milhões de mortes em todo o mundo nos últimos anos (IDF, 2013; IDF, 2014).

No Brasil, a estimativa do número de indivíduos com a doença é de 12,7 milhões de adultos (idade entre 20-79 anos), colocando-o na 5ª posição dos países

com maior número de pessoas com diabetes em todo o mundo (SHAW *et al.*, 2010). Em 2013, nosso país, apresentou 11,9 milhões de pessoas com essa doença, e a estimativa é de que em 2035, esse número passe para 19,2 milhões de indivíduos (IDF, 2013). Schmidt *et al.* (2011) apontam o aumento da prevalência de diabetes no Brasil, sendo que em 1998 era de 3,3% e em 2008 houve aumento para 5,3%. Esse aumento no número de casos de diabetes no Brasil e no mundo pode ser explicado pelas alterações no estilo de vida dos indivíduos. Por exemplo, a urbanização e a tecnologia estão associadas à redução da prática de atividade física, a qual faz parte dos fatores de risco para desenvolvimento dessa doença. Esse aumento na prevalência do diabetes, bem como o aparecimento de complicações crônicas, faz com que se elevem os custos do tratamento proporcionados pelo governo, principalmente em países em desenvolvimento (CHEN *et al*., 2012).

Figura 1. Número de pessoas com diabetes (20-79 anos) pela *International Diabetes Federation*, 2013. Legenda: M = milhões.

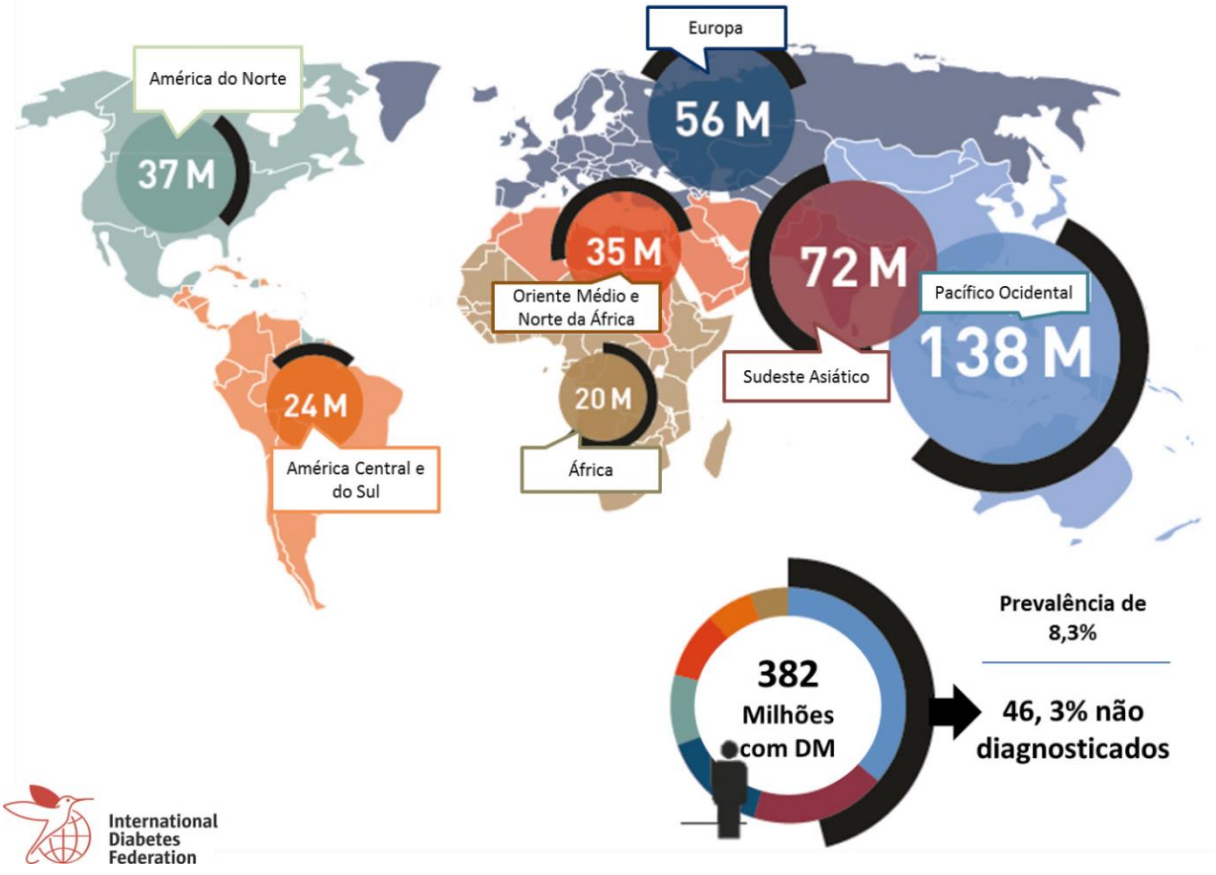


Figura 2. Regiões e projeções globais do número de pessoas com diabetes (20-79 anos), 2013 e 2035 pela IDF (2013).

REGIÕES (IDF)	2013 Milhões	2035 Milhões	Aumento %
África	19.8	41.4	109%
Oriente Médio e Norte da África	34.6	67.9	96%
Sudeste da Ásia	72.1	123	71%
América Central e do Sul	24.1	38.5	60%
Pacífico Ocidental	138.2	201.8	46%
América do Norte e Caribe	36.7	50.4	37%
Europa	56.3	68.9	22%
Mundo	**381.8**	**591.9**	**55%**

O diagnóstico do diabetes é realizado por meio de exames como: glicemia de jejum (jejum de no mínimo 8 horas), teste oral de tolerância à glicose (TOTG), e hemoglobina glicada, sendo este último ainda muito discutido quanto à questão de parâmetro para diagnostico, no entanto, considerado ótimo para controle metabólico, uma vez que reflete as concentrações de glicose pregressa (aproximadamente 2 a 4 meses anteriores a realização do teste). Para compor esse controle, existe outro método muito eficaz, a determinação de frutosamina, esta análise reflete o controle glicêmico de 1 a 2 semanas anterior à dosagem do sangue do indivíduo para avaliação. A Associação Americana de Diabetes (2015) adotou os valores de referência do Comitê de Especialistas em Diagnóstico e Classificação do Diabetes *Mellitus* (1997 e 2003) que considerou os critérios para diagnóstico do diabetes a: glicemia de jejum ≥126 mg/dL, o teste oral de tolerância a glicose ≥ 200 mg/dL após 2h de sobrecarga de 75g de glicose e a hemoglobina glicada ≥ 6,5% (GROSS *et al*., 2002; INTERNATIONAL EXPERT COMMITTEE, 2009; ADA, 2015).

O DM2 é uma doença complexa e multifatorial, em estado de hiperglicemia o indivíduo pode ter alterações patológicas e funcionais em vários tecidos, sem demonstrar sintomas clínicos. O diabetes quando não controlado pode causar a hiperglicemia ou hipoglicemia e como consequência levar o indivíduo ao coma. As

complicações da hiperglicemia ocorrem em longo prazo e os órgãos mais atingidos são: olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos, que podem levar a complicações sistêmicas como: a aterosclerose, microangiopatia, nefropatia, retinopatia e neuropatia diabética, infecções, e complicações metabólicas como a cetoacidose diabética (KANGRALKAR *et al*., 2010; SBD, 2014; ADA, 2015).

Com vistas ao controle glicêmico de pacientes com DM2, a adequação do peso corporal, prática de atividade física, terapia nutricional e uso de antidiabéticos orais favorecem esse controle. A Sociedade Brasileira de Diabetes (2014) preconiza que o tratamento nutricional é um importante aspecto na terapia de pacientes com DM2, e estabelece que a nutrição equilibrada seja aquela que recomenda concentrações adequadas de macronutrientes e micronutrientes, prescritos de forma individualizada baseando-se no valor energético total (VET) estabelecido para o indivíduo e de acordo com os objetivos do tratamento, lembrando que a recomendação dietética segue aquelas definidas pela população em geral, de acordo com a sua faixa etária (SBD, 2014).

A adequação dos macronutrientes é de fato importante para o controle glicêmico. O controle da homeostase da glicose é bem regulado, e ocorre logo após o consumo de uma refeição, em situações de normalidade. Esse controle previne a hiperglicemia crônica, entre outros aspectos metabólicos (VALLE, 2002; HUANG; CZECH, 2007).

No fígado, a glicose se encontra armazenada na forma de glicogênio, e de acordo com a necessidade fisiológica do organismo ela vai sendo liberada pela corrente sanguínea para sua utilização (RAW, 2006; HAATAJA *et al.,* 2013).

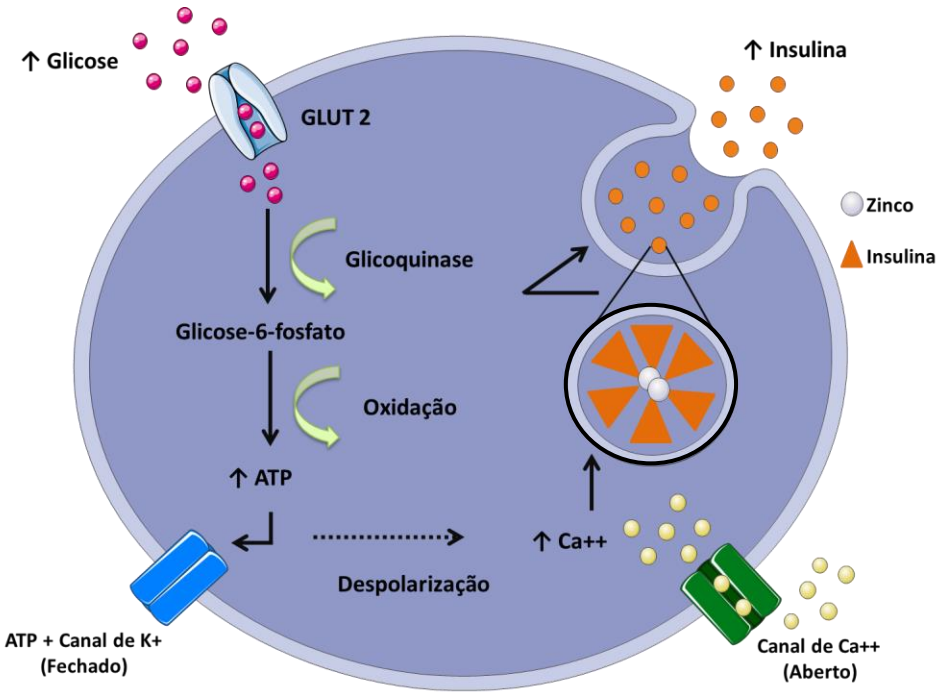
Nesse contexto metabólico, a insulina possui papel central, pois é o principal hormônio responsável pela homeostase da glicose, visto que exerce efeito regulador em quase todas as células do corpo, tendo sua ação mais pronunciada no músculo, tecido adiposo e fígado (GUYTON e HALL, 2006; MURROW; HOEHN, 2010).

A descoberta desse hormônio hipoglicemiante ocorreu em 1921 em Toronto por Banting et al. (1922). O mecanismo de secreção da insulina foi sendo elucidado com o passar dos anos. A síntese da insulina é realizada pelas células β do pâncreas com o intuito de atender as demandas metabólicas diárias do

organismo. Inicia-se com a transcrição do gene que codifica para esse hormônio e da tradução da proteína formando a pré-pró-insulina por meio de ribossomos ligados ao retículo endoplasmático rugoso. Esta é clivada e forma a pró-insulina que é transportada para o aparelho de Golgi e armazenada nos grânulos de secreção imaturos, os quais são convertidos posteriormente em insulina madura, formando 6 moléculas de insulina revestida de grânulos secretores com 2 átomos de zinco (6:2), sua forma biologicamente ativa, e o peptídeo C pela ação das enzimas pró hormônio convertase 1 e 2 (PC1 e PC2) e da exoprotease carboxipeptidase E, que são enzimas dependentes de zinco. O fornecimento de zinco inadequado para estas enzimas ao longo da via secretora pode ter impacto negativo sobre a conversão de pró-insulina em insulina levando ao aumento na liberação de pró-insulina no sangue após estimulação de glicose. A insulina madura pode ficar armazenada até ser utilizada ou degradada (GUYTON e HALL, 2006; HUANG; CZECH, 2007; LEMAIRE; CHIMIENTI; SCHUIT, 2012; CHIMIENTI, 2013; HAATAJA *et al.,* 2013).

O processo de secreção de insulina ocorre por meio do estímulo advindo do aumento da glicose na corrente sanguínea, em que ativa os transportadores de glicose (GLUT 1 e 2), entretanto, esta via de absorção de glicose não é linear, a glicose permeia a membrana plasmática da célula beta, e assim que os transportadores são ativados aumentam o fluxo de glicose para dentro da célula, em seguida ela é fosforilada pela glicoquinase e fica na forma de glicose-6-fosfato, que é oxidada e transformada em trifosfato de adenosina (ATP). A formação do ATP inibe a abertura dos canais de potássio tornando a membrana celular despolarizada, e como consequência, os canais de cálcio se abrem estimulando a secreção de insulina, com dois íons de zinco, por meio da exocitose (Figura 3) (GUYTON e HALL, 2006; LEMAIRE; CHIMIENTI; SCHUIT, 2012; CHIMIENTI, 2013).

Figura 3. Mecanismo de estímulo da secreção de insulina associado ao zinco pelas células β do pâncreas por meio da concentração extracelular de glicose (Adaptado de Guyton, 2006). **Legenda:** ATP: Trifosfato de Adenosina; Ca++: Cálcio; K+: Potássio; GLUT2: Transportador de glicose 2.



A insulina secretada se liga a célula alvo, por meio do receptor de insulina (IR), essa ligação se auto-fosforila e promove o recrutamento da proteína substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1), que ativado, estimula a ligação de proteínas como a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) que se liga ao IRS-1 fosforilado e passa por uma mudança conformacional gerando um aumento da produção e atividade dessas proteínas na membrana plasmática (MURROW; HOEHN, 2010).

A entrada de glicose na célula ocorre por meio do estímulo da secreção de insulina descrito acima, em que sinaliza a translocação de proteínas transportadoras de glicose (GLUT4) do interior das células para a superfície, permitindo a entrada de glicose no citosol da célula (HUANG; CZECH, 2007).

1.2 Zinco

O zinco é um mineral que foi elucidado como essencial para a nutrição humana em 1960 no Egito, quando adolescentes apresentaram nanismo devido à deficiência deste elemento (PRASAD, 1991). É o elemento intracelular mais abundante e atua como componente estrutural de proteínas ou cofator enzimático em mais de 300 reações enzimáticas. O zinco encontra-se distribuído principalmente nos músculo, osso, pele e fígado (TAPIERO e TEW, 2003; IZiNCG, 2004; TAMAKI e FUJITANI, 2014).

No entanto, o conteúdo total de zinco varia de acordo com o tipo de célula. Nas células β pancreáticas encontram-se as maiores concentrações de zinco de todo o organismo, com valores estimados entre 10 e 20 nmol/L no espaço celular, especificamente nas vesículas de insulina. Ressalta-se para melhor compreensão, que o organismo humano não possui estoque desse mineral, sendo necessário a sua ingestão diária para que suas funções sejam realizadas adequadamente (LEMAIRE; CHIMIENTI; SCHUIT, 2012; DAVIDSON, WENZLAU; O'BRIEN, 2014). A relação que se pode estabelecer entre o estado nutricional dos indivíduos quanto ao zinco e o DM2 é por meio da participação desse mineral na síntese, no armazenamento e na secreção de insulina pelas células β do pâncreas (CHIMIENTI, 2013).

Funcionalmente, o zinco possui propriedades catalítica, estrutural e regulatória. Desta forma, seu papel em mecanismos para reduzir o estresse oxidativo e melhorar a resposta imunológica vem sendo estudado. Está bem estabelecido seu papel na redução de radicais livres altamente reativos por ação da enzima superóxido dismutase e, assim, promove proteção às estruturas biológicas (STEFANIDOU et al., 2006; KING, 2011). Quanto a sua função catalítica, o zinco está envolvido em processos enzimáticos que controlam os mecanismos celulares, como exemplos destes processos estão à síntese de DNA, desenvolvimento cerebral e crescimento normal. Estruturalmente, o zinco determina a forma espacial de proteínas, facilitando o dobramento de moléculas que se tornam biologicamente ativas, denominadas como dedos de zinco. Na função regulatória, o zinco possui papel essencial nos processos biológicos, como

a regulação gênica de metaloproteínas, um exemplo clássico é a expressão da metalotioneína (STEFANIDOU et al., 2006; TUERK e FAZEL, 2009).

O estado nutricional de indivíduos relativo ao zinco quando comprometido pode estar associado também ao desenvolvimento de várias doenças relacionadas com a resposta imunológica. Esse mineral é um dos responsáveis pelo desenvolvimento e funções de neutrófilos, células natural *killer* (NK), maturação dos linfócitos T e produção de citocinas. Na deficiência, há o aumento de citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas: IL-1β, IL-6, IL-8 e o fator de necrose tumoral-α (TNF-α), como também a redução da atividade das células natural *killer*. A IL-12, dependente de zinco, e o interferon-γ (IFN-γ) são produzidos por macrófagos. Na inflamação, as interleucinas se encontram aumentadas estimulando assim a captação do zinco do plasma para o fígado e eritrócitos (MOCCHEGIANI *et al.,* 2000; KOURY e DONANGELO, 2003; PRASAD, 2009).

A deficiência de zinco é comumente observada tanto nos países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento, e como consequência pode favorecer o desenvolvimento do diabetes *mellitus*, uma vez que a sua deficiência pode afetar a secreção de insulina. Pesquisas conduzidas em pacientes com DM2 mostraram que estes se apresentam deficientes em zinco, quando avaliada a concentração no plasma, associado a isso, na hiperglicemia esses indivíduos possuem excreção urinária aumentada, processo descrito como hiperzincúria (MARREIRO *et al.,* 2007; JANSEN *et al.,* 2009; TAMAKI e FUJITANI, 2014).

Mundialmente, a inadequação na ingestão de zinco é em cerca de 20% da população. A principal explicação para essa prevalência é o baixo consumo de alimentos fontes de zinco, além de processos de má absorção decorrentes de alterações metabólicas e genéticas, presença da doença de Crohn, acrodermatite enteropática, doença renal e cirrose hepática. A deficiência grave de zinco causa retardo no crescimento, dermatite pustular, hipogonadismo, alopecia, diarreia, perda de peso, letargia mental, redução do apetite, alterações neuro-sensoriais, dentre outros (BROWN, *et al*. 2004; FLEKAC *et al.,* 2008; PRASAD, 2009; LEMAIRE; CHIMIENTI; SCHUIT, 2012).

Neste contexto, é preciso entender a biodisponibilidade do zinco. A presença do fitato (hexafosfato de mioinositol) na dieta e a competição pelo

mesmo sítio de absorção entre o zinco, o ferro e o cobre, podem prejudicar sua biodisponibilidade. No caso do fitato, este se liga ao zinco formando complexos menos solúveis, prejudicando a sua absorção. No entanto, as proteínas dietéticas mostram efeitos positivos por aumentar a biodisponibilidade do zinco. Ressalta-se que muitos alimentos proteicos também são ricos em zinco (KREBS, 2000; ADAMS *et al.,* 2002). A ingestão dietética recomendada de zinco para população saudável foi baseada em perdas basais e *turnover* dos *pools* de zinco endógeno, sendo a recomendação de 11,0 mg/dia para homens adultos e 8,0 mg/dia para mulheres adultas, com idades entre 19 e 70 anos (IOM, 2001). O zinco está disponível tanto em fontes vegetais quanto em animais, a carne vermelha, mariscos, cereais integrais e leguminosas fornecem maiores concentrações de zinco (GIBSON, 1994; IOM, 2001). O entendimento da biodisponibilidade de zinco está relacionado com aspectos da sua absorção, transporte e utilização.

Na digestão, íons de zinco são liberados a partir dos alimentos, e estes se deslocam até o lúmen intestinal. A absorção do zinco ocorre principalmente no intestino delgado, tendo absorção mínima pelo estômago. Nos enterócitos, especificamente na superfície da borda em escova, a captação de zinco ocorre por diferentes mecanismos, seja os que envolvem transportadores ou por difusão simples quando elevadas concentrações desse elemento são provenientes da dieta. Dentro dos enterócitos, o zinco é regulado por duas proteínas: a proteína intestinal rica em cisteína (CRIP), que na deficiência de zinco tem a função carreadora intracelular, e a metalotioneína, que é uma proteína constituída de 60 a 68 aminoácidos e 7 átomos de zinco, os quais estão ligados a moléculas de cisteína, essa proteína regula a ligação do zinco com a CRIP aumentando a velocidade de absorção desse mineral. Depois da etapa de absorção, o zinco é liberado na circulação portal ligado à albumina e captado pelo fígado, em seguida distribuído aos outros tecidos para desempenhar suas funções. A principal forma de excreção do zinco é por meio das fezes, no entanto, há perdas pela urina, células epiteliais, suor, sêmen, cabelo e menstruação. O controle da absorção e da excreção do zinco endógeno permite a manutenção equilibrada deste mineral no organismo (TAPIERO e TEW, 2003; LIUZZI e COUSINS, 2004; IZiNCG, 2004;TUERK e FAZEL, 2009; KING, 2011; MARREIRO, 2013).

1.3 Zinco, Diabetes e Transportador de zinco 8

Após a descoberta da insulina, Scott e Fisher (1935) propuseram uma possível relação entre o zinco e a síntese de insulina, pois verificaram que em pâncreas de indivíduos com diabetes a quantidade de zinco era metade das concentrações encontradas em indivíduos saudáveis. A partir deste estudo muitos outros buscaram elucidar melhor a participação do zinco na fisiologia da síntese, armazenamento e secreção de insulina. Sabe-se que são encontradas altas concentrações de zinco dentro das ilhotas pancreáticas e quando ocorre o processo de cristalização da insulina dentro do grânulo, este hormônio é associado ao zinco formando hexâmetros que são liberados na corrente sanguínea após o estímulo de secreção, por isso o zinco torna-se essencial para o correto processamento e secreção da insulina (RUZ *et al.,* 2013).

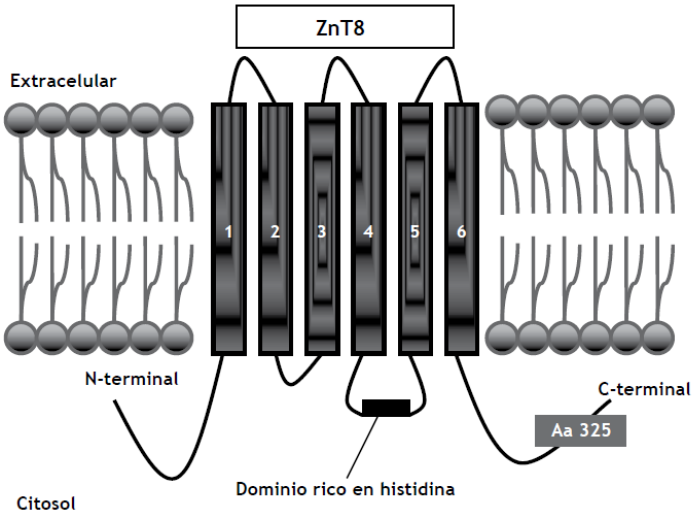
Em 1968, um estudo verificou que a massa de células beta encontrava-se reduzida na deficiência de zinco (BOQUIST *et al.,* 1968). Outro estudo realizado com camundongos mostrou que uma dieta deficiente em zinco piorou a hiperglicemia e reduziu a insulina circulante (SIMON e TAYLOR, 2001).

Os mecanismos da relação do zinco com o diabetes ainda não foram totalmente esclarecidos, por isso a identificação e papel dos transportadores de zinco (ZnTs) se tornam importantes (RUZ *et al.,* 2013). Acredita-se na interação desses transportadores com a metalotioneína, que no caso do zinco transfere-o para os ZnTs (SEKLER *et al.,* 2007). Estes transportadores têm atribuições transmembranares e são representadas por duas famílias transportadoras de zinco (SLC) denominadas de ZnT (SLC30) e de Zip (SLC39), responsáveis pela homeostase celular desse mineral. Em humanos, existem dez transportadores ZnT (1-10) e quatorze transportadores Zip. O ZnT tem o papel de reduzir a concentração de zinco intracelular, transportando o mineral do citoplasma para fora da célula ou para vesículas intracelulares. O Zip, age de forma contrária ao ZnT (CHIMIENTI *et al.,* 2004; TUERK e FAZEL, 2009; VALENZUELA *et al.,* 2012).

Palmiter e Findley (1995) descreveram o transportador de zinco 8 (ZnT8) como uma proteína contendo seis domínios transmembranares, entre a quarta e a quinta hélice, no qual há um domínio rico em histidina (local que o zinco se liga), e em

suas extremidades possui um terminal carboxilo (C-terminal) e na outra um terminal amino (N-terminal), visto que o seu funcionamento é caracterizado pelo transporte do zinco do citosol para o meio extracelular (Figura 4) (FIGUEREDO, 2011).

Figura 4. Estrutura do ZnT8 (Figueiredo, 2011).



Chimienti *et al.* (2004 e 2006) realizaram estudos tanto em animais quanto em humanos e descobriram que a expressão de ZnT8 *(SLC30A8*) é específica das células β pancreáticas, o gene deste transportador está localizado no cromossomo 8, região 8q24.11. O ZnT8 é encontrado na membrana das vesículas secretoras de insulina. Ao longo dos anos, tem-se estudado a depleção de zinco nas células β relacionada com apoptose. O estresse oxidativo nessas células pode ser induzido por essa depleção de zinco, e este mineral é conhecido como um potente inibidor de apoptose. Portanto, células deficientes nesse mineral são menos capazes de se defenderem contra o estresse oxidativo, destacando-se assim as propriedades antioxidantes do zinco na proteção do pâncreas contra os danos provocados pelo estresse oxidativo, principalmente no desenvolvimento do diabetes (CHIMIENTI *et al.,* 2004; CHIMIENTI *et al.,* 2006).

O ZnT8, por apresentar essa especificidade no pâncreas, torna-se uma das principais proteínas para a secreção de insulina, pois regula a homeostase de zinco, sendo essencial para o armazenamento e secreção desse hormônio (CHIMIENTI *et al.,* 2013). Para consolidar essas afirmações, Lefebvre *et al*. (2012)

investigaram a depleção de zinco na expressão gênica do ZnT8 nas ilhotas pancreáticas, e verificaram que a expressão deste transportador foi reduzida e isto resultou em alterações na secreção de insulina quando induzida pela glicose. Já em culturas de células, observou-se que a superexpressão do ZnT8 aumentou o teor de zinco celular melhorando a secreção de insulina em condições de hiperglicemia. Assim, sugere-se que o ZnT8 possua papel importante na via de secreção de insulina, podendo ser um alvo de estudos para possíveis tratamentos do DM2 (CHIMIENTI *et al.,* 2006).

Avanços científicos em estudos com genética mostram variações de genes relacionados a doenças, como o diabetes. Muitos desses estudos têm tentado esclarecer o papel exato do ZnT8 na sinalização de insulina. Recentemente, Flannick *et al*. (2014) realizaram a genotipagem em aproximadamente 150 mil indivíduos e observaram que variantes mutantes relacionavam-se com a perda de função no gene *SLC30A8* que codifica para o ZnT8*,* estando associado com redução de 65% do risco para DM2, porém apontando o contrário do observado por outros estudos. O grupo de pesquisa sugere que a inibição do ZnT8 pode ser uma estratégia terapêutica para tratar o DM2.

Estudos com humanos têm mostrado que quando há uma pequena redução da atividade e função do ZnT8, ela pode ser deletéria, no entanto, reduções substancias podem ser protetoras. Ao contrário dos estudos com animais, uma baixa atividade desse transportador contribui progressivamente para redução na secreção da insulina. Portanto, observam-se controvérsias quando se trata da proteção ou não desse transportador em relação ao desenvolvimento de DM2 (CHIMIENTI *et al.,* 2006; NICOLSON *et al.,* 2009; FU *et al.,* 2009; CAUCHI *et al.,* 2010; RUTTER e CHIMIENTI, 2014).

1.4 Polimorfismo Arg325Trp (rs13266634)

A existência de polimorfismos no gene *SLC30A8* que codifica para o ZnT8 pode influenciar o mecanismo de secreção da insulina. O polimorfismo Arg325Trp (rs13266634) no gene desse transportador tem sido associado ao menor risco de desenvolvimento do DM2 (CHIMIENTI, 2013; MARATHUR e MITCHELL, 2014).

É considerado um polimorfismo quando o alelo mais comum entre eles ocorre em menos de 99% da população em geral e o alelo variante, contudo, ocorre em mais de 1% da população avaliada. Então, define-se polimorfismo como a principal variação no código genético em que uma única base é substituída por outra. Polimorfismos deste tipo são denominados de polimorfismos de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphisms* – SNP). Os SNPs têm contribuído para o esclarecimento biológico dos fatores que podem prever o risco do desenvolvimento de certas doenças, e estudos de nutrigenética vem mostrando associações interessantes desses SNPs com o consumo de nutrientes. Essas descobertas serão importantes para promover o tratamento individual e reduzir o risco de doenças (KAUWELL, 2005; CHIMIENTI, 2013; MARUTHUR e MITCHELL, 2014).

Neste SNP, especificamente, ocorre a troca da base citosina (C) pela timina (T), no final do éxon (SLC30A8) formando o aminoácido triptofano ao invés de uma arginina na posição 325 (CHIMIENTI, 2013; MARUTHUR e MITCHELL, 2014). Em 2007, esse SNP foi descoberto em um estudo de associação do genoma (GWAS), mostrando que o alelo de risco é o C, e este, está fortemente associado com o desenvolvimento do DM2. Com este achado, sugeriram novas expectativas para as abordagens clínicas desta doença (SLADEK *et al.,* 2007*).*

Vários estudos já determinaram a frequência desse polimorfismo em diferentes populações e confirmaram que portadores do alelo C apresentaram elevado risco para DM2 (Tabela 1 e 2). Em uma meta-analise composta por 27 estudos para avaliar a associação do polimorfismo Arg325Trp do gene *SLC30A8* com o DM2 e em outra realizada por Cauchi *et al*. (2010), incluindo 32 artigos originais, em que estudaram o mesmo SNP e gene, foi verificada a mesma associação para asiáticos e europeus, no entanto, não observaram tal resultado em africanos (JING *et al*., 2011).

Com o intuito de comparar indivíduos com DM2 com aqueles sem a doença, Faghih *et al.* (2014) investigaram a associação entre o SNP Arg325Trp no gene *SLC30A8* de moradores da província de Fars, sul do Irã, onde a frequência entre os genótipos CC em pacientes diabéticos foi de 59,6% e grupo controle de 57,4%; CT foi de 33,8% no grupo caso e 31,6% no controle; TT foi de 6,6% e 11%

no pacientes com diabetes e grupo controle, respectivamente. Não encontrando diferença significativa entre os grupos em relação à distribuição alélica e genotípica.

Tabela 1. Estudos com a frequência do polimorfismo (rs13266634) que codifica para o gene *SLC30A8* (ZnT8) em Asiáticos com DM2.

Distribuição do genótipo	**Lee *et al.*, 2008 (Coreia) n=908**	**Omori *et al.*, 2008 (Japão) n=1614**	**Sanghera *et al.*, 2008 (Índia) n=532**	**Tabara *et al.*, 2009 (Japão) n=493**
CC (%)	**36**	**40**	**54**	**33**
CT (%)	**50**	**46**	**37**	**52**
TT (%)	**14**	**14**	**9**	**15**

Tabela 2. Estudos com a frequência do polimorfismo (rs13266634) que codifica para o gene *SLC30A8* (ZnT8) em Europeus com DM2.

Distribuição do genótipo	**Sladek *et al.*, 2007 (França) n=2562**	**Zeggini *et al.*, 2007 (Reino Unido) n=1550**	**Scott *et al.*, 2007 (Finlândia) n=2342**	**Cauchi *et al.*, 2008 (França) n=828**
CC (%)	**56**	**51**	**38**	**43**
CT (%)	**37**	**41**	**47**	**44**
TT (%)	**7**	**8**	**15**	**13**

Na Europa, estudo com 846 indivíduos não-diabéticos que eram parentes de diabéticos, foi verificada a frequência e a associação do SNP Arg325Trp com o desenvolvimento do DM2 após administração de glicose intravenosa, tendo-se concluído que o alelo de risco C pode ser um dos fatores causadores da alteração na função das células β pancreáticas e da ação da insulina (Tabela 3) (BOESGAARD *et al.,* 2008). Da mesma forma, outro estudo realizado com 150 alemães saudáveis, observou que o alelo C do SNP Arg325Trp foi associado com a redução da secreção de insulina, após administração da glicose intravenosa (STAIGER *et al.,* 2007).

Tabela 3. Distribuição do genótipo (rs13266634) do gene *SLC30A8* e da frequência do alelo de risco C em europeus não diabéticos que eram parentes de indivíduos com DM2.

Distribuição do genótipo	Sueco (n=100)	Italiano (n=109)	Dinamarquês (n=271)	Finlandês (n=217)	Alemão (n=149)
CC (%)	**43**	**63**	**47**	**34**	**52**
CT (%)	**48**	**34**	**38**	**45**	**38**
TT (%)	**9**	**3**	**5**	**21**	**10**

BOESGAARD *et al.,* 2008.

Kang *et al.* (2008) investigaram a associação entre variações genéticas do SNP Arg325Trp no gene *SLC30A8* de pacientes com diabetes pós transplantados renais e indivíduos não transplantados, e observaram que a frequência deste polimorfismo foi de 33,8% nos pacientes portadores do genótipo CC, de 26,8% em pacientes com CT, e 19,8% em pacientes com o genótipo TT. Verificaram que pacientes com pelo menos um alelo T apresentaram redução do risco de desenvolver diabetes pós-transplante. Logo após, um estudo realizado com chineses, o qual tinha como objetivo investigar a associação do gene *SLC30A8* com o diabetes do tipo 2, observaram que indivíduos homozigotos com o alelo de risco C tiveram redução na secreção de insulina (XIANG *et al*. 2008).

Recentemente, Maruthur *et al.* (2015) publicaram os primeiros dados experimentais sobre o efeito da suplementação de zinco em indivíduos não diabéticos de acordo com o genótipo do SNP Arg325Trp no gene *SLC30A8.* Os resultados mostraram que a suplementação parece afetar a resposta precoce da insulina naqueles indivíduos que apresentam alelo variante, podendo ser benéfica para a prevenção e/ou tratamento do diabetes.

Considerando a importância do zinco na nutrição humana e sua relação com os mecanismos da secreção de insulina, e, que pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 possuem alteração na homeostase desse mineral, a avaliação do genótipo de pacientes com DM2 quanto a presença do SNP Arg325Trp no gene *SLC30A8* que codifica para o ZnT8, pode ser importante para a conduta de tratamento desses pacientes.

1.5 Referências

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes care**, v. 36, supl.1, p. S67-S74, 2015.

ADAMS, C.L.; HAMBIDGE, M.; RABOY, V.; JOHN, A.D.; SIAN, L.; WESTCOTT, J.L.; KREBS, E. N. F. Zinc absorption from a low-phytic acid maize. **Am J Clin Nutr**, v.76, p.556-559, 2002.

BANTING, F.G.; BEST, C.H.; COLLIP, J.B. et al. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. Can Med Assoc J, v.12, p.141–146, 1922.

BOESGAARD, T. W.; ŽILINSKAITĖ, J.; VÄNTTINEN, M.; LAAKSO, M.; JANSSON, P.-A; HAMMARSTEDT, A.; SMITH, U.; STEFAN, N.; FRITSCHE, A.; HÄRING, H.; HRIBAL, M.; SESTI, G.; ZOBEL, D. P.; PEDERSEN, O.; HANSEN, T. FOR THE EUGENE 2 CONSORTIUM. The common SLC30A8 Arg325Trp variantis associated with reduced first-phase insulin release in 846 non-diabetic off spring of type 2 diabetes patients — the EUGENE2 study. **Diabetologia,** v.51, p.816–820, 2008.

BOQUIST, L.; FALKMER, S.; HAVU, N.; PIHL, E. Insulin biosynthesis, storage and secretion. **Lakartidningen**, v.65, p.3603-3607, 1968.

BROWN, K.H.; RIVERA, J.A.; BHUTTA, Z.; GIBSON, R.S.; REI, J.C.; LÖNNERDAL, B.; RUEL, M.T.; SANDTRÖM, B.; WASANTWISUT, E.; HOTZ, C. International Zinc Nutrition Consultative Group (IZiNCG) technical document #1. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. **Food Nutr Bull.,** v.25, n.1, p.99-203, 2004.

CAUCHI, S.; MEYRE, D.; DURAND, E.; PROENC, A. C.; MARRE, M.; HADJADJ, S. et al. Post genome-wide association studies of novel genes associated with type 2 diabetes show gene-gene interaction and high predictive value. **PLoS One**, v.3, p.2031. 2008.

CAUCHI, S. et al. Meta-analysis and functional effects of the SLC30A8 rs13266634 polymorphism on isolated human pancreatic islets. **Mol. Genet. Metab.** V.100, p.77–82, 2010.

CHEN, L; MAGLIANO, D. J.; ZIMMET, P. Z. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus—present and future perspectives. **Nat. Rev. Endocrinol**. V.8, p.228–236, 2012.

CHIMIENTI, F. Zinc, pancreatic islet cell function and diabetes: new insights into an old story. **Nutrition Research Reviews** v.26, p.1–11, 2013.

CHIMIENTI, F.; DEVERGNAS, S.; FAVIER, A.; SEVE, M. Identification and Cloning of a β-Cell–Specific Zinc Transporter, ZnT-8, Localized Into Insulin Secretory Granules. **DIABETES.** V.53, 2004.

CHIMIENTI, F.; DEVERGNAS, S.; PATTOU, F.; SCHUIT, F.; GARCIA-CUENCA, R.; VANDEWALLE, B.; KERR-CONTE, J.; LOMMEL, L. V.; GRUNWALD, D.; FAVIER, A.; SEVE, M. In vivo expression and functional characterization of the zinc transporter ZnT8 in glucose-induced insulin secretion. **Journal of Cell Science.**, V.119, N.20, 2006.

DAVIDSON, H. W.; WENZLAU, J. M.; O'BRIEN, R. M. Zinc transporter 8 (ZnT8) and b cell function. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.20, p.1–10, 2014.

FAGHIH, H.; KHATAMI, S.; AZARPIRA, N.; FOROUGHMAND, A. SLC30A8 gene polymorphism (rs13266634 C/T) and type 2 diabetes mellitus in south Iranian population. **Mol Biol Rep,** v. 41, p.2709–2715, 2014.

GROSS, J. L.; SILVEIRO, S. P.; CAMARGO, L. J.; AZEVEDO, M. J. Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico**. Arq Bras Endocrinol Metab.** v.46 n.1, 2002.

FIGUEREDO, C. P.; POSKUS, E. El transportador de zinc 8: repercusiones de su polimorfismo en la diabetes tipo 2, y en las variantes tipo 1/LADA. **Rev. Soc. Arg. de Diabetes**, v. 45, n.2, 2011.

FLANNICK, J et al. Loss-of-function mutations in SLC30A8 protect against type 2 diabetes. **Nature Genetics**, v.46, p.357–363, 2014.

FLEKAC, M.; SKRHA, J.; HILGERTOVA, J.; LACINOVA, Z.; JAROLIMKOVA, M. Gene polymorphisms of superoxide dismutase and catalase in diabetes mellitus, **BMC Med Genet,** v.9, n.30, 2008.

FU, Y.; TIAN, W.; PRATT, E.B.; DIRLING, L.B.; SHYNG, S.L.; MESHUL, C.K. & COHEN, D.M. Down-regulation of ZnT8 expression in INS-1 rat pancreatic b cells reduces insulin content and glucose-inducible insulin secretion. **PLoS ONE,** v.4, p. 5679, 2009.

GIBSON, R.S. Zinc nutrition in developing countries. **Nutr Res Rev**., v.7, p.151-173, 1994.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Insulina, glucagon e diabete melito. **InTratado de fisiologia Medica.** Elsevier, 11ª edição, p.967-68, 2006.

HAATAJA, L.; SNAPP, E.; WRIGHT, J.; LIU, M; HARDY, A.B.; WHEELER, M.B.; MARKWARDT, M.L.; RIZZO, M.; ARVAN, P. Proinsulin Intermolecular Interactions during Secretory Trafficking in Pancreatic Cells, **The Journal of Biological Chemistry,** v.288, n. 3, p. 1896–1906, 2013.

HUANG, S.; CZECH, M.P. The GLUT4 glucose transporter. **Cell Metab**. V.5, n.4, p.237-52, 2007.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Diabetes Atlas Sixth edition, p. 1-160, 2013*. Online version of IDF Diabetes Atlas: www.idf.org/diabetesatlas*

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF** Diabetes Atlas Sixth edition, p. 1-10, 2014.

INTERNATIONAL EXPERT COMMITTEE. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. **Diabetes Care**, v. 32, p. 1327–1334, 2009.

International Zinc Nutrition Consultative Group **(IZiNCG).** Assessment of the Risk of Zinc Deficiency in populations and Options for Its Control. Food and Nutrition Bulletin, v. 25, n. 1 suppl. 2, 2004.

JANSEN, J.; KARGES, W.; RINK, L. Zinc and diabetes - Clinical links and molecular mechanisms. **Journal of Nutritional Biochemistry.,** v. 20, p.399–417, 2009.

JING, Y.L.; SUN, Q.M.; BI, Y.; SHEN, S.M.; ZHU, D.L. SLC30A8 polymorphism and type 2 diabetes risk: Evidence fron 27 study groups. **Nutririon, Metabolism e Cardiovascular Diseases**, v.21, p. 398-405, 2011.

KANGRALKAR, V. A.; PATIL, S. D.; BANDIVADEKAR, R. M. Oxidative Stress And Diabetes: A Review. **International Journal of Pharmaceutical Applications.** v. 1, n.1, p. 38-45, 2010.

KANG, E. S.; KIM, M. S.; KIM, Y. S.; HOON, C. K.; HAN, S. J.; CHUN, S. W.; HUR, K. Y.; NAM, M. C.; AHN, C. W.; CHA, B. S.; KIM, L. I.; LEE, H. C. Polymorphism in the Zinc Transporter Gene SLC30A8 Confers Resistance Against Post transplantation Diabetes Mellitus in Renal Allograft Recipients. **Diabetes**., v. 57 n. 4, P. 1043-1047, 2008.

KAUWELL, G. P. A. Emerging concepts in nutrigenomics: a preview of what is to come. Nutrition in Clinical Practice, v. 20, n. 1, p. 75-87, 2005.
KING, J.C. Zinc: an essential but elusive nutrient. **Am J Clin Nutr.,** v. 94, suppl, 679S–84S, 2011.

KOURY, J.C.; DONANGELO, C.M. Zinc, Immunity, Nutrition and Exercise. **Rev Nutr**. V.16, n.4, p.433-41, 2003.

KREBS, N. F. Overview of Zinc Absorption and Excretion in the Human Gastrointestinal Tract. **J. Nutr.**, v. 130, p. 1374S-1377S, 2000.

LEE, YH.; KANG, E.S.; KIM, S.H.; HAN, S.J; KIM, C.H.; KIM, H.J. et al. Association between polymorphisms in SLC30A8, HHEX, CDKN2A/B, IGF2BP2, FTO, WFS1, CDKAL1, KCNQ1 and type 2 diabetes in the Korean population. **J Hum Genet**, v.53, p.991-8, 2008.

LEMAIRE, K.; CHIMIENTI, F.; SCHUIT, F. Zinc transporters and their role in the pancreatic b-cell. **Journal of Diabetes Investigation,** v..3, n. 3, 2012.

LEFEBVRE, B. et al. Regulation and functional effects of ZNT8 in human pancreatic islets. **Journal of Endocrinology**, v. 214, p.225–232, 2012.

LIUZZI, J. P.; COUSINS, R. J. Mammalian zinc transporters. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 24, p. 151-172, 2004.

MARREIRO, D. N. Zinco. COZZOLINO, S. M. F. e COMINETTI, C. In Bases Bioquímicas e Fisiológicas da Nutrição. Barueri, SP. **Editora Manole**, 1ª Edição, 2013.

MARREIRO, D.N.; MARTINS, M.P.S.C.; SOUSA, S.S.R.; IBIAPINA, V.; TORRES, S.; PIRES, L.V.; NOGUEIRA, N.N.; LIMA, J.M.C.; MONTE, S.J.H. Urinary Excretion of Zinc and Metabolic Control of Patients with Diabetes Type 2. **Biol Trace Elem Res.,** V.120, p.42–50, 2007.

MOCCHEGIANI, E.; MUZZIOLI, M.; GIACCONI, R. Zinc and immunoresistance to infection in aging: new biological tools. Trends **Pharmacol Sci**., v. 21, n. 6, p. 205-8, Jun. 2000.

MURROW, B. A. e HOEHN, K. L. Mitochondrial regulation of insulin action. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.42, p.1936–1939, 2010.

MARUTHUR, N. M.; MITCHELL, B. D. Zinc–rs13266634 and the Arrival of Diabetes Pharmacogenetics: The “Zinc Mystique”. **Diabetes**, v.63, p.1463–1464, 2014.

MARUTHUR, N. M et al. Effect of zinc supplementation on insulin secretion: interaction between zinc and SLC30A8 genotype in Old Order Amish. **Diabetologia**, v.58, p.295–303, 2015.

NICOLSON, T.J.; BELLOMO, E.A.; WIJESEKARA, N.; LODER, M.K.; BALDWIN, J.M.; GYULKHANDANYAN, A.V.; KOSHKIN, V.; TARASOV, A.I.; CARZANIGA, R.; KRONENBERGER, K. et al. Insulin storage and glucose homeostasis in mice null for the granule zinc transporter ZnT8 and studies of the type 2 diabetes-associated variants. **Diabetes,** v.58, p. 2070–2083, 2009.

OMORI, S.; TANAKA, Y.; TAKAHASHI, A.; HIROSE, H.; KASHIWAGI, A.; KAKU, K., et al. Association of CDKAL1, IGF2BP2, CDKN2A/B, HHEX, SLC30A8, and KCNJ11 with susceptibility to type 2 diabetes in a Japanese population. **Diabetes,**v.57,p.791-5, 2008.

PALMITER, R.D. & FINDLEY, S.D. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. ***EMBO J*** v.14, p.639–649, 1995.

PRASAD, A. S. Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model. **Am J Clin Nutr**, v.53, p.403–12,1991.

PRASAD, A. S. Impact of the Discovery of Human Zinc Deficiency on Health. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 28, n. 3, p. 257-265, 2009.

RAW, I. Mecanismo de ação da insulina. Rev Med., v.32, p.199-210, 2006.

RUZ, M. et al. Zinc as a potential coadjuvant in therapy for type 2 diabetes. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 34, n. 2, 2013.

RUTTER, G. A; CHIMIENTI, F. SLC30A8 mutations in type 2 diabetes. **Diabetologia**, p. 1-6, 2014.

SANGHERA, D.K.; ORTEGA, L.; HAN, S.; SINGH, J.; RALHAN, S.K.; WANDER, G.S., et al. Impact of nine common type 2 diabetes risk polymorphisms in Asian Indian Sikhs: PPARG2 (Pro12Ala), IGF2BP2, TCF7L2 and FTO variants confer a significant risk. **BMC Med Genet,** v.9, p.59, 2008.

STAIGER, H.; MACHICAO, F.; STEFAN,N.; TSCHRITTER,O.; THAMER, C.; KANTARTZIS, K.; SCHA¨ FER, S. A.; KIRCHHOFF, K.; FRITSCHE, A. e HA¨RING, A. Polymorphisms within Novel Risk Loci for Type 2. Diabetes Determine b-Cell Function. **PLoSone**, v. 9, p. 832, 2007.

SEKLER, I.; SENSI, S.L.; HERSHFINKEL, M.; SILVERMAN, W.F. Mechanism and regulation of cellular zinc transport. **Mol Med.,** v. 13, n. 7-8, p. 337-343, 2007.

SHAW, J. E.; SICREE, R.A.; ZIMMET, P.Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. Diabetes Atlas. **Diabetes Research and Clinical Practice**., v.87, p.4-14, 2010.

SIMON, S.F.; TAYLOR, C.G. Dietary zinc supplementation attenuates hyperglycemia in db/db mice**. Experimental Biology and Medicine ,** v.226,p. 43-51, 2001**.**

SLADEK, R.; ROCHELEAU, G.; RUNG, J.; DINA, C.; SHEN, L.; SERRE, D.; BOUTIN, P.; VINCENT, D.; BELISLE, A.; HADJADJ, S.; BALKAU, B.; HEUDE, B.; CHARPENTIER, G.; HUDSON, T.J.; MONTPETIT, A.; PSHEZHETSKY, A.V.; PRENTKI, M. ; POSNER, B.I. ; BALDING, D.J. ; MEYRE, D.; POLYCHRONAKOS, C.; FROGUEL. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. **Nature**, v.22; n.445, p. 881-5, 2007.

SCHMIDT, M.I.; DUNCAN, B.B.; SILVA, G.A., et al. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. **Lancet**, v.377, p.1949-61, 2011.

SCOTT, D.A. & FISHER, A.M. The effect of zinc salts on the action of insulin**. J Pharmacol Exp Ther** v. 55, p.206–211,1935.

SCOTT, L.J.; MOHLKE, K.L.; BONNYCASTLE, L.L.; WILLER, C.J.; LI, Y.; DUREN, W.L., et al. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. **Science**, v.316, p.1341-5, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES [SBD]. Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes (2013-2014). AC Farmacêutica, p.1-365, 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. Participantes: LIMA, J.G; SANTOS, JR. A.C; NÓBREGA, L.H.C.; ANDRADA, N.C.; STEIN, A.T.; GONÇALVES, M.; LOBE, M.C.S.; SORINO, E.A.; ANDRADA, N.C. Diabetes Mellitus Tipo 2: Prevenção. **Projeto Diretrizes, Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina**, 2011.

STEFANIDOU, M.; MARAVELIAS, C.; SPILIOPOULOU, A. D. C. Zinc: a multipurpose trace element. **Arch. Toxicol.**, v.80, p.1-9, 2006.

TABARA, Y.; OSAWA, H.; KAWAMOTO, R.; ONUMA, H.; SHIMIZU, I.; MIKI, T., et al. Replication study of candidate genes associated with type 2 diabetes based on genome-wide screening. **Diabetes**, v.58, p.493-8, 2009.

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

TAMAKI, M; FUJITANI, Y. Role of Zinc in Type 2 Diabetes. **Japanese Journal of Public Health, ,** v.69, p.15–23, 2014.

TUERK, M. J.; FAZEL, N. Zinc deficiency. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 25, p. 136-143, 2009.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A., et al. Global prevalences of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v.27, n.5, p.1047-53, 2004.

XIANG, J.; LI, X.; XU, M.; HONG, J.; HUANG, Y.; TAN, J.; LU, X.; DAI, M.; YU, B.; NING, G. Zinc Transporter-8 Gene (SLC30A8) Is Associated with Type 2 Diabetes in Chinese. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 93, n.10, p.4107–4112, 2008.

VALENZUELA, R.B.; PÉREZ, F.B.; RUZ, M.O. Zinc y diabetes: un nutriente importante en su prevención y tratamento. **Rev. chil. endocrinol. Diabetes,** v.5, n.2, p. 76-81, 2012.

ZEGGINI, E.; WEEDON, M.N.; LINDGREN, C.M.; FRAYLING, TM.; ELLIOTT, K.S. LANGO, H., et al. Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. **Science**, v.316, p.1336-4, 2007.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a influência do polimorfismo Arg325Trp no gene do ZnT8 (*SLC30A8)* no estado nutricional relativo ao zinco de pacientes com diabetes tipo 2 e sua relação com parâmetros glicêmicos e insulinêmicos.

2.2 Específicos

- ✓ Avaliar a ingestão alimentar de zinco e dos macronutrientes;
- ✓ Avaliar o estado nutricional dos indivíduos em relação ao zinco;
- ✓ Avaliar os parâmetros glicêmicos e lipídicos;
- ✓ Avaliar a resistência à insulina e a função das células β;
- ✓ Verificar a presença do polimorfismo Arg325Trp no gene *SLC30A8* do transportador ZnT8 e sua relação sobre os demais parâmetros avaliados.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Este estudo foi do tipo transversal, no qual foram avaliados 82 indivíduos com idades entre 29 e 59 anos, de ambos os gêneros, voluntários, que fazem acompanhamento clínico no Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, inseridos no estudo por demanda espontânea e de acordo com os critérios de inclusão, os quais foram: presença de diabetes *mellitus* tipo 2 sem estar fazendo uso de insulina, adultos, não fumantes e que não fizessem uso de bebida alcoólica de forma regular, além da ausência de outras doenças crônicas não transmissíveis, como artrite reumatoide, doenças renais e da tireoide, psoríase e câncer, que pudessem interferir no estado nutricional dos indivíduos em relação ao zinco.

Foi aplicado um questionário a fim de obter informações clínicas e socioeconômicas dos participantes (Apêndice A). Todos os participantes foram esclarecidos sobre os procedimentos aos quais seriam submetidos e o destino do material biológico coletado, assim como, a demanda de tempo necessária para a realização do estudo. Foram informados também sobre o direito de desistir de participar da pesquisa em qualquer momento, sem constrangimentos. Os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice B), que descreve as informações sobre o projeto, de acordo com a Resolução CNS nº 196/96, itens III, IV e V, que tratam da proteção dos participantes e orienta procedimentos referentes às pesquisas que necessitam experiências com humanos.

Esta pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo por meio da Plataforma Brasil sob o parecer 414.203 (Anexo 1).

3.1 Protocolo experimental

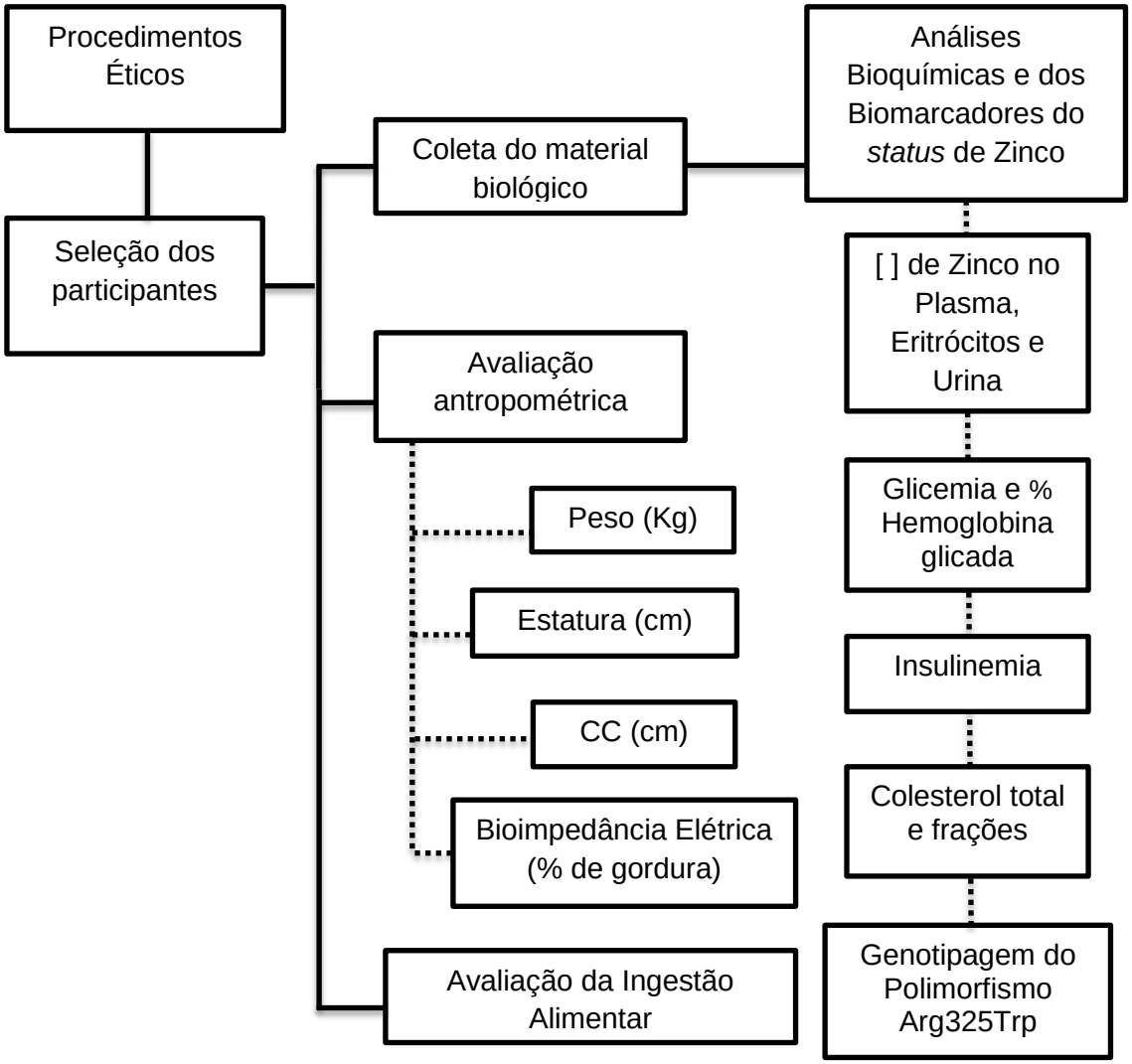
Todos os participantes foram submetidos a uma colheita de sangue, após 12h de jejum, e orientados a coletar a urina durante 24h. Além disso,

também foram avaliados quanto a composição corporal e e a ingestão alimentar. A coleta de sangue foi realizada por profissional especializado.

A avaliação da composição corporal consistiu na aferição de peso, estatura, circunferência da cintura e bioimpedância elétrica. As informações sobre a ingestão alimentar foram obtidas por meio de recordatório 24 horas de 3 dias, destes, um dia referente ao final de semana.

O material biológico foi analisado para caracterizar os pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 quanto a presença do polimorfismo estudado, estado nutricional relativo ao zinco, resistência à insulina, função das células β e marcadores glicêmicos, insulinêmicos e perfil lipídico (Figura 1).

Figura 1. Fluxograma do estudo. São Paulo, 2015.



3.2 Avaliação Antropométrica

3.2.1 Peso e Estatura

Foram realizadas medidas antropométricas de peso (kg) e estatura (cm), segundo metodologia de Frisancho (1990). Para aferição do peso foi utilizada uma balança antropométrica com subdivisões de 100g, em que o indivíduo foi posicionado no centro da balança, descalço, em posição ereta e com os braços estendidos ao longo do corpo.

A estatura foi aferida com o auxílio de um estadiômetro, com altura máxima de 2 metros, no qual o participante ficou em pé com os pés juntos, descalços e braços estendidos ao longo do corpo, olhando para a linha do horizonte com a cabeça formando um ângulo de 90°.

3.2.2 IMC

Após a aferição do peso e da estatura, foi realizado o cálculo do Índice de Massa Corpórea (IMC). Este índice é calculado dividindo-se o peso atual em quilogramas pela estatura em metros ao quadrado. O resultado foi analisado de acordo com a classificação nutricional proposta pela Organização Mundial de Saúde - OMS (WHO, 2000).

3.2.3 Bioimpedância elétrica

Para determinação desta medida, os pacientes foram orientados a estarem em jejum de no mínimo 2h, no caso de mulheres, não estarem menstruadas. Foi utilizado o analisador de composição corporal tetrapolar da marca Biospace, modelo InBody 720. Os indivíduos foram orientados a retirarem todos os acessórios de metal que estivessem utilizando, depois subirem na base do aparelho com os pés descalços e foram orientados a mantê-los levemente separados e alinhados em cima da placa de metal, conforme orientação do fabricante. Os braços ficaram esticados, retos, e afastados do tronco e o individuo não poderia se mover durante a medição. O percentual de gordura foi baseado nos pontos de corte propostos por Pollock e Wilmore (1993).

3.2.4 Circunferência da cintura (CC)

Também foi obtida a medida de circunferência da cintura (CC) com fita inelástica, circundando o indivíduo no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca (WHO, 2008). O resultado foi classificado segundo a OMS (WHO, 2000).

3.3 Avaliação da ingestão alimentar

Para avaliação da ingestão alimentar foi utilizado o método de recordatório 24h (Apêndice C), sendo relatados todos os alimentos consumidos em dois dias alternados durante a semana e mais um dia no final de semana. Sendo que, no dia da seleção para a pesquisa foi anotado o primeiro recordatório alimentar de 24h, os outros dois recordatórios foram coletados por meio de ligação telefônica.

A análise dos alimentos consumidos pelos participantes da pesquisa foi feita por meio do *Software* NutWin, versão 2.5, do Departamento de Informática da Escola Paulista de Medicina/UNIFESP, no qual foram inseridos alimentos com dados nacionais da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011).

A adequação da dieta em relação ao zinco foi avaliada a partir de comparações com a Necessidade Média Estimada (*Estimated Average Requirement* – EAR) e os macronutrientes com o Intervalo aceitável da distribuição de macronutrientes (*Acceptable Macronutrient Distribution Range* - AMDR), conforme proposto pelo *Institute of Medicine* (IOM, 2001; 2005). Também foi realizado o ajuste dos valores de zinco pela energia das dietas (WILLET, 1998).

3.4 Controle de contaminação

Todo o material utilizado (vidrarias, plásticos, ponteiras, tubos, etc.) para análises de zinco foram desmineralizados em banho de ácido nítrico a 20%, por no mínimo 12 horas, e foram enxaguados 10 vezes com água nanopura e secos em estufa inox para material desmineralizado a 25ºC, em seguida foram embalados em sacos plásticos até o momento do uso. Este procedimento é

padrão do Laboratório de Nutrição-Minerais/USP. O material que foi utilizado nas demais determinações foi esterilizado/DNAse *free*.

3.5 Coleta de Materiais Biológicos e Análises Bioquímicas

3.5.1 Sangue

Foram colhidos 20 mL de sangue, com tubos á vácuo, estando os participantes em jejum de 12 horas. O sangue para análise de zinco (10 mL) foi coletado no tubo com anticoagulante heparina sódica (livre de elementos traços).

O plasma foi separado do sangue total por centrifugação a 3000 rpm durante 15 minutos a 4ºC e acondicionado em microtubos desmineralizados e armazenado a -80ºC para análise de zinco no plasma. Após este procedimento, a massa eritrocitária obtida do sangue total foi lavada três vezes com 3 mL de solução de NaCL 0,9%, homogeneizada lentamente por inversão e centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos a 4ºC, sendo o sobrenadante descartado. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi aspirado, a massa de eritrócitos foi cuidadosamente extraída com pipeta automática e acondicionada em tubos de polipropileno desmineralizados, e armazenada à -80ºC até o momento das análises de zinco.

Uma alíquota de 5 mL de sangue total para análise do SNP Arg325Trp no gene que codifica para o ZnT8 e para hemoglobina glicada foi coletada em tubo de polipropileno contendo EDTA (anticoagulante).

O restante do sangue total (5 mL) foi coletado em tubo sem anticoagulante para obtenção de soro para análises da glicose, perfil lipídico e da concentração de insulina.

3.5.2 Urina de 24 horas

As amostras de urina foram coletadas em frascos previamente desmineralizados. Os participantes foram orientados quanto à forma correta de coletar e armazenar a urina, a qual foi entregue à pesquisadora no dia da coleta de sangue. Após o recebimento das amostras de urina, estas foram mensuradas quanto ao volume e uma alíquota de cerca de 50 mL foi

armazenada a -80º C para posterior análise da concentração de zinco urinário.

3.6 Parâmetros bioquímicos de avaliação do *status* de zinco

3.6.1 Determinação da concentração de zinco no plasma

A determinação da concentração de zinco foi realizada por meio do método de espectrometria de absorção atômica de chama, conforme proposto por Rodriguez et al. (1989). Como padrão de análise, foi utilizado o Tritizol® (MERCK®). Uma curva padrão de zinco foi preparada utilizando as seguintes concentrações: 0,01; 0,02; 0,03; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5 μg/mL, diluída em água nanopura e com acréscimo de solução de glicerol a 3%. Os resultados das absorbâncias das amostras foram expressos em μg/dL.

3.6.2 Determinação da concentração de zinco nos eritrócitoss

A determinação de zinco nos eritrócitos foi realizada por espectrometria de absorção atômica de chama conforme metodologia proposta por Whitehouse et al. (1982) e adaptada por Cordeiro (1994). O Tritizol® (MERCK) também foi utilizado como padrão para preparo da curva de calibração, a qual foi preparada com água nanopura nas seguintes concentrações: 0,01; 0,02; 0,03; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5 μg/mL. Paralelamente, foi analisada a concentração de hemoglobina das amostras, uma vez que os resultados foram expressos em μgZn/g Hb.

3.6.3 Determinação da concentração de zinco na urina

A determinação da concentração de zinco na urina foi realizada por meio do método de espectrofotometria de absorção atômica de chama, conforme proposto por Kiilerich et al. (1980). A curva padrão de calibração nesta análise também foi o Tritizol® (MERCK), preparada com água nanopura nas concentrações de 0,01; 0,02; 0,03; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5 μg/mL. Os resultados foram calculados em μgZn/mL e transformados em μgZn/24h, considerando o volume urinário de 24h.

3.6.4 Controle da metodologia

O controle da metodologia da análise de zinco foi avaliado pelo material de referência certificado SERONORM® (*Serum, Whole blood e Urine*), o qual foi preparado conforme os mesmos procedimentos de diluição das amostras.

3.7 Determinações dos parâmetros glicêmicos

A determinação das concentrações séricas de glicose (mg/dL) foi realizada pelo método enzimático, e a determinação da hemoglobina glicada (%), por reação enzimática, utilizando kits comerciais (Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil).

3.8 Índice de resistência à insulina - *Homeostasis Model Assessment* (HOMA-IR) e Função das células β (HOMA-β)

Para avaliação da secreção da insulina sérica foi determinada a concentração de glicose sérica, conforme item 3.7 e a concentração de insulina sérica pelo método de Imunoensaio tipo sanduíche utilizando quimiluminescência realizada nos equipamentos automatizados Advia Centaur Siemens ®. Esta análise foi realizada pelo Laboratório do Hospital Universitário da USP. A partir destes dados foi calculado o índice de resistência à insulina (HOMA-IR) e a função das células β (HOMA β) (MATTEWS, 1985) pelas seguintes fórmulas:

HOMA-IR = Glicemia (mMol) × Insulina (µU/mL) ÷ 22,5

HOMA β = 20 x Insulina (µU/mL) ÷ Glicemia (mMol) – 3,5

3.9 Determinação do SNP Arg325Trp no gene *SLC30A8* do ZnT8 (rs13266634)

Primeiramente, foi realizada a extração do DNA a partir de 200 µL de sangue total com o kit PureLink™ – Genomic DNA da Life Technologies (Applied Biosystems, Life Technologies), seguindo as instruções do fabricante. Então, foi feita a quantificação da concentração de DNA por meio de leitura em espectrofotômetro (Nanodrop®). Os resultados foram obtidos em ng/µL.

A genotipagem dos participantes em relação ao polimorfismo Arg325Trp no gene *SLC30A8* que codifica para o ZnT8 foi feita pelo sistema *TaqMan SNP Genotyping Assays (*Applied Biosystems, Life Technologies), conforme as instruções do fabricante. Este sistema é baseado na análise *end-point* da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) com *primers* e sondas específica para o SNP estudado.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador StepOne System Plus (Applied Biosystems, Life Technologies). Estas análises foram realizadas em uniplicata, em placas específicas de 96, com volume final de 20 µL em cada poço, sendo 13,75 µL do mix de reação e 11,25 µL da amostra de DNA diluída em água autoclavada. O mix de reação foi composto do Master Mix® e do Assay Mix®, o qual continha a sonda, sendo ambos componentes do sistema TaqMan SNP Genotyping Assays®. A reação de amplificação foi realizada com os primers forward 5'-GGACAGAAAGAGTTCCCATAGCG-3' e reverse 5'-ATAGCAGCATGTTTGAAGGTGGC-3' (HUANG et al., 2010), seguindo o protocolo de: 10 minutos a 95ºC para ativação da enzima, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 92º para desnaturação e de um minuto a 60ºC para o anelamento. Ao final das reações foi detectada a presença ou não de alelos variantes para o SNP estudado (CC: homozigoto selvagem; CT: heterozigoto com alelo variante e TT: homozigoto variante).

3.10 Determinação dos parâmetros lipídicos

As concentrações de colesterol total, HDL-colesterol e triglicerídeos também foram realizadas por métodos enzimáticos comerciais (Labtest, Lagoa Santa-Minas Gerais, Brasil). O colesterol contido na HDL foi determinado após a precipitação da fração LDL e triglicerídeos (TG). A fração LDL foi calculada utilizando-se a equação de Friedwald, Levy e Fredrickson (1972), sendo: LDL-c = colesterol total – HDLc – TG/5.

3.11 Avaliação Estatística

As analises estatísticas foram realizadas com auxílio do *software Statistical Package for the Social Sciences,* versão 14.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

Foram calculadas as seguintes medidas: média, desvio padrão, frequências absoluta e relativa. Foram testadas a normalidade dos dados por meio do teste Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variância, com o teste de Levene. Todos os dados apresentaram variâncias homogêneas.

Os dados foram distribuídos de acordo com os genótipos relativos ao polimorfismo Arg325Trp no gene do ZnT8 e testados entre todos os genótipos, ou seja, CC, CT e TT, com o teste de ANOVA. Após, fez-se as comparações múltiplas pelo Teste de Tukey, a fim de ver quais os pares que diferiram.

O ajuste da ingestão de zinco pela energia fornecida pela dieta foi realizado pelo método residual proposto por Willet (1998), sendo primeiramente testada a normalidade dos valores pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Após essa etapa, aplicou-se a correlação linear de Pearson para verificar a existência de correlação entre a ingestão de energia e de zinco. Em seguida, foi aplicado o teste de regressão linear simples, considerando a energia como variável independente e zinco como variável dependente, para determinar o valor de zinco estimado, residual, constante e ajustado. Ao final, a média do valor de ingestão de zinco foi igual tanto em sua forma ajustada quanto em sua forma bruta, já o valor do desvio-padrão após o ajuste foi reduzido.

Para os biomarcadores do *status* de zinco foi realizado o teste de ANOVA e após fez-se as comparações múltiplas pelo Teste de Tukey, os quais foram classificados em tercis: I, II e III e comparados aos parâmetros insulinêmicos e glicêmicos.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado por meio do teste Qui-Quadrado, com a utilização da calculadora para marcadores bialélicos (RODRIGUEZ, GAUNT, DAY, 2009).

Todos os testes foram fixados com valores de confiança de 95% ($P<0,05$), sendo considerados significativos.

3.12 Referências

CORDEIRO, M.B.C. Adequação alimentar e avaliação do estado nutricional em relação ao zinco em grupo de idosos institucionalizados. São Paulo, 1994. 1v. **Dissertação de Mestrado** - Faculdades de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. ***Clin Chem,*** v.18, p. 499-502, 1972.

FRISANCHO, A. R. Anthropometric standards for the assessment of growth and nutritional status. Ann Arbor: The University of Michigan Press, p. 48-53, 1990.

GIBSON, R. S. Principles of nutritional assessment. 2. ed. New York: Oxford University, p. 543-53, 2005.

IOM - INSTITUTE OF MEDICINE OF THE NATIONAL ACADEMIES. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. **Washington, DC**, 2001.

IOM - INSTITUTE OF MEDICINE OF THE NATIONAL ACADEMIES. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients**). Washington,** DC, 1359 p., 2005.

KIILERICH, S.; CHRISTENSEN, M. S.; NAESTOFT, J.; CHRISTIANSE, C. Determination of zinc in serum and urine by atomic absorption spectrophotometry; relationship between serum levels of zinc and proteins in 104 normal subjects. **Clin. Chim. Acta.**, v. 105, p. 231-239, 1980.

POLLOCK, M. & WILMORE J. H. Exercícios na saúde e na doença: avaliação e prescrição para prevenção e reabilitação. 2. ed. Rio de Janeiro: **MEDSI**,1993.

RODRIGUEZ, M. P.; NARIZANO, A.; DEMCZYLO, V.; CID, A. A simpler method for the determination of zinc human plasma levels by flame atomic absorption spectrophotometry. **At. Spectrosc.**, v. 10, n. 2, p. 68-70, 1989.

RODRIGUEZ, S.; GAUNT, T. R.; DAY, I. N. Hardy-Weinberg testes de apuração biológico para estudos de randomização mendeliana. **Am J Epidemiol .,** v.169, n.4, p.505-14, 2009.

TACO - Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA – UNICAMP.- 4. ed. rev. e ampl. - Campinas: NEPAUNICAMP p,161, 2011.

WHITEHOUSE, R. C.; PRASAD, A. S.; RABBANI, P. I.; COSSACK, Z. T. Zinc in plasma, neutrophils, lymphocytes and erythrocytes as determined by flameless atomic absorption spectrophotometry. **Clin. Chem.**, v. 28, n. 3, p. 475-480, 1982.

WILLET, W. C. Inssues in analysis and presentation of dietary data. In: **Nutritional Epidemiology**. 2 ed. New York: Oxford University Press, p.321-345,1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Obesity**: Preventing and Managing the Global Epidemic. Geneva, 253 p., 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Waist circumference and waist–hip ratio:** report of a WHO expert consultation. Geneva, 39p, 2008.

4. RESULTADOS

ARTIGO 1 – Estudo do polimorfismo Arg325Trp no gene do ZnT8 (*SLC30A8)* no *status* de zinco e marcadores do metabolismo da glicose em indivíduos com diabetes tipo 2 (DM2).

Resumo

O transportador de zinco 8 (ZnT8) nas células beta pancreáticas exerce um papel importante para a disponibilidade de zinco nestas células, sendo que esse mineral é essencial para a síntese, o armazenamento e a secreção da insulina. A presença do polimorfismo Arg325Trp (rs13266634) no gene do ZnT8 parece influenciar o *status* de zinco de indivíduos, e consequentemente os parâmetros do metabolismo glicídico. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a influencia do referido polimorfismo em indivíduos com DM2 no estado nutricional relativo ao zinco e marcadores glicêmicos e insulinêmicos. Para isso, 82 indivíduos com DM2 foram caracterizados quanto ao genótipo do polimorfismo Arg325Trp (rs13266634) no gene do ZnT8 pelo *sistema TaqMan SNP Genotyping Assays*. O estado nutricional dos indivíduos relativo ao zinco foi avaliado por meio da concentração desse elemento no plasma, eritrócitos e urina pelo método de espectrometria de absorção atômica de chama. A ingestão alimentar foi avaliada por meio do método recordatório de 24 horas, realizado em três dias não consecutivos. Também foram determinadas as concentrações séricas de glicose e insulina e percentual de hemoglobina glicada. Foi calculado o índice de resistência à insulina (HOMA-IR) e a função das células β (HOMA β) a partir dos resultados de glicose e insulina séricas. Os resultados mostraram que as concentrações de zinco no plasma, nos eritrócitos e urina, bem como a ingestão alimentar de zinco não foram estatisticamente diferentes entre os genótipos (CC, CT e TT). O mesmo foi observado para os marcadores glicêmicos e insulinêmicos. Portanto, pode-se concluir que nesse trabalho, o polimorfismo Arg325Trp no gene *SLC30A8* que codifica para ZnT8 não influenciou o estado nutricional relativo ao zinco e os parâmetros do metabolismo da glicose de indivíduos com DM2.

Palavras-chave: ZnT8, polimorfismo Arg325Trp, diabetes tipo 2, glicemia, insulina.

Study Arg325Trp ZnT8 polymorphism in the gene (SLC30A8) zinc in status markers and glucose metabolism in individuals with type 2 diabetes (T2DM).

Abstract

Zinc transporter 8 (ZnT8) in pancreatic beta cells plays an important role in the availability of zinc in these cells, and this mineral is essential for the synthesis, storage and secretion of insulin. The presence of the Arg325Trp polymorphism (rs13266634) in the gene appears to influence ZnT8 zinc status of individuals, and consequently the parameters of glucose metabolism. The objective of this study was to evaluate the influence of that polymorphism in patients with DM2 in the nutritional status of zinc and glucose and insulinemic markers. For this, 82 individuals with type 2 diabetes were characterized by polymorphism genotype Arg325Trp (rs13266634) in ZnT8 gene by TaqMan SNP Genotyping Assays system. The nutritional status of zinc on individuals was assessed by the concentration of this element in plasma, erythrocytes and urine by the method of flame atomic absorption spectrometry. The dietary intake was assessed by 24-hour recall method, performed on three non-consecutive days. It was also determined serum concentrations of glucose and insulin and percentage of glycated hemoglobin. The insulin resistance index (HOMA-IR) and the function of β cells (HOMA β) from the results of serum glucose and insulin was calculated. The results showed that zinc concentrations in plasma, erythrocytes and in urine, as well as zinc food intake were not significantly different between genotypes (CC, CT and TT). The same was observed for glucose and insulinemic markers. Therefore, it can be concluded that in this study, the Arg325Trp polymorphism in the SLC30A8 gene encoding ZnT8 did not affect the nutritional status of zinc and parameters of glucose metabolism in individuals with type 2 diabetes.

Keywords: ZnT8, Arg325Trp polymorphism, type 2 diabetes, blood glucose, insulin.

Introdução

Estudos têm investigado possíveis associações entre o estado nutricional dos indivíduos relativo ao zinco e o diabetes, relação que pode apresentar condição modificadora e influenciadora da homeostase da glicose (ISLAM *et al.,* 2013; MARUTHUR *et al.,* 2015). Sabe-se que o zinco está envolvido no processo secretório da insulina, e é visto como um estabilizador deste hormônio, pois evita a degradação, participa da sua síntese, armazenamento e secreção. Simultaneamente, este elemento traço essencial age como um importante componente de mais de 300 enzimas com função catalítica, estrutural e transcricional (CHIMIENTI, 2013; MARUTHUR e MITCHELL, 2014; SALEM et al., 2014).

Duas famílias de genes atuam para que o zinco possa desempenhar sua função, a família ZnT (*SLC30*) que realiza o transporte desse mineral do citoplasma para fora da célula ou para vesículas intracelulares e a família Zip (*SLC39*) que têm essa mesma função, só que de forma contrária. O ZnT8, integrante da família ZnT (*SLC30A8*), é específico das células pancreáticas, portanto, um regulador chave na homeostase desse mineral nestas células. O gene do ZnT8 está localizado no cromossomo 8, região 8q24.11 (SALEM et al., 2014; DAVIDSON et al., 2014).

As investigações realizadas desde a descoberta de variantes no gene do ZnT8 (*SLC30A8)* associado ao DM2 mostraram mais interesse para o polimorfismo de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polimorfism - SNP*) Arg325Trp (rs13266634), pois indivíduos que apresentam o genótipo selvagem (alelo C) possuíam maior risco para o desenvolvimento do DM2, por influenciar o mecanismo de secreção da insulina. Esse *SNP causa* a substituição da base citosina (C) por uma timina (T) na posição 325, formando o aminoácido triptofano ao invés da arginina (SLADEK et al., 2007; MARUTHUR e MITCHELL, 2014; MARUTHUR *et al.*, 2015).

Shan et al. (2014) publicaram o primeiro estudo que mostrou interações entre as concentrações de zinco plasmático, o SNP Arg325Trp que codifica para o transportador ZnT8 e alterações na homeostase da glicose. Os autores verificaram que os indivíduos com DM2 e os que tinham alteração na regulação

da glicose e que apresentavam o alelo C exibiam reduzidas concentrações de zinco no plasma quando comparados ao grupo com tolerância normal a glicose.

Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a influência do SNP Arg325Trp no gene *SLC30A8* que codifica para o ZnT8 em relação ao estado nutricional relativo ao zinco e aos parâmetros glicêmicos e insulinêmicos de indivíduos com DM2 residentes no Brasil.

Casuística

População do estudo

Foram avaliados 82 indivíduos com idades entre 29 e 59 anos, de ambos os gêneros, voluntários, que fazem acompanhamento clínico no Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, inseridos no estudo por demanda espontânea e de acordo com os critérios de inclusão, os quais foram: presença de diabetes *mellitus* tipo 2 sem estar fazendo uso de insulina, adultos, não fumantes e que não fizessem uso de bebida alcoólica de forma regular, além da ausência de outras doenças crônicas não transmissíveis, como artrite reumatoide, doenças renais e da tireoide, psoríase e câncer, que pudessem interferir no estado nutricional dos indivíduos em relação ao zinco.

Este estudo foi conduzido de acordo com as diretrizes estabelecidas pela Declaração de Helsinki e todos os procedimentos envolvendo os pacientes avaliados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo sob o parecer 414.203. O consentimento escrito livre e esclarecido foi obtido de todos os participantes do estudo.

Métodos

Avaliação Antropométrica

Foram realizadas medidas antropométricas de peso (kg) e estatura (cm), segundo metodologia de Frisancho (1990). Em seguida, realizou-se o cálculo do Índice de Massa Corpórea (IMC) e o resultado foi classificado de acordo

com o proposto pela Organização Mundial de Saúde - OMS (WHO, 2000). Para avaliar o percentual de gordura, foi utilizado o analisador de composição corporal tetrapolar da marca Biospace, modelo InBody 720 e os resultados foram baseados nos pontos de corte recomendados por Pollock e Wilmore (1993). A avaliação da medida de circunferência da cintura (CC) foi classificada segundo os valores de referência propostos pela OMS (WHO, 2000).

Avaliação da ingestão alimentar de zinco

O método utilizado para avaliar a ingestão alimentar foi o recordatório de 24h, o qual foi obtido de três dias não consecutivos, sendo dois dias durante a semana e um dia no final de semana. A análise dos alimentos consumidos pelos participantes da pesquisa foi feita por meio do *Software* NutWin, versão 2.5. A adequação da dieta em relação ao zinco foi avaliada a partir de comparações com a Necessidade Média Estimada (*Estimated Average Requirement* – EAR) conforme propostos pelo *Institute of Medicine* (IOM, 2001). Também foi realizado o ajuste pela energia dos valores de zinco encontrado (WILLET, 1998).

Obtenção das amostras

Sangue

Após jejum de 10 a 12h, foram colhidos 20 mL de sangue dos participantes, em tubo com anticoagulante heparina sódica livre de elementos traço para análise de zinco, tubo com EDTA para a genotipagem do SNP *Arg325Trp* (rs13266634) e determinação da hemoglobina glicada, e tubo sem anticoagulante para análise das concentrações de insulina e glicose séricas. A obtenção do plasma para a determinação de zinco, foi a partir da centrifugação a 3.000 rpm durante 15 minutos a 4ºC. Em seguida, a massa eritrocitária obtida foi lavada três vezes com 3 mL de solução com NaCl à 0,9%, homogeneizada lentamente por inversão e centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos a 4ºC, sendo o sobrenadante descartado. As amostras de sangue total e de soro foram armazenadas em microtubos estéreis, as de plasma e massa eritrocitária

foram acondicionadas em microtubos desmineralizados e todas as amostras armazenadas à -80ºC.

Urina

Os participantes foram orientados a coletarem a urina durante 24 horas para a determinação da concentração de zinco. Após o recebimento das amostras, o volume foi aferido, e uma alíquota foi conservada a -80° C para posterior análise.

Genotipagem do SNP Arg325Trp (rs13266634)

O DNA genômico foi extraído a partir de 200 µL de sangue total com uso de kit comercialmente disponível (kit PureLink™ – Genomic DNA; Life Technologies), seguindo as instruções do fabricante.

A genotipagem dos participantes em relação ao SNP Arg325Trp no gene *SLC30A8* que codifica para o ZnT8 foi feita pelo sistema *TaqMan SNP Genotyping Assays (*Applied Biosystems, Life Technologies),

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador *StepOne System Plus (*Applied Biosystems, Life Technologies). As análises foram realizadas em uniplicatas, em placas específicas de 96 poços, com volume final de 20 µL em cada poço, sendo 13,75 µL do mix de reação e 11,25 µL da amostra de DNA diluída em água autoclavada. O mix de reação foi composto do Master Mix® e do Assay Mix®, o qual continha a sonda, sendo ambos componentes do sistema TaqMan SNP Genotyping Assays®. A reação de amplificação foi realizada com os primers forward 5'-GGACAGAAAGAGTTCCCATAGCG-3' e reverse 5'-ATAGCAGCATGTTTGAAGGTGGC-3' (HUANG et al., 2010), seguindo o protocolo: 10 minutos a 95ºC para ativação da enzima, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 92ºC para desnaturação e de um minuto a 60ºC para o anelamento. Ao final das reações foi detectada a presença ou não de alelos variantes para o SNP estudado (CC: homozigoto selvagem; CT: heterozigoto com alelo variante e TT: homozigoto variante).

Determinação da concentração de zinco no plasma, eritrócitos e urina

A determinação da concentração de zinco no plasma, eritrócito e urina foi realizada por meio do método de espectrometria de absorção atômica de chama, conforme metodologia proposta por Rodriguez et al. (1989), Whitehouse et al. (1982), adaptada por Cordeiro (1994) e por Kiilerich et al. (1980), respectivamente. Como padrão de análise, foi utilizado o Tritizol® (MERCK®). Uma curva padrão de zinco foi preparada utilizando as seguintes concentrações: 0,01; 0,02; 0,03; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5 μg/mL, diluídas em água nanopura. Para a análise de zinco no plasma, acrescentou-se a curva de calibração solução de glicerol a 3%. Os resultados das analises desse mineral no plasma e eritrócitos foram expressos em μg/dL e μgZn/g Hb, respectivamente. Para isso, foi determinada a concentração de hemoglobina nos eritrócitos. A concentração de zinco na urina foi transformada em μgZn/24h, considerando o volume urinário de 24h. O controle da metodologia da análise de zinco foi avaliado pelo material de referência certificado SERONORM® (*Serum, Whole blood e Urine*).

Parâmetros glicêmicos

A determinação da concentração sérica de glicose (mg/dL) foi realizada pelo método enzimático, e a determinação da hemoglobina glicada (%), por reação enzimática, utilizando kits comerciais (Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil).

Determinação de insulina sérica e cálculos do Homeostasis Model Assessment (*HOMA)*

A concentração de insulina sérica foi determinada pelo método de Imunoensaio tipo sanduíche utilizando quimiluminescência (Advia Centaur Siemens ®). Para avaliação do índice de resistência à insulina e da função das células β foram realizados os cálculos do HOMA-IR (resistência a insulina) e HOMA β (função das células beta) (MATTEWS, 1985), respectivamente pelas seguintes fórmulas: **HOMA-IR =** Glicemia (mMol) × Insulina (μU/mL) ÷ 22,5 e **HOMA β =** 20 x Insulina (μU/mL) ÷ Glicemia (mMol) – 3,5. A glicemia de jejum foi determinada conforme metodologia descrita anteriormente.

Avaliação Estatística

As analises estatísticas foram realizadas no *software Statistical Package for the Social Sciences,* versão 14.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

Os resultados foram apresentados em média, desvio padrão e em frequências absoluta e relativa. Foram testadas a normalidade dos dados por meio do teste Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variância, com o teste de Levene. Todos os dados apresentaram variâncias homogêneas.

Os dados foram distribuídos de acordo com os genótipos relativos ao SNP Arg325Trp e testados entre todos os genótipos, ou seja, CC, CT e TT, com o teste de ANOVA. Em seguida, realizaram-se as comparações múltiplas pelo Teste de Tukey, a fim de verificar quais os pares que diferiram.

A ingestão alimentar de zinco foi ajustada pela energia fornecida pela dieta, de acordo com o método residual proposto por Willet (1998), usando regressão linear simples.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado por meio do teste Qui-Quadrado, com a utilização da calculadora para marcadores bialélicos (RODRIGUEZ, GAUNT, DAY, 2009).

Todos os testes foram fixados com valores de confiança de 95% ($p<0,05$), sendo considerados significativos.

Resultados

Foram avaliados 82 pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2, com idades entre 29 e 59 anos, de ambos os gêneros, sem diferença significativa em relação ao gênero ($p>0,05$). O tempo médio de diagnóstico da doença foi de 7,3 anos. As características clínicas bem como a distribuição dos genótipos estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Características clínicas e distribuição dos genótipos do *SNP* Arg325Trp do gene *SLC30A8* do ZnT8 dos indivíduos com DM2.

Variáveis	**DM2 (n=82)**
Gênero	
Masculino, n (%)	51(62,0)
Idade (anos)	50,7±6,9

Tempo de diagnóstico da doença (anos)	7,3 ± 6,8
História familiar de diabetes, n (%)	69 (84,1)
Hipertensos, n (%)	43 (52,4)
Peso (kg)	81,4±19,4
Estatura (cm)	166,0±10,0
IMC (kg/(m)^2)	29,1±5,3
Circunferência da Cintura (cm)	97,5±12,6
Gordura corporal (%)	35,0±9,2
Glicose sérica (mg/dL)	150,3±53,6
Hemoglobina glicada (%)	8,1±1,2
Insulina sérica (µUI/mL)	17,4±10,6
HOMA-IR	6,5±4,5
HOMA-B	42,3±30,7
Genótipos	
CC	44 (53,7%)
CT	30 (36,6%)
TT	8 (9,8%)

Os resultados foram apresentados em frequência absoluta (n) e relativa (%) para dados categóricos, e em média e desvio padrão para os demais resultados.

A avaliação da composição corporal dos pacientes com DM2 não apresentou diferença estatística entre os genótipos (p>0,05), os resultados estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Composição corporal dos pacientes com DM2 de acordo com os genótipos do *SNP* Arg325Trp que codifica para o gene *SLC30A8* do ZnT8.

Variáveis	CC **n=44**	CT **n=30**	TT **n=8**	**p***
Peso (Kg)	80,5±19,6	82,5±19,6	82,3±19,6	0,909
Estatura (cm)	160,0±10,0	169,0±10,0	162,0±10,0	0,230
IMC (kg/(m)^2)	29,1±5,1	28,6±5,2	31,2±6,3	0,490
Circunferência da Cintura (cm)	95,7±11	98,6±13,6	104,7±17,1	0,287
Gordura corporal (%)	35,5±9,7	33,4±8,6	38,3±8,6	0,449

Dados apresentados em média e desvio padrão. * teste de ANOVA; teste de Tukey.

Ao avaliar o *status* de zinco dos pacientes com DM2, observou-se que apenas a concentração desse mineral no plasma apresentou diferença estatística entre os genótipos CT e TT (Tabela 3). Da mesma forma, não foi observada diferença significativa nos parâmetros glicêmicos e insulinêmicos para os diferentes genótipos.

Tabela 3. Parâmetros do *status* de zinco, glicêmicos e insulinêmicos dos indivíduos com DM2 de acordo com os genótipos do *SNP* Arg325Trp que codifica para o gene *SLC30A8* do ZnT8.

Parâmetros	**CC n=44**	**CT n=30**	**TT n=8**	**p***
Zn Plasmático (µg/dL)	84,6±10,9[ab]	79,3±12,4[a]	90,6±12,6[b]	0,030
Zn Urinário (µg Zn/24h)	861,9±601,7	882,6±495,7	1158,6±1063,1	0,463
Zn Eritrocitário (µg/g Hb)	29,4±4,10	30,8±5,1	30,9±5,8	0,404
Zn dietético (mg/dia)	9,9±0,7	9,8±0,8	10,2±0,7	0,370
Insulina sérica (µUI/mL)	16,0±10,0	18,4±11,4	21,4±1,0	0,344
Glicose sérica (mg/dL)	149,4±53,7	150,2±59,3	155,2±37,4	0,962
Hemoglobina glicada (%)	8,0±1,3	8,1±1,3	8,1±0,8	0,981
HOMA-IR	6,0±4,6	6,8±4,8	7,8±3,6	0,560
HOMA-B	38,1±27,3	45,9±32,7	51,6±39,8	0,370

Dados apresentados em média e desvio padrão. * teste de ANOVA; teste de Tukey.

Discussão

Estudos buscam o esclarecimento dos mecanismos entre o zinco, o ZnT8 e o *SNP* Arg325Trp (rs13266634) que codifica para o gene *SLC30A8* no ZnT8 para entender a influência protetora que esse *SNP* promove em indivíduos com DM2. Dentro dessa perspectiva, este é o primeiro estudo brasileiro realizado em pacientes com DM2, e os resultados mostraram que a presença dos diferentes genótipos para o *SNP* mencionado acima não influenciaram o estado nutricional relativo ao zinco dos pacientes, bem como os parâmetros do metabolismo da glicose.

A frequência dos genótipos para o SNP avaliado foi similar ao encontrado em outras populações, como a indiana (SANGHERA et al., 2008), francesa (SLADEK et al., 2007), russa (POTAPOV et al., 2010) e iraniana

(FAGHIH et al., 2014), e diferente do observado na população japonesa (HORIKOSHI et al., 2007), coreana (LEE et al., 2008) e chinesa (HAN et al., 2010), as quais apresentaram maiores frequências dos alelos CT.

A presença do alelo C (alelo selvagem) para o *SNP* Arg325Trp (rs13266634) no gene *SLC30A8* do ZnT8 tem instigado os pesquisadores a encontrar a explicação para a sua relação com anormalidades na secreção e processamento de insulina quando estimulada pela glicose (BOESGAARD et al., 2008; SHAN et al., 2014; MARUTHUR et al., 2015). Outro fator que os pesquisadores buscam elucidação é a perda da função do ZnT8 na presença do *SNP* Arg325Trp, de modo que supõe-se que essa proteína perca a seletividade, devido a alterações no códon iniciador do gene SLC30A8, o que aumentaria a secreção de insulina e reduziria o risco para desenvolvimento do DM2 (FLANNICK et al., 2014).

Neste estudo, não foram observadas diferenças estatísticas nas concentrações de insulina e glicose séricas, percentual de hemoglobina glicada, função das células beta avaliadas pelo HOMA-B e da resistência à insulina (HOMA-IR) entre os genótipos. De acordo com Boesgaard et al. (2008), indivíduos sem alteração na homeostase da glicose e que possuíam o alelo variante T para o *SNP* Arg325Trp (rs13266634) no gene *SLC30A8* do ZnT8 tiveram secreção de insulina aumentada após o teste oral de tolerância a glicose quando comparados aos indivíduos com alelo selvagem. No entanto, não foi observada diferença na resistência à insulina avaliada pelo HOMA-IR. Ressalta-se o estudo mencionado acima foi conduzido com indivíduos sem alterações no metabolismo da glicose.

Semelhante ao observado neste estudo, Xiang et al. (2008) não verificaram correlação entre os genótipos do SNP Arg325Trp no gene *SLC30A8* do ZnT8 e a glicemia de jejum, insulina plasmática, HOMA-IR e HOMA-B em chineses com tolerância normal a glicose como naqueles que apresentavam intolerância a glicose e DM2.

Em indivíduos pós-transplantados renais, tanto com DM2 quanto sem diabetes, com genótipo TT do SNP Arg325Trp no gene do ZnT8, a função das células beta pancreáticas foi melhor preservada quando avaliada pelo HOMA-

B. Contudo, a resistência à insulina não foi diferente nos grupos de acordo com os genótipos (KANG et al., 2008).

A resistência à insulina, por sua vez, está associada com obesidade. Os pacientes avaliados neste estudo se encontram com sobrepeso e obesidade, o que pode favorecer a resistência à insulina. Stern et al. (2005) realizaram um estudo populacional com 2138 pessoas sem diabetes e de etnia variada com objetivo de desenvolver pontos de corte para identificar indivíduos com resistência à insulina a partir do IMC. Os resultados mostraram que é possível fazer associação entre o IMC e a resistência à insulina, sendo este um indicador de fácil aplicação, podendo ser inserido na rotina clínica para o reconhecimento de doenças graves como o diabetes.

Semelhante ao encontrado neste estudo, Maruthur et al. (2015) também avaliaram o IMC de indivíduos com sobrepeso e obesidade de acordo com o genótipo do *SNP* Arg325Trp no gene *SLC30A8* do ZnT8 e não observaram diferença entre os genótipos. Na população chinesa com DM2, a circunferência da cintura foi maior nos indivíduos com genótipo TT para o SNP Arg325Trp no gene do ZnT8 (XIANG et al., 2008). O mesmo resultado foi encontrado no estudo de Staiger et al. (2007) para o genótipo variante, no entanto, não foi observada diferença em relação ao percentual de gordura de acordo com os diferentes genótipos. Neste estudo não foi observada diferença na composição corporal nos indivíduos com DM2 de acordo os genótipos do SNP Arg325Trp no gene do ZnT8.

O ZnT8 está localizado nas vesículas que secretam insulina, por isso altas concentrações de zinco são encontradas nas ilhotas pancreáticas, pois este mineral é essencial no processo de cristalização da insulina dentro do grânulo, sendo liberado juntamente com este hormônio na corrente sanguínea após o estímulo de secreção pela glicose circulante, por isso o zinco torna-se essencial para o processamento adequado, secreção e estabilidade do hexâmero de insulina (CHIMIENTI et al., 2004; RUZ et al., 2013). A maioria dos estudos realizados com indivíduos com diabetes mostra que o estado nutricional relativo ao zinco é deficiente (CAPDOR et al., 2013; AL-MAROFF e AL-SHARBATTI, 2006; AL-TIMINI e MAHMOUD, 2011 WALTER JR et al., 1998).

A compreensão da possível associação entre o SNP Arg325Trp no gene SLC30A8 do ZnT8 e o estado nutricional relativo ao zinco, principalmente em grupos populacionais com alteração no metabolismo da glicose, é essencial para futuras abordagens nutricionais e terapêuticas. Nossos resultados não mostraram diferenças significativas nos parâmetros avaliados do *status* de zinco, considerando os diferentes genótipos do SNP Arg325Trp.

Recentemente, foi publicado o primeiro estudo que mostrou uma forte interação do alelo variante (TT) do SNP Arg325Trp com as concentrações aumentadas de zinco no plasma em indivíduos chineses com DM2, além de uma associação inversa com os parâmetros do metabolismo da glicose nesses indivíduos (SHAN et al., 2014).

Até o momento não foi realizado nenhum estudo avaliando as concentrações de zinco nos eritrócitos, na urina e a ingestão desse mineral pela alimentação em indivíduos com DM2 associando-os ao SNP Arg325Trp no gene do ZnT8.

Mesmo não encontrando uma relação dos parâmetros do estado nutricional relativo ao zinco nos diferentes genótipos do SNP Arg325Trp no gene do ZnT8, os resultados da concentração de plasma mostram-se adequadas quando comparados aos valores de referência e com estudos dessa natureza em pacientes com DM2 (WILLIAM et al., 1995; QUILLIOT et al., 2001; SINHA e SEN, 2014). Associado a esse resultado, a ingestão alimentar de zinco contribuiu para o *pool* de zinco encontrado no plasma dos indivíduos com DM2.

No entanto, pelos valores reduzidos de concentrações de zinco nos eritrócitos e a hiperzincúria podemos considerar que os pacientes avaliados apresentavam deficiência desse mineral. Os estudos que utilizam as concentrações de zinco eritrocitário para avaliação de deficiência são desenhados com o intuito de verificar o *status* dos indivíduos considerando um período mais longo, uma vez que os eritrócitos possuem meia vida de 120 dias (VITOUX; ARNAUD; CHAPPUIS, 1999; KRUSE-JARRES e RUKGAUER, 2000; SANDSTRON, 2001).

A hiperzincúria é um achado frequente nos indivíduos com DM2 (CUNNINGHAM et al., 1994; MARREIRO et al., 2007; YAHYA e ALI SAQIB,

2011.). No entanto, os mecanismos que levam ao aumento da excreção de zinco não estão elucidados (VALENZUELA et al., 2012; JUROWSKI et al. 2014). Em uma pesquisa recente, realizada com indivíduos adultos sem diabetes, verificou-se que a concentração de zinco na urina foi associada a alterações na glicemia de jejum e o risco para o diabetes (FENG et al., 2015).

Nesse sentido, pesquisas nessa área em diferentes populações, como a resposta à suplementação de zinco, somar-se-ia ao entendimento do aproveitamento desse mineral e a sua relação com os parâmetros glicêmicos e insulinêmicos de indivíduos com DM2 com diferentes genótipos para o SNP Arg325Trp no gene *SLC30A8* do ZnT8.

Conclusão

O *SNP* Arg325Trp no gene *SLC30A8* que codifica para ZnT8 não teve influência no estado nutricional relativo ao zinco de pacientes com DM2 deste estudo, bem como nos parâmetros glicêmicos e insulinêmicos.

Referências

Al-Maroof RA, Al-Sharbatti SS (2006) Serum zinc levels in diabetic patients and effect of zinc supplementation on glycemic control of type 2 diabetics. *Saudi Med J* 27,344–50.

Al-Timimi DJ, Mahmoud HM (2011) Evaluation of Zinc Status Among Patients With Diabetes Mellitus. *Duhok. Med J* 5, 2, 1-10.

Boesgaard TW, Žilinskaitė J, Vänttinen M, *et al*. FOR THE EUGENE 2 CONSORTIUM (2008) The common *SLC30A8* Arg325Trp variantis associated with reduced first-phase insulin release in 846 non-diabetic off spring of type 2 diabetes patients — the EUGENE2 study. *Diabetologia* 51, 816–820.

Capdor J, Foster M, Petocz P, Samman S (2013) Zinc and glycemic control: A meta-analysis of randomised placebo controlled supplementation trials in humans. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 27,137– 142.

Chimienti F, Devergnas S, Favier A, Seve M (2004) Identification and Cloning of a beta-Cell–Specific Zinc Transporter, ZnT-8, Localized Into Insulin Secretory Granules. *Diabetes* 53, 2330–2337.

Cordeiro MBC (1994) Adequação alimentar e avaliação do estado nutricional em relação ao zinco em grupo de idosos institucionalizados. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo.

Cunningham JJ, Fu A, Mearkle PL, Brown RG (1994) Hyperzincuria in Individuals With Insulin-Dependent Diabetes Mellitus: Concurrent Zinc Status and the Effect of High-Dose Zinc Supplementation. *Metabolism* 43, 12, 1558-1562.

Davidson HW, Wenzlau JM, O'brien R M (2014) Zinc transporter 8 (ZnT8) and b cell function. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 20, 1–10.

Faghih H, Khatami S, Azarpira N, Foroughmand A (2014) SLC30A8 gene polymorphism (rs13266634 C/T) and type 2 diabetes mellitus in south Iranian population. *Mol Biol Rep* 41, 2709–2715.

Flannick J, Thorleifsson G, Beer, Jacobs SBR, Grarup N, Burtt NP, et al. (2014) Loss-of-function mutations in SLC30A8 protect against type 2 diabetes. *Nature Genetics* 46, 357–363.

Feng W, Cui X, Liu B, et al. (2015) Association of Urinary Metal Profiles with Altered Glucose Levels and Diabetes Risk: A Population-Based Study in China. *PLoS ONE* 10, 4, 1-18.

Frisancho AR (1990) Anthropometric standards for the assessment of growth and nutritional status. Ann Arbor: The University of Michigan Press, 48-53.

Han X, Luo Y, Ren Q, Zhang X, Wang F *et al*. (2010) Implication of genetic variants near SLC30A8, HHEX, CDKAL1, CDKN2A/B, IGF2BP2, FTO, TCF2, KCNQ1, and WFS1 in type 2 diabetes in a Chinese population. *BMC Med Genet* 11, 81–89.

Horikoshi M, Hara K, Ito C, Shojima N, Nagai R *et al.* (2007) Variations in the HHEX gene are associated with increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetologia* 50, 2461–2466.

Huang Q, Yin JY, Dai XP, *et al.* (2010) Association analysis of SLC30A8 rs13266634 and rs16889462 polymorphisms with type 2 diabetes mellitus and repaglinide response in Chinese patients. *Eur J Clin Pharmacol* 66,1207–1215.

IOM - INSTITUTE OF MEDICINE OF THE NATIONAL ACADEMIES (2001) Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium,

Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington, DC.

Islam, MR, Arslan I, Attia J. *et al.* (2013) Is serum zinc level associated with prediabetes and diabetes? A cross-sectional study from Bangladesh. *PLoS ONE* 8, 61776.

Jurowski K, Szewczyk B, Nowak G, Piekoszewski W (2014) Biological consequences of zinc deficiency in the pathomechanisms of selected diseases. *J Biol Inorg Chem* 1-11.

Kang ES, Kim MS, Kim YS, *et al.* (2008) Polymorphism in the Zinc Transporter Gene *SLC30A8* Confers Resistance Against Post transplantation Diabetes Mellitus in Renal Allograft Recipients*. Diabetes* 57, 4, 1043-1047.

Kiilerich S, Christensen MS, Naestoft J, *et al.* (1980) Determination of zinc in serum and urine by atomic absorption spectrophotometry; relationship between serum levels of zinc and proteins in 104 normal subjects. *Clin. Chim. Acta* 105, 231-239.

Kruse-Jarres Jd, Rükgauer M (2000) Trace elements in diabetes mellitus. peculiarities and clinical validity of determinations in blood cells. *J Trace Elem Med Biol* 14, 1, 21-27.

Lee Yh, Kang ES, Kim SH, Han SJ, Kim CH, Kim HJ, et al. (2008) Association between polymorphisms in SLC30A8, HHEX, CDKN2A/B, IGF2BP2, FTO, WFS1, CDKAL1, KCNQ1 and type 2 diabetes in the Korean population*. J Hum Genet* 53, 991-8.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28, 7, 412-9.

Marreiro DN, Martins MPSC, Sousa SSR, et al (2007) Urinary Excretion of Zinc and Metabolic Control of Patients with Diabetes Type 2. *Biol Trace Elem Res* 120, 42–50.

Maruthur NM & Mitchell BD (2014) Zinc–rs13266634 and the Arrival of Diabetes Pharmacogenetics: The “Zinc Mystique”. *Diabetes* 63, 1463–1464.

Maruthur NM, Clark JM, Fu M et al. (2015) Effect of zinc supplementation on insulin secretion: interaction between zinc and SLC30A8 genotype in Old Order Amish. *Diabetologia* 58, 295–303.

Pollock M & Wilmore JH (1993) Exercícios na saúde e na doença: avaliação e prescrição para prevenção e reabilitação. 2. ed. Rio de Janeiro: MEDSI.

Potapov VA, Chistiakov DA, Shamkhalova MS, *et al*. (2010) TCF7L2 rs12255372 and SLC30A8 rs13266634 confer susceptibility to type 2 diabetes in a Russian population. *Genetika* 46, 1123–1131.

Quilliot D, Dousset B, Guerci B, Dubois F, Drouin P, Ziegler O (2001) Evidence that diabetes mellitus favors impaired metabolism of zinc, copper, and selenium in chronic pancreatitis. *Pancreas* 22, 3, 299–306.

Rodriguez MP, Narizano A, Demczylo V *et al*. (1989) A simpler method for the determination of zinc human plasma levels by flame atomic absorption spectrophotometry. *At. Spectrosc* 10, 2, 68-70.

Rodriguez S, Gaunt TR, Day IN (2009) Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *Am J Epidemiol* 169, 4, 505-14.

Ruz M, Carrasco F, Rojas P, Codoceo J, Inostroza J, Basfi-fer K, et al. (2013) Zinc as a potential coadjuvant in therapy for type 2 diabetes. *Food and Nutrition Bulletin* 34, 2.

Salem SD, Saif-Ali R, Ismail IS *et al.* (2014) Contribution of SLC30A8 variants to the risk of type 2 diabetes in a multi-ethnic population: a case control study. *BMC Endocrine Disorders* 14, 2.

Sandström B (2001) Diagnosis of zinc defi ciency and excess in individuals and populations. *Food and Nutrition Bulletin* 22, 2, 133-137.

Sanghera DK, Ortega L, Han S, Singh J, Ralhan SK, Wander GS, et al. (2008) Impact of nine common type 2 diabetes risk polymorphisms in Asian Indian Sikhs: PPARG2 (Pro12Ala), IGF2BP2, TCF7L2 and FTO variants confer a significant risk. *BMC Med Genet* 9, 59.

Shan Z, Bao W, Zhang Y, Rong Y, Wang X, Jin Y, et al. (2014) Interactions Between Zinc Transporter-8 Gene (SLC30A8) and Plasma Zinc Concentrations for Impaired Glucose Regulation and Type 2 Diabetes. *Diabetes* 63, 1796–1803.

Sinha S e Sen S (2014) Status of zinc and magnesium levels in type 2 diabetes mellitus and its relationship with glycemic status. *Int J Diabetes Dev Ctries* 34, 4, 220–223.

Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, et al. (2007) A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 22; 445, 881-5.

Staiger H, Machicao F, Stefan N, Tschritter O, Thamer C, Kantartzis K, et al. (2007) Polymorphisms within Novel Risk Loci for Type 2. Diabetes Determine b-Cell Function. *PLoSone* 9, 832.

Stern SE, Williams K, Ferrannini E, DeFronzo RA, Bogardus C, Stern MP (2005) Identification of Individuals With Insulin Resistance Using Routine Clinical Measurements. *Diabetes* 54, 333-39.

Valenzuela RB, Pérez FB, Ruz MO (2012) Zinc y diabetes: un nutriente importante en su prevención y tratamento. *Rev. chil. endocrinol. Diabetes* 5, 2, 76-81.

Vitoux D, Arnaud J, Chappuis P (1999) Are Copper, Zinc and Selenium in Erythrocytes Valuable Biological Indexes of Nutrition and Pathology? *J. Trace Elements Med.* BioI 13, 113- 128.

Walter Jr RM, Uriu-Hare JY, Olin KL, Oster MH, Anawalt BD, Critchfield JW, Keen CL (1991) Copper, Zinc, Manganese, and Magnesium Status and Complications of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 14, 1050-1056.

Whitehouse RC, Prasad AS, Rabbani PI *et al*. (1982) Zinc in plasma, neutrophils, lymphocytes and erythrocytes as determined by flameless atomic absorption spectrophotometry. *Clin. Chem* 28, 3, 475-480.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2000) Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. Geneva, p.253.

Willet WC (1998) Inssues in analysis and presentation of dietary data. In: Nutritional Epidemiology. *New York: Oxford University Press* 321-345.

Williams NR, Rajput-Williams J, West JA, Nigdikar SV, Foote JW, Howard AN (1995) Plasma, Granulocyte and Mononuclear Cell Copper and Zinc in Patients With Diabetes Mellitus. *Analyst* 120, 887-90.

Xiang J, Li X, Xu M, Hong J, Huang Y, Tan J, Lu X, Dai M, Yu B, Ning G (2008) Zinc Transporter-8 Gene (SLC30A8) Is Associated with Type 2 Diabetes in Chinese. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 10, 4107–4112.

Yahya H, Yahya KM, Saqib A (2011) Minerals And Type 2 Diabetes Mellitus – Level Of Zinc, Magnesium And Chromium In Diabetic And Non Diabetic Population. *JUMDC* 2, 1, 34-38.

ARTIGO 2 – Deficiência em zinco está relacionada com a piora no controle glicêmico de indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2).

Resumo

Estudos têm mostrado que o *status* de zinco deficiente pode contribuir para a piora do controle glicêmico, pois distúrbios metabólicos associados com a resistência à insulina e a consequente hiperglicemia podem estar relacionadas à deficiência desse mineral e a elevados percentuais de hemoglobina glicada. Assim, este estudo teve como objetivo relacionar os parâmetros insulinêmicos e glicêmicos ao *status* nutricional de zinco em indivíduos com DM2. Foram avaliados 82 indivíduos entre 29 e 59 anos, de ambos os sexos. Para avaliação do *status* nutricional de zinco foi determinada a concentração de zinco no plasma, eritrócitos e urina por meio do método de espectrometria de absorção atômica de chama e a avaliação da ingestão alimentar por meio do recordatório de 24 horas em três dias não consecutivos e um dia de final de semana. A determinação das concentrações séricas de glicose (mg/dL), da hemoglobina glicada (%) e colesterol total e frações foi realizada utilizando kits comerciais. A insulina sérica foi avaliada pelo método de imunoensaio tipo sanduíche utilizando quimiluminescência. Em seguida, realizou-se o cálculo do índice de resistência à insulina (HOMA-IR) e da função das células (HOMA β). Observou-se correlação inversa e significativa entre as variáveis zinco no plasma e o percentual de hemoglobina glicada (r= -0,325, p= 0,003) e positiva entre a excreção de zinco na urina e a glicose sérica (r=0,269, p= 0,016), e o percentual de hemoglobina glicada (r=0,318, p= 0,004) e HOMA-IR (r=0,289, p= 0,009). Portanto, estes resultados nos permitem concluir que o *status* de zinco dos pacientes com DM2 deste estudo foi deficiente e correlacionado ao pior controle glicêmico.

Palavras-chave: zinco, diabetes *mellitus* tipo 2,glicemia, insulina, HOMA.

Zinc deficiency is related to the worsening glycemic control in individuals with diabetes mellitus type 2 (DM2).

Abstract

Studies have shown that the poor zinc status may contribute to worsening of glucose control, as metabolic disorders associated with insulin resistance and the consequent hyperglycemia may be related to deficiency of this mineral and the high percentage of glycated hemoglobin. This study aimed to relate the insulinemic and glycemic parameters to the nutritional status of zinc in patients with DM2. We evaluated 82 individuals between 29 and 59 years, of both sexes. For evaluation of zinc nutritional status was determined by the concentration of zinc in plasma, erythrocytes and urine by means of atomic absorption flame spectrometry method and the evaluation of feed intake through the 24-hour recall on three non-consecutive days and weekend day. The determination of serum glucose (mg / dl), glycated hemoglobin (%) and total cholesterol fractions was performed using commercial kits. Serum insulin was measured by sandwich immunoassay method using chemiluminescence. Then he carried out the calculation of insulin resistance (HOMA-IR) and cell function (HOMA β). There was a significant inverse correlation between plasma zinc variables and the percentage of glycated hemoglobin ($r = -0.325$, $p = 0.003$) and positive between the zinc excretion in urine and serum glucose ($r = 0.269$, $p = 0.016$), and the percentage of glycated hemoglobin ($r = 0.318$, $p = 0.004$) and HOMA-IR index ($r = 0.289$, $p = 0.009$). Therefore, these results allow us to conclude that zinc status of patients with DM2 of this study was deficient and correlated with worse glycemic control.

Keywords: Zinc, type 2 diabetes mellitus, blood glucose, insulin, HOMA.

Introdução

Alterações na homeostase de zinco em pacientes com diabetes têm sido observadas ao longo dos anos (KINLAW et al., 1983; AL-MAROOF; AL-SHARBATTI, 2006; WALTER JR et al., 1991; AL-TIMINI e MAHMOUD, 2011; SINHA e SEN, 2014), principalmente, pela deficiência desse mineral no plasma e pela hiperzincúria (JANSEN et al., 2009; CHIMIENTI, 2013; CAPDOR et al., 2013). Esses distúrbios no metabolismo do zinco também têm sido associados ao deficiente controle metabólico da doença (SINHA e SEN, 2014).

A relação estabelecida do zinco no metabolismo da glicose se dá pela sua participação na cristalização e sinalização da insulina. Em condições fisiológicas, a quantidade de zinco no pâncreas é abundante, e se concentra principalmente nas vesículas secretórias de insulina, pois esse mineral compõe a estrutura desse hormônio, servindo para estabilizar e minimizar a susceptibilidade ao dano oxidativo (WIJESEKARA; CHIMIENTI; WHEELER, 2009; CHIMIENTI, 2013). Além disso, tem-se associado à participação do zinco na sensibilidade à insulina por ativar a cascata do PI3K/Akt (Phosphoinositol-3-Kinase/proteína kinase B). Isto foi observado em adipócitos e fibroblastos de ratos (TANG e SHAY, 2001) e em hepatócitos (WALTER et al., 2006) e células de pulmão humano (WU et al., 2003). A ativação dessa cascata contribui para a regulação do transporte da glicose, síntese de glicogênio, gliconeogênese, lipogênese e síntese de proteína.

Estudos mostram que concentrações de zinco reduzidas no plasma e/ou soro estão associadas à redução da sensibilidade à insulina, o que favorece a hiperglicemia. A suplementação com o zinco tem mostrado que esse mineral melhora os parâmetros glicêmicos como percentual de hemoglobina glicada e glicose (JAYAWARDENA et al., 2012; CAPDOR et al., 2013; MARUTHUR et al, 2015). Em meta-análise realizada com estudos de suplementação de zinco em indivíduos com DM2, foi observada modesta redução nos valores de glicose e uma tendência para diminuição do percentual de hemoglobina glicada (CAPDOR et al., 2013).

O entendimento da relação entre o *status* nutricional de zinco e os parâmetros insulinêmicos e/ou glicêmicos poderá trazer maior conhecimento da

participação desse mineral na homeostase da glicose. Nesse sentido, este estudo teve como objetivo avaliar o *status* de zinco de pacientes com DM2 por meio das concentrações de zinco no plasma, eritrócitos e urina além da ingestão alimentar e sua relação com os parâmetros de controle glicêmico.

Material e Métodos

População do estudo

Foram avaliados 82 indivíduos com idades entre 29 e 59 anos, de ambos os gêneros, voluntários, que fazem acompanhamento clínico no Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, inseridos no estudo por demanda espontânea e de acordo com os critérios de inclusão, os quais foram: presença de DM2 sem estar fazendo uso de insulina, adultos, não fumantes e que não fizessem uso de bebida alcoólica de forma regular, além da ausência de outras doenças crônicas não transmissíveis, como artrite reumatoide, doenças renais e da tireoide, psoríase e câncer, que pudessem interferir no estado nutricional dos indivíduos em relação ao zinco.

Este estudo foi conduzido de acordo com as diretrizes estabelecidas pela Declaração de Helsinki e todos os procedimentos envolvendo os pacientes avaliados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo sob o parecer 414.203. O consentimento livre e esclarecido foi obtido de todos os participantes do estudo.

Avaliação Antropométrica

Foram realizadas medidas antropométricas de peso (kg) e estatura (cm), segundo metodologia de Frisancho (1990). Em seguida, realizou-se o cálculo do Índice de Massa Corpórea (IMC) e o resultado foi classificado de acordo com o proposto pela Organização Mundial de Saúde - OMS (WHO, 2000). Para avaliar o percentual de gordura, foi utilizado o analisador de composição corporal tetrapolar da marca Biospace, modelo In Body 720 e os resultados foram baseados nos pontos de corte recomendados por Pollock e Wilmore

(1993). A avaliação da medida de circunferência da cintura (CC) foi classificada segundo os valores de referência propostos pela OMS (WHO, 2000).

Avaliação da ingestão alimentar de zinco

O método utilizado para avaliar a ingestão alimentar foi o recordatório de 24h, o qual foi obtido de três dias não consecutivos, sendo dois dias durante a semana e um dia no final de semana. A análise dos alimentos consumidos pelos participantes da pesquisa foi feita com o auxílio do *Software* NutWin, versão 2.5. A adequação da dieta em relação ao zinco foi avaliada a partir de comparações com a Necessidade Média Estimada (*Estimated Average Requirement* – EAR) e os macronutrientes com o Intervalo aceitável da distribuição de macronutrientes (*Acceptable Macronutrient Distribution Range* - AMDR), conforme proposto pelo *Institute of Medicine* proposta pelo *Institute of Medicine* (IOM, 2001; 2005). Também foi realizado o ajuste dos valores de zinco pela energia das dietas (WILLET, 1998).

Obtenção das amostras

Sangue

Após jejum de 10 a 12h, foram colhidos 20 mL de sangue dos participantes, em tubo com anticoagulante heparina sódica livre de elementos traço para análise de zinco, tubo com EDTA para determinação da hemoglobina glicada e tubo sem anticoagulante para análise das concentrações de insulina, glicose e colesterol e frações. A obtenção do plasma para a determinação de zinco, foi a partir da centrifugação a 3.000 rpm durante 15 minutos a 4ºC. Em seguida, a massa eritrocitária obtida foi lavada três vezes com 3 mL de solução com NaCl à 0,9%, homogeneizada lentamente por inversão e centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos a 4ºC, sendo o sobrenadante descartado. As amostras de sangue total e de soro foram armazenadas em microtubos estéreis, as de plasma e massa eritrocitária foram acondicionadas em microtubos desmineralizados e todas as amostras foram armazenadas à -80ºC.

Urina

Os participantes foram orientados a coletarem a urina durante 24 horas para a determinação da concentração de zinco. No laboratório foi medido o volume e retirou-se uma alíquota para análise, que também foi mantida à -80ºC.

Determinação da concentração de zinco no plasma, eritrócitos e urina

A determinação da concentração de zinco no plasma, eritrócito e urina foi realizada por meio do método de espectrometria de absorção atômica de chama, conforme metodologia proposta por Rodriguez et al. (1989), Whitehouse et al. (1982), adaptada por Cordeiro (1994) e por Kiilerich et al. (1980), respectivamente. Como padrão de análise, foi utilizado o Tritizol® (MERCK®). Uma curva padrão de zinco foi preparada utilizando as seguintes concentrações: 0,01; 0,02; 0,03; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5 μg/mL, diluídas em água nanopura. Para a análise de zinco no plasma, acrescentou-se à curva de calibração solução de glicerol a 3%. Os resultados das análises desse mineral no plasma e eritrócitos foram expressos em μg/dL e μgZn/g Hb, respectivamente. Para isso, foi determinada a concentração de hemoglobina nos eritrócitos. A concentração de zinco na urina foi transformada em μgZn/24h, considerando o volume urinário de 24h. O controle da metodologia da análise de zinco foi avaliado pelo material de referência certificado SERONORM® (*Serum, Whole blood e Urine*).

Parâmetros glicêmicos e lipídicos

A determinação da concentração sérica de glicose (mg/dL) foi realizada pelo método enzimático, e a determinação da hemoglobina glicada (%), por reação enzimática, utilizando kits comerciais (Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). As concentrações de colesterol plasmático total, HDL-colesterol e triglicerídeos também foram analisadas por métodos enzimáticos comerciais (Labtest, Lagoa Santa-Minas Gerais, Brasil). O colesterol contido na HDL foi determinado após a precipitação da fração LDL e dos triglicerídeos (TG). A fração LDL foi calculada utilizando-se a equação de Friedwald, Levy e Fredrickson (1972), sendo: LDL-c = colesterol total – HDLc – TG/5.

Determinação de insulina sérica e cálculos do Homeostasis Model Assessment (*HOMA)*

A concentração de insulina sérica foi determinada pelo método de Imunoensaio tipo sanduíche utilizando quimiluminescência (Advia Centaur Siemens ®). Para avaliação do índice de resistência à insulina e da função das células β foram realizados os cálculos do HOMA-IR (resistência a insulina) e HOMA β (função das células beta) (MATTEWS, 1985), respectivamente pelas seguintes fórmulas: HOMA-IR = Glicemia (mMol) × Insulina (µU/mL) ÷ 22,5 e HOMA β = 20 x Insulina (µU/mL) ÷ Glicemia (mMol) – 3,5. A glicemia de jejum foi determinada conforme metodologia descrita anteriormente.

Avaliação Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *software Statistical Package for the Social Sciences,* versão 14.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

Os resultados foram apresentados em média, desvio padrão e em frequências absoluta e relativa. Realizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para testar a normalidade. O coeficiente de correlação linear de Pearson foi utilizado para verificar as correlações entre os parâmetros do *status* nutricional relativo ao zinco com os parâmetros insulinêmicos e glicêmicos.

Foi realizado o teste de ANOVA e após fez-se as comparações múltiplas pelo Teste de Tukey. Os biomarcadores do *status* de zinco foram classificados em tercis: I, II e III e comparados aos parâmetros insulinêmicos e glicêmicos.

Em relação ao teor de zinco ingerido, foi feito o ajuste pela energia fornecida pela dieta pelo método residual proposto por Willet (1998), usando regressão linear simples.

Foi adotado um valor de confiança fixo de 95% ($p<0,05$), sendo considerados significativos.

Resultados

Na tabela 1 estão apresentadas as características clínicas, bioquímicas do controle glicêmico e do *status* de zinco dos participantes. Após seleção, foram incluídos 82 pacientes entre 29 e 59 anos com DM2.

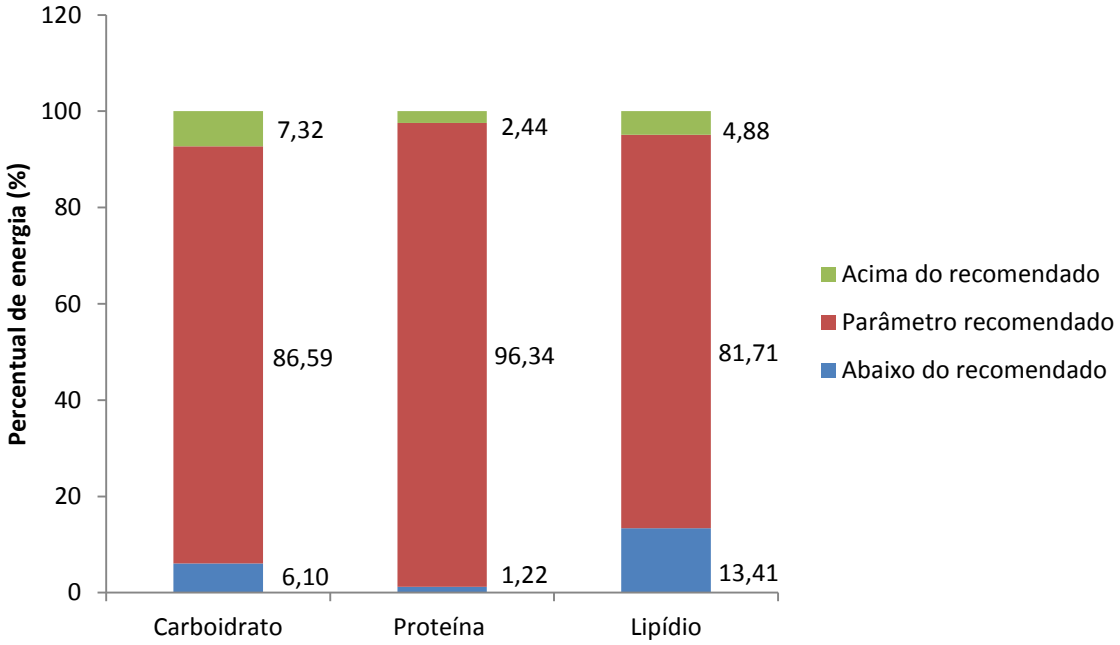
Tabela 1. Características clínicas, bioquímicas do controle glicêmico e do *status* de zinco dos indivíduos com DM2.

Variáveis	DM2 (n=82)
Gênero	
Masculino, n (%)	51(62)
Idade (anos)	50,7±6,9
Tempo de diagnóstico da doença (anos)	7,3 ± 6,8
História familiar de diabetes, n (%)	69 (84,1)
Hipertensos, n (%)	43 (52,4)
Peso (kg)	81,4±19,4
Estatura (cm)	166,0±10,0
IMC (kg/(m)^2)	29,1±5,3
Circunferência da Cintura (cm)	97,5±12,6
Gordura corporal (%)	35,0±9,2
Glicose sérica (mg/dL)	150,3±53,6
Hemoglobina glicada (%)	8,1±1,2
Insulina sérica (µUI/mL)	17,4±10,6
HOMA-IR	6,5±4,5
HOMA-B	42,3±30,7
Colesterol Total (mg/dL)	188,5±62,5
HDL (mg/dL)	44,5±11,7
Triglicerídeos (mg/dL)	161,6±125,3
LDL (mg/dL)	108,6±44,4
Zn Plasmático (µg/dL)	83,3±11,9
Zn Urinário (µg Zn/24h)	899,1±622,4
Zn Eritrocitário (µg/g Hb)	30,1±4,6
Zn dietético (mg/dia)	9,9±0,8

Os resultados foram apresentados em frequência absoluta (n) e relativa (%) para dados categóricos, e em média e desvio padrão para os demais resultados. Pontos de corte: Circunferência da Cintura (cm): Homens:<94 e Mulheres: <80 (ABESO, 2010); Glicose: <100mg/dl e Hemoglobina glicada: <6,5% (ADA, 2015); HOMA-IR: >4,65 (Stern, 2005); Colesterol Total: <200 mg/dL; HDL: >60 mg/dL; Triglicerídeos: <150 mg/dL; LDL: <100 mg/dL (SBC, 2013); Zinco plasmático e urinário: 70 a 110 µg/dL e 300 a 600 µg Zn/24h (Gibson, 2005); Zinco Eritrocitário: 40 a 44 µg/g Hb (Guthrie e Picciano, 1994); Zinco dietético (EAR): Homens: 9,4 mg/dia e Mulheres: 6,8 mg/dia (IOM, 2001).

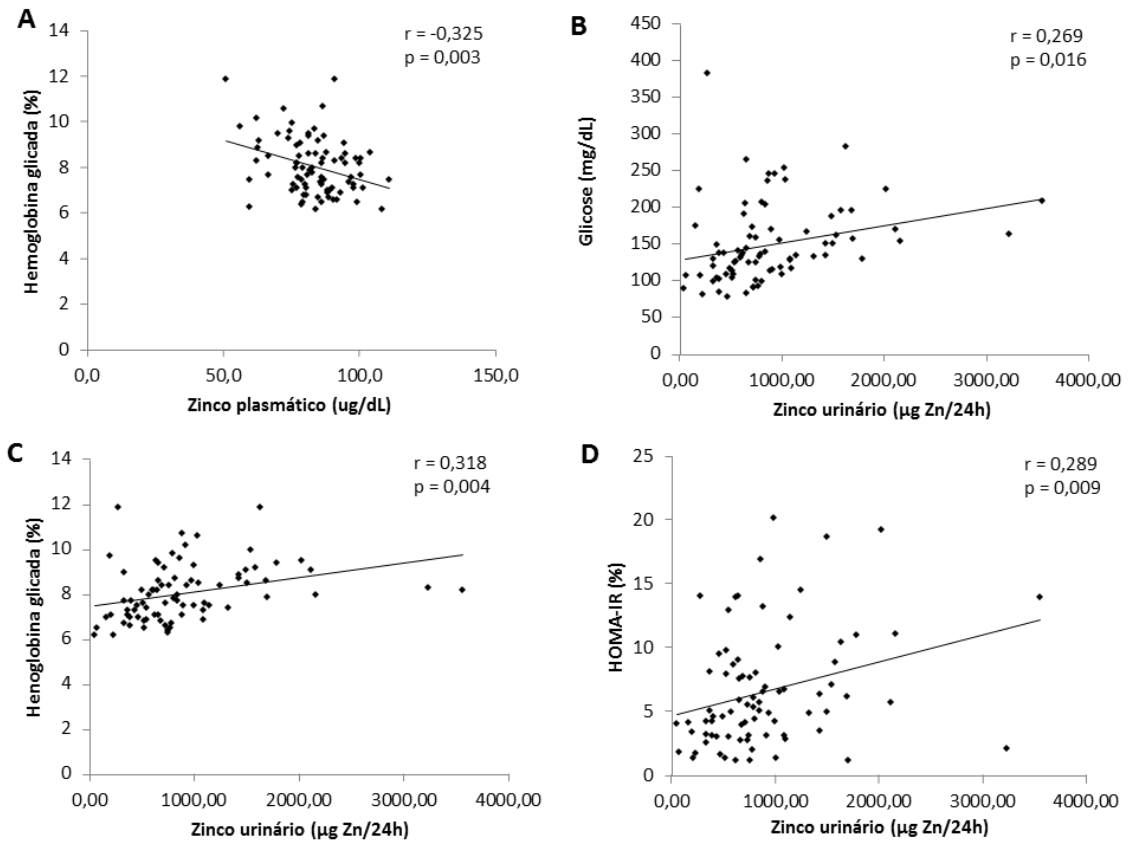
Em relação à ingestão de zinco pela dieta, não houve inadequação no grupo de mulheres e o percentual de inadequação para homens foi de 23%. A figura 1 mostra a ingestão recomendada de macronutrientes: carboidratos proteínas e lipídeos.

Figura 1. Proporção de indivíduos com DM2 de acordo com a recomendação de contribuição energética de macronutrientes avaliados nas dietas (n=82). Legenda: Intervalo aceitável da distribuição de macronutrientes de acordo com a energia total ingerida (IOM, 2005): Carboidratos: 45 a 65%; Proteína: 10 a 35%; e Lipídios: 20 a 35%.



Observou-se correlação inversa e significativa entre as variáveis de zinco plasmático e o percentual de hemoglobina glicada (r= -0,325; p= 0,003) e positiva entre zinco urinário e os parâmetros de glicose sérica (r=0,269; p= 0,016), e de percentual de hemoglobina glicada (r=0,318; p= 0,004) e HOMA-IR (r=0,289; p= 0,009) (Figura 2).

Figura 2. Correlações* entre as concentrações de zinco no plasma e percentual de hemoglobina glicada (A), de zinco urinário e glicose sérica (B), percentual de hemoglobina glicada (C) e o HOMA-IR (D). Legenda: *Linear de Pearson



Os resultados dos parâmetros glicêmicos e insulinêmicos dos indivíduos com DM2 foram distribuídos de acordo com os Tercis dos parâmetros bioquímicos do *status* de zinco (Tabela 2).

Indivíduos com concentrações plasmáticas e eritrocitárias de zinco no tercil III, ou seja, com os maiores valores de zinco, tiveram menores percentuais de hemoglobina glicada ($p<0,05$). Isto também foi observado nos indivíduos com menor excreção urinária de zinco (tercil I), pois apresentaram menores valores de glicemia de jejum, percentuais de hemoglobina glicada e menor resistência à insulina ($p<0,05$). Resultados que corroboram com as correlações citadas acima.

Tabela 2. *Status* de zinco no plasma, eritrócitos, urina e zinco dietético em relação aos parâmetros insulinêmicos e glicêmicos de indivíduos com DM2.

	Tercil I	**Tercil II**	**Tercil III**	
	n = 27	**n = 28**	**n=27**	**p***
Zinco Plasmático (µg/dL)				
Glicemia (mg/dL)	156,56±63,75	147,75±48,30	146,60±50,23	0,76
Insulina sérica (µUI/mL)	17,44±10,37	18,19±10,63	16,63±11,18	0,86
Hemoglobina Glicada (%)	8,56±1,32 [a]	7,98±1,13 [ab]	7,68±1,15 [b]	0,03
HOMA-B	40,68±29,40	45,16±32,36	40,91±31,02	0,83
HOMA-IR	6,86±4,90	6,58±4,42	6,04±4,41	0,80
Zinco Eritrocitário (µg/g Hb)				
Glicemia (mg/dL)	144,52±46,74	156,82±61,40	149,22±53,75	0,70
Insulina (µUI/mL)	16,24±11,08	16,13±8,12	19,98±12,25	0,32
Hemoglobina Glicada (%)	8,06±1,18 [ab]	8,55±1,32 [a]	7,60±1,06 [b]	0,02
HOMA-B	38,81±29,52	37,80±25,30	50,42±35,89	0,24
HOMA-IR	5,95±4,35	6,16±3,52	7,38±5,58	0,46
Zinco Urinário (µg Zn/24h)				
Glicemia (mg/dL)	129,81±59,88[a]	150,59±50,59[ab]	169,96±46,51[b]	0,025
Insulina sérica (µUI/mL)	16,65±10,74	16,89±8,19	19,60±12,52	0,532
Hemoglobina Glicada (%)	7,50±1,21[a]	8,08±1,25[ab]	8,64±1,08[b]	0,003
HOMA-B	48,93±37,40	40,15±23,90	40,27±29,75	0,497
HOMA-IR	5,12±3,48 [a]	6,43±4,05 [ab]	8,21±5,44 [b]	0,042
Zinco Dietético (mg/dia)				
Glicemia (mg/dL)	149,12±54,48	139,73±56,24	163,04±50,05	0,267
Insulina sérica (µUI/mL)	17,30±11,23	17,14±10,69	17,87±10,35	0,966
Hemoglobina Glicada (%)	8,10±1,43	8,00±1,28	8,14±1,03	0,914
HOMA-B	42,13± 30,53	44,85±32,42	39,58±29,67	0,814
HOMA-IR	6,47±4,79	5,87±4,17	7,20±4,75	0,548

Legenda: * teste de ANOVA; teste de Tukey; valor considerado significativo menor que 0,05.

Zinco plasmático (µg/dL): Tercil I (< 79,07); Tercil II (79,07 a 87,81); Tercil III (> 87,81).

Zinco eritrocitário (µg/g Hb): Tercil I (< 28,16); Tercil II (28,16 a 31,04); Tercil III (> 31,04).

Zinco urinário (µg Zn/24h): Tercil I (< 610,61); Tercil II (610,61 a 932,37); Tercil III (> 932,37).

Zinco dietético (mg/dia): Tercil I (<9,5); Tercil II (9,5 a 10,16); Tercil III (> 10,16).

Discussão

Pesquisas anteriores mostram que o zinco está ligado ao controle glicêmico em indivíduos com DM2 (OH e YOON, 2008; AL-TIMINI e MAHMOUD, 2011; CAPDOR et al., 2013). Neste estudo foram encontradas correlações e comparações significativas entre o *status* nutricional de zinco com os parâmetros glicêmicos e insulinêmicos em indivíduos com DM2.

As concentrações de zinco no plasma se mostraram adequadas, resultado semelhante ao encontrado em indivíduos com DM2 também residentes no Brasil (LIMA et al., 2011). No entanto, a maioria dos estudos de outras nacionalidades mostra que os indivíduos com DM2 são deficientes nesse mineral quando avaliados pelas concentrações no plasma e/ou soro (SOINIO et al., 2007; VIKTORÍNOVÁ et al., 2009).

Diante disso, cabe mencionar que o plasma pode sofrer inúmeras influências em resposta a várias situações como: o estresse oxidativo, dieta, infecções e a presença de inflamação. Sob este último aspecto, ressalta-se que o DM2 é uma doença inflamatória, de tal modo que o zinco no plasma desses indivíduos está susceptível a apresentar alterações (IZiNCG, 2004; LOWE, FEKETE, DECSI, 2009; ESSER et al., 2014).

O estado nutricional relativo ao zinco é comumente avaliado pelas suas concentrações no plasma ou soro. No entanto, esta avaliação reflete o *status* em curto período de tempo e é dependente da ingestão desse mineral. Alimentos proteicos são fontes de zinco, sendo melhores quando proveniente de fonte animal. Cabe salientar que a qualidade e quantidade da proteína presente na alimentação está associada a absorção desse mineral (SANDSTRON, 2001; LOWE, FEKETE, DECSI, 2009; GIBSON, 2012; SHAN et al., 2014).

Recomenda-se a avaliação de três ou mais biomarcadores para avaliação do estado nutricional do indivíduo relativo ao zinco (GIBSON, 2012), já que ainda não se chegou a um consenso definitivo de qual seria o padrão ouro (WHO/UNICEF/IAEA/IZiNCG, 2007). Assim, neste estudo, buscou-se avaliar a concentração de zinco no plasma, nos eritrócitos, urina e na dieta para melhor caracterizar o *status* dos participantes relativo a esse mineral, uma vez que

estudos mostram que a deficiência em zinco pode causar uma piora dos parâmetros glicêmicos (VIKTORÍNOVÁ et al., 2009; CAPDOR et al., 2013; SAHARIA e GOSWAMI, 2013). Assim, observou-se que os pacientes com maiores concentrações de zinco no plasma tiveram pior controle glicêmico verificado pelo percentual de hemoglobina glicada.

De acordo com a ADA (2015), a redução no percentual de hemoglobina glicada reduz as complicações microvasculares do diabetes, contudo, o estabelecimento de uma terapêutica em torno de 8% de hemoglobina glicada se deve a presença de fatores que impedem melhor controle glicêmico como: história de hipoglicemia grave, expectativa de vida limitada, complicações macro ou microvasculares e alta variabilidade glicêmica. Neste estudo, o percentual médio de hemoglobina glicada encontrado nos indivíduos está 1% acima da meta terapêutica proposta para essa população.

Estudos *in vivo* têm sido realizados para avaliar a participação do zinco nos mecanismos secretórios da insulina. Em células de adipócitos, foi observado que o tratamento com o zinco foi capaz de induzir o aumento do transporte de glicose nestas células atuando como um potencializador desse processo, possivelmente por meio da via da sinalização de insulina (TANG E SHAY, 2001).

Em concordância a isso, os estudos têm mostrado que indivíduos com um bom controle glicêmico apresentam melhores concentrações de zinco quando comparados àqueles com pior controle glicêmico (AL-TIMIMI e MAHMOUD, 2011). Para melhor compreensão, desde a descoberta do transportador de zinco 8 (ZnT8), por Chimienti (2004), estudos tentam esclarecer o mecanismo exato desse transportador, até o momento sabe-se que ele é específico das células beta pancreáticas e sua função é levar o zinco do citoplasma para fora da célula ou para vesículas intracelulares, sendo então, um componente importante no processo de armazenamento e secreção da insulina e homeostase da glicose.

Indivíduos com diabetes apresentam distúrbios metabólicos, sendo que a concentração eritrocitária de zinco seria mais interessante que a do plasma para avaliar o estado nutricional desses pacientes relativo a esse mineral (KRUSE-JARRES & RUKGAUER, 2000). Observou-se neste estudo que os

pacientes com menores concentrações de zinco nos eritrócitos tiveram pior percentual de hemoglobina glicada quando comparado aqueles com melhor *status* de zinco. A elevada excreção de zinco na urina sugere que pode ser devido à hiperglicemia persistente. A glicemia elevada pode afetar o sistema renal, e estudos tem mostrado que, em geral, indivíduos com diabetes apresentam hiperzincúria (NSONWU et al. 2006; JANSEN et al., 2012; JUROWSKI, 2014).

Quilliot et al. (2001) avaliaram indivíduos com DM2 diagnosticados com pancreatite crônica, uma das consequências da hiperglicemia, e notaram aumento na excreção urinária de zinco nessa população. Neste estudo, as maiores concentrações de glicose e percentual de hemoglobina glicada, foram observadas nos indivíduos que estavam excretando maiores quantidades de zinco na urina.

Outra relação estabelecida foi entre o *status* de zinco e a resistência à insulina. Os resultados mostraram correlação positiva entre a excreção urinária de zinco com o índice HOMA-IR. Embora poucos estudos analisem essa relação em indivíduos com DM2, torna-se necessário esclarecer o mecanismo detalhado desse processo, pois parece que quanto maior a concentração de zinco na urina, maior é a resistência á insulina (WIJESEKARA; CHIMIENTI; WHEELER, 2009; YAHYA; YAHYA; SAQIB, 2011).

Na literatura, um estudo com mulheres obesas verificou que após suplementação de zinco, os valores do índice HOMA-IR foram reduzidos, o que mostra a participação do zinco na sensibilidade à insulina (MARREIRO et al., 2006). Neste estudo, essa relação foi verificada nos indivíduos com menor excreção de zinco na urina, ou seja, apresentaram menor resistência à insulina em comparação com aqueles que tinham maior excreção de zinco. Entretanto, Kim e Lee (2012) não observaram resultados significativos, após suplementação com 30 mgZn/dia por 8 semanas, entre a excreção urinária de zinco e a resistência á insulina em mulheres obesas .

Assim, o planejamento de estratégias que busquem a adequação do *status* nutricional relativo ao zinco de indivíduos com DM2 pode favorecer o controle glicêmico, a fim de prevenir ou minimizar as complicações que essa doença causa nessa população.

Conclusão

O *status* de zinco dos indivíduos avaliados com DM2 foi considerado deficiente. Além disso, as menores concentrações de zinco no plasma e eritrócitos, bem como a sua elevada excreção na urina relacionaram-se com maiores percentuais de hemoglobina glicada, refletindo em pior controle glicêmico, evidenciando a participação do zinco no metabolismo da glicose.

Referências

Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica Diretrizes brasileiras de obesidade 2009/2010 / ABESO - Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. - 3.ed. AC Farmacêutica, 2009.

Al-Maroof RA, Al-Sharbatti SS. Serum zinc levels in diabetic patients and effect of zinc supplementation on glycemic control of type 2 diabetics. Saudi Med J 2006**,** 27: 344–50.

Al-Timimi DJ, Mahmoud HM. Evaluation Of Zinc Status Among Patients With Diabetes Mellitus. Duhok Med J 2011; 5:2: 1-10.

American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes - 2015. Diabetes Care; 2015; 38: 1:S1-90.

Capdor J, Foster M, Petocz P, Samman S. Zinc and glycemic control: A meta-analysis of randomised placebo controlled supplementation trials in humans. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 2013; 27:137– 142.

Chimienti F, Devergnas S, Favier A, Seve M. Identification and Cloning of a beta-Cell–Specific Zinc Transporter, ZnT-8, Localized Into Insulin Secretory Granules. Diabetes 2004; 53: 2330–2337.

Chimienti F. Zinc, pancreatic islet cell function and diabetes: new insights into an old story. Nutrition Research Reviews 2013; 26:1–11.

Cordeiro MBC. Adequação alimentar e avaliação do estado nutricional em relação ao zinco em grupo de idosos institucionalizados. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo 1994.

Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. Diabetes Res Clin Pract 2014; 1-10.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem 1972;18:499-502.

Frisancho AR. Anthropometric standards for the assessment of growth and nutritional status. Ann Arbor: The University of Michigan Press 1990, 48-53.

Gibson RS. Principles of nutritional assessment. 2 ed. New York: Oxford University Press 2005.

Gibson R S. A Historical Review of Progress in the Assessment of Dietary Zinc Intake as an Indicator of Population Zinc Status. American Society for Nutrition. Adv. Nutr. 2012; 3: 772–782.

Guthrie H A, Picciano M F. Micronutrient minerals. In: Guthrie, H. A.; Picciano, M. F. Human nutrition. 1. ed. New York: Mosby, 1994; 351-357.

International Zinc Nutrition Consultative Group (IZiNCG). Assessment of the Risk of Zinc Deficiency in populations and Options for Its Control. Food and Nutrition Bulletin 2004; 25: 2.

IOM - INSTITUTE OF MEDICINE OF THE NATIONAL ACADEMIES. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington, DC 2001.

Jansen J, Karges W, Rink L. Zinc and diabetes - Clinical links and molecular mechanisms. Journal of Nutritional Biochemistry 2009; 20: 399–417.

Jansen J, Rosenkranza E, Overbecka E, Warmuthb S, Mocchegianic E, Giacconic R et al. Disturbed zinc homeostasis in diabetic patients by in vitro and in vivo analysis of insulinomimetic activity of zinc. Journal of Nutritional Biochemistry 2012; 23:1458–1466.

Jayawardena R, Ranasinghe P, Galappatthy P, Malkanthi RLDK, Constantine GR, Katulanda P. Effects of zinc supplementation on diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. Diabetology & Metabolic Syndrome 2012, 4:13: 1-11.

Jurowski K, Szewczyk B, Nowak G, Piekoszewski W. Biological consequences of zinc deficiency in the pathomechanisms of selected diseases. J Biol Inorg Chem 2014; 1-11.

Kiilerich S, Christensen MS, Naestoft J, Christianse C. Determination of zinc in serum and urine by atomic absorption spectrophotometry; relationship between serum levels of zinc and proteins in 104 normal subjects. Clin Chim Acta 1980; 105: 231-239.

Kim J and Lee S. Effect of zinc supplementation on insulin resistance and metabolic risk factors in obese Korean women. Nutrition Research and Practice 2012; 6: 3: 221-225.

Kinlaw WB, Levine AS, Morley JE, Silvis SE, Mcclain CJ. Abnormal Zinc Metabolism in Type II Diabetes Mellitus. The American Journal of Medicine 1983, 75: 273-77.

Kruse-Jarres JD, Rükgauer M. Trace elements in diabetes mellitus. Peculiarities and clinical validity of determinations in blood cells. J Trace Elem Med Biol New York 2000; 14:1: 21-27.

Lima VBS, Sampaio FA, Bezerra DLC, Neto JMM, Marreiro DN. Parameters of glycemic control and their relationship with zinc concentrations in blood and with superoxide dismutase enzyme activity in type 2 diabetes patients. Arq Bras Endocrinol Metab 2011; 55: 9: 701-707.

Lowe NM, Fekete K, Decsi T. Methods of assessment of zinc status in humans: a systematic review. Am J Clin Nutr 2009; 89: 2040S–2051S.

Marreiro DN, Geloneze B, Tambascia MA, Lerário AC, Halpern A, Cozzolino SM. Effect of zinc supplementation on serum leptin levels and insulin resistance of obese women. Biol Trace Elem Res 2006;112:109-18.

Marreiro DN, Martins MPSC, Sousa SSR, Ibiapina V, Torres S, Pires, L.V, et al. Urinary Excretion of Zinc and Metabolic Control of Patients with Diabetes Type 2. Biol Trace Elem Res 2007; 120: 42–50.

Maruthur NM, Clark JM, Fu M et al. Effect of zinc supplementation on insulin secretion: interaction between zinc and SLC30A8 genotype in Old Order Amish. Diabetologia 2015, 58: 295–303.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia. 1985; 28: 7: 412-9.

Nsonwu AC,Usoro CAO, Etukudo MH, Usoro IN. Glycemic Control and Serum and Urine Levels of Zinc and Magnesium in Diabetics in Calabar, Nigeria. Pakistan Journal of Nutrition 2006; 5:1: 75-78.

Oh HM e Yoon JS. Glycemic control of type 2 diabetic patients after short-term zinc supplementation. Nutrition Research and Practice 2008, 2:4: 283-288.

Pollock M & Wilmore JH. Exercícios na saúde e na doença: avaliação e prescrição para prevenção e reabilitação. 2. ed. Rio de Janeiro: MEDSI1993.

Quilliot D, Dousset B, Guerci B, Dubois F, Drouin P, Ziegler O. Evidence that diabetes mellitus favors impaired metabolism of zinc, copper, and selenium in chronic pancreatitis. Pancreas 2001; 22 (3): 299–306.

Rodriguez MP, Narizano A, Demczylo V, Cid A. A simpler method for the determination of zinc human plasma levels by flame atomic absorption spectrophotometry. At Spectrosc 1989; 10: 2: 68-70.

Saharia GK, Goswami RK. Evaluation of Serum Zinc Status and Glycated Hemoglobin of Type 2 Diabetes Mellitus Patients in a Tertiary Care Hospital of Assam. Journal of Laboratory Physicians 2013; 5:1: 30-33.

Shan Z, Bao W, Zhang Y, Rong Y, Wang X, Jin Y, et al. Interactions Between Zinc Transporter-8 Gene (SLC30A8) and Plasma Zinc Concentrations for Impaired Glucose Regulation and Type 2 Diabetes. Diabetes 2014; 63: 1796–1803.

Sinha S e Sen S. Status of zinc and magnesium levels in type 2 diabetes mellitus and its relationship with glycemic status. Int J Diabetes Dev Ctries 2014, 34: 4:220–223.

Sandström B. Diagnosis of zinc defi ciency and excess in individuals and populations. Food and Nutrition Bulletin 2001; 22: 2: 133-37.

Soinio M, Marniemi J, Laakso M, Py K, Lehto S, R¨Onnemaa T. Serum Zinc Level and Coronary Heart Disease Events in Patients With Type 2 Diabetes. Diabetes Care 2007; 30: 523–528.

Tang X, Shay NF. Zinc has an insulin-like effect on glucose transport mediated by phosphoinositol-3-kinase and Akt in 3T3-L1 fibroblasts and adipocytes. J Nutr 2001; 131: 1414–1420.

Vasques ACJ, Rosado LEFPL, Alfenas RCG, Geloneze, B. Análise crítica do uso dos índices do Homeostasis Model Assessment (HOMA) na avaliação da resistência à insulina e capacidade funcional das células-b pancreáticas. Arq Bras Endrocrinol Metab 2008; 52, 1, 32-39.

Viktorínová A, Tošerová E, Križkob M, Ďuračková Z. Altered metabolism of copper, zinc, and magnesium is associated with increased levels of glycated hemoglobin in patients with diabetes mellitus. Metabolism Clinical and Experimental 2009; 58: 1477–1482.

Walter PL, Kampkötter A, Eckers A, Barthel A, Schmoll D, Sies H, Klotz L. Modulation of Fox o signaling in human hepatoma cells by exposure to copper or zinc ions. Archives of Biochemistry and Biophysics 2006; 454: 2: 107–113.

Walter Jr RM, Uriu-Hare JY, Olin KL, Oster MH, Anawalt BD, Critchfield JW, Keen CL. Copper, Zinc, Manganese, and Magnesium Status and Complications of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 1991; 14: 1050-1056.

Whitehouse RC, Prasad AS, Rabbani PI, Cossack ZT. Zinc in plasma, neutrophils, lymphocytes and erythrocytes as determined by flameless atomic absorption spectrophotometry. Clin Chem 1982; 28: 3: 475-480.

WHO/UNICEF/IAEA/IZiNCG. Report of a WHO/UNICEF/IAEA/IZiNCG interagency meeting on zinc status indicators. Food Nutr Bull 2007; 28:S399–S483.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. Geneva 2000: 253.

Wijesekara N, Chimienti F & Wheeler MB. Zinc, a regulator of islet function and glucose homeostasis. Diabetes Obes Metab 2009; 11: 4, 202–214.

Willet WC. Inssues in analysis and presentation of dietary data. In: Nutritional Epidemiology. New York: Oxford University Press 1998, 321-345.

Wu W, Wang X, Zhang W, Reed W, Samet JM, Whang YE, Ghio AJ. Zinc-induced PTEN Protein Degradation through the Proteasome Pathway in Human Airway Epithelial Cells. The Journal of Biological Chemistry 2003; 278: 28258-28263.

Yahya H, Yahya KM, Saqib A. Minerals And Type 2 Diabetes Mellitus –Level Of Zinc, Magnesium And Chromium In Diabetic And Non Diabetic Population. JUMDC 2011; 2: 1: 34-38.

Xavier HT, Izar MC, Faria Neto JR, Assad MH, Rocha VZ, Sposito AC, Fonseca FA, dos Santos JE, Santos RD, Bertolami MC, Faludi AA, Martinez TLR, Diament J, Guimarães A, Forti NA, Moriguchi E, Chagas ACP, Coelho OR, Ramires J AF. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Arq Bras Cardiol 2013.

APÊNDICE A

Dados Socioeconômicos e Nutricionais

ID:

DADOS PESSOAIS

Nome:_____

Endereço:_____

Bairro:_____ Cidade: _____ CEP: _____

Telefone:_____ Celular (DDD e Operadora): _____

Há quanto tempo tem diabetes: _____ Insulina: ☐ SIM ☐ NÃO

Utiliza suplemento vitamínico-mineral? ☐ SIM ☐ NÃO

DADOS SÓCIO-ECONÔMICOS

v.1. Iniciais: _____	**v.1**
v.2. Idade: _____ Data de nascimento: _____/_____/_____	**v.2**
v.3. Estado Civil: 1.( ) Solteiro(a) 2.( ) Casado(a) 3.( ) Separado(a) 4.( ) Viúvo(a)	**v.3**
v.4. Você considera-se (etnia): 1.( ) Branco(a) 2.( ) Negro(a) 3.( ) Pardo(a)/mulato(a) 4.( ) Amarelo (de origem oriental) 5.( ) Indígena	**v.4**
v.5. Grau de instrução: 1.( ) Nenhuma escolaridade. 5.( ) Ens. Médio compl 2.( ) Até o Primário 6.( ) Ens. Médio Incomp 3.( ) Ens. Fund. Incomp. 7.( ).Ens. Superior comp. 4.( ) Ens. Fund. compl. 8.( ) Ens. Superior Incompl.	**v.5**
v.6. Renda Familiar (SM = salário mínimo R$ 678,00): 1.( ) 1 SM 2.( ) De 1 a 5 SM 3.( ) De 5 a 10 SM 4.( ) Acima de 10 SM	**v.6**
v.7. Profissão: _____	**v.7**
v.8. Tabagismo: 1.( ) Nunca fumou 2.( ) Ex-fumante	**v.8**
v.9. Ingestão de bebida alcóolica: 1.( ) Sim 2.( ) Não Frequência: ( ) Até 1 a 2x/mês ( ) 1x/semana ( ) 2 a 3x/semana ou mais	**v.9**
v.10. Nível de Atividade Física: 1.( ) Sedentário 2.( ) Pouco ativo 3.( ) Ativo 4.( ) Muito ativo	**v.10**
v.11. Histórico de doenças na família: 1.( ) Obesidade 2.( ) Diabetes 3.( ) HAS 4.( ) DCV 5.( ) Câncer 6. ( ) Insuficiência Renal 7.( ) Outro: _____	**v.11**
v.12. Hipertensão Arterial: 1.( ) Sim 2.( ) Não	**v.12**

v.13. Doença cardiovascular: 1.( ) Sim 2.( ) Não	**v.13**
v.14. Outra(s) patologia(s): _____	**v.14**
v.15. Medicamentos em uso: 1.( ) Sim 2.( ) Não Se sim, qual? _____	**v.15**

DADOS ANTROPOMÉTRICOS

v.16. Peso (kg): _____	**v.16**
v.17. Altura (m): _____	**v.17**
v.18. IMC (kg/m²): _____	**v.18**
v.19. Classificação nutricional: 1.( ) Eutrofia (18,5<IMC<24,9) 2.( ) Sobrepeso (25<IMC<29,9) 3.( ) Obesidade grau I (30<IMC<34,9) 4.( ) Obesidade grau II (35<IMC<39,9)	**v.19**
v.20. Percentual de gordura corporal: _____	**v.20**
v. 21 Circunferência da cintura (cm) _____	**v.21**

APÊNDICE B

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêutica

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

(Grupo DM2/Grupo Controle)

1. Informações do Sujeito da Pesquisa

Nome:			
Documento de Identidade nº:		Sexo: ( ) M ( )F	
Data de Nascimento: / /			
Endereço:		Nº	Complemento:
Bairro:	Cidade:		Estado:
CEP:	Telefones:		

2. **Título do Projeto de Pesquisa: Título do Projeto de Pesquisa:** "Estudo do polimorfismo Arg325Trp no gene *SLC30A8* do transportador de zinco – 8 (ZnT8) em pacientes com diabetes *mellitus* do tipo 2"	
3. **Duração da Pesquisa:** 7 dias	
4. **Nome do pesquisador responsável:** Silvia Maria Franciscato Cozzolino	
Cargo/ Função: Professora Titular do Programa de Pós-Graduação em Ciências dos alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade São Paulo FCF/USP	**Nº do Registro do Conselho Regional:** CRN3 / 0621
Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade São Paulo - FCF/USP	

DADOS SOBRE A PESQUISA

Meu nome é *Silvia Maria Franciscato Cozzolino*, sou Prof.ª Titular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e quero convidar você para participar do nosso projeto de pesquisa intitulado ***"Estudo do polimorfismo Arg325Trp no gene SLC30A8 do transportador de zinco – 8 (ZnT8) em pacientes com diabetes mellitus do tipo 2",*** com a colaboração da aluna de mestrado *Verônica da Silva Bandeira*. Esta pesquisa é considerada de risco mínimo.

A diabetes *mellitus* tipo 2 é uma doença que leva o organismo a apresentar alterações que podem prejudicar o estado de saúde do paciente. Nesta pesquisa, queremos comparar resultados de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 e voluntários saudáveis. Ao todo, a pesquisa contará com 100 voluntários com diabetes *mellitus* tipo 2, com idades entre 19 e 50 anos, tanto do sexo masculino quanto do feminino, e 100 voluntários sem a doença e da mesma faixa etária que fará parte do grupo controle. Serão realizadas análises no sangue e na urina, para avaliar o mineral zinco e

algumas alterações no DNA. Para isso, serão necessárias uma (1), coleta de sangue (12 mL), estando o (a) participante em jejum de no mínimo 10 horas. Na coleta de sangue poderá ocorrer um pequeno desconforto, devido à dor da picada da agulha, podendo surgir uma mancha arroxeada no local, que logo passa (serão utilizadas seringas e agulhas descartáveis e esterilizadas e as amostras serão colhidas por profissional experiente). A coleta de urina durante 24 horas será realizada em um frasco fornecido pela pesquisadora. O participante deverá armazenar toda a urina conforme será orientado e manter o frasco em geladeira até o momento de ser entregue a pesquisadora. Medidas de peso, altura e da circunferência da cintura também serão obtidas. Para avaliar se o consumo alimentar está adequado às necessidades, será utilizado o recordatório alimentar de três dias não consecutivos, incluindo um dia de final de semana, em que o participante irá dizer quais os alimentos que foram consumidos no dia anterior, sendo que o primeiro recordatório será coletado no mesmo dia de seleção para a pesquisa, e os restantes em outros dois dias por meio de ligação telefônica conforme disponibilidade do participante.

Os participantes receberão todas as orientações necessárias para a realização da pesquisa. Esta pesquisa trará benefícios para a população com diabetes *mellitus* tipo 2, pois existem estudos que mostram que o mineral zinco ajuda no equilíbrio de algumas funções no organismo.

O participante tem direito de receber informações sobre o andamento dos resultados da pesquisa, procedimentos utilizados, riscos e benefícios relacionados a esta pesquisa, a fim de esclarecer eventuais dúvidas, e receberão os resultados das análises realizadas.

Também é direito do participante recusar, desistir e/ou retirar seu consentimento de participar desta pesquisa a qualquer momento, sem nenhum transtorno. O participante será indenizado no caso de algum dano decorrente da pesquisa. Não haverá nenhuma despesa financeira para o participante. Também não haverá recompensa financeira relacionada à participação na pesquisa.

Os resultados obtidos na pesquisa serão arquivados e mantidos em sigilo, preservando a privacidade de cada participante, conforme ética.

CONTATO COM A PESQUISADORA:

Profª Silvia Cozzolino
Telefones: (11) 3091-3625
Laboratório de Nutrição-Minerais
Faculdade de Ciências Farmacêuticas/FCF
Universidade São Paulo/USP
Av. Lineu Prestes, 580 – Bloco 14 - Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" CEP 05508-000 – São Paulo – SP

CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

Você autoriza o armazenamento do material biológico colhido (sangue e urina):

( ) SIM ( ) NÃO

Caso você autorize o armazenamento do material biológico colhido, um novo projeto de pesquisa poderá ser elaborado e será encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa; nesse caso, você será novamente contato, para manifestar-se quanto às novas pesquisas.

Caso você não autorize o armazenamento do material biológico colhido, ao término do presente projeto de pesquisa todo o material biológico colhido será descartado, conforme procedimentos apropriados.

São Paulo, ... de ..... de .....

Assinatura do sujeito de pesquisa Ou responsável legal	Assinatura do pesquisador responsável

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos dessa pesquisa, favor entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13A – Butantã – São Paulo – CEP 05508-900. Fone: 3091-3622, fone-fax: 3091-3677 – e-mail: cepfcf@usp.br

INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇÕS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELA PESQUISA PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS:

APÊNDICE C

ID:

Recordatório 24hs – DM2

Nome:_____

Data de Nascimento: _____/_____/_____ **Peso:**_____ **Altura:**_____

DIA DA SEMANA

( ) Seg ( )Ter ( ) Qua ( )Qui ( ) Sex ( )Sáb ( )Dom

REFEIÇÃO – LOCAL/HORÁRIO	ALIMENTO	MEDIDAS

ANEXO 1

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo do polimorfismo Arg325Trp no gene SLC30A8 do transportador de zinco 8 (ZnT8) em pacientes com diabetes mellitus do tipo 2

Pesquisador: Silvia Maria Franciscato Cozzolino

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 17120413.7.0000.0067

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 414.203

Data da Relatoria: 30/09/2013

Apresentação do Projeto:

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é uma doença metabólica crônica caracterizada pela resistência a insulina ou defeito na secreção da insulina. A importância do zinco nessa doença se dá pela sua atuação na síntese, armazenamento e secreção de insulina nas células ß do pâncreas. Estas células possuem um transportador de zinco específico, o ZnT8, que é encontrado na membrana das vesículas secretoras de insulina, sendo portanto um componente importante para a ação do zinco nestas células conforme descrito acima. O polimorfismo Arg325Trp no gene que codifica para o ZnT8, pode interferir no mecanismo de secreção da insulina, e desta forma estar relacionado com o desenvolvimento do DM2. Nesse sentido, este estudo visa avaliar a presença do polimorfismo Arg325Trp no gene SLC30A8 do transportador de zinco-8 (ZnT8) em pacientes com diabetes mellittus tipo 2. Este estudo será de natureza transversal. Será constituído um grupo com 100 pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e um grupo controle com 100 pacientes sem a doença, com idade entre 19 e 50 anos, de ambos os gêneros. Serão avaliados os parâmetros bioquímicos do status nutricional relativo ao zinco, glicemia, resistência à insulina, função das células ß, bem como a determinação do SNP Arg325Trp no gene SLC30A8 do ZnT8. Pretende-se realizar coleta de sangue, de urina 24h e exame físico antropométrico. A avaliação da composição corporal será

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br

realizada por meio da bioimpedância e de medidas do peso, estatura e circunferência da cintura. Será avaliado também o consumo alimentar, através do registro alimentar de três dias e a análise será feita com auxílio do software NutWin, da Escola Paulista de Medicina/UNIFESP.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo principal do estudo é avaliar a presença do polimorfismo Arg325Trp no gene SLC30A8 do transportador de zinco-8 (ZnT8) e associá-lo aos parâmetros de avaliação do estado metabólico de pacientes com diabetes mellittus tipo 2. Para isso, pretende-se avaliar o consumo alimentar de zinco e dos macronutrientes; avaliar o status nutricional relativo ao zinco no plasma, eritrócitos e urina; avaliar os parâmetros glicêmicos (glicemia e hemoglobina glicada); analisar a resistência à insulina e a função das células ß dos pacientes com diabetes mellitus tipo 2; e verificar a presença do polimorfismo Arg325Trp no gene SLC30A8 do transportador ZnT8 e sua relação sobre os demais parâmetros avaliados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O risco do estudo foi considerado baixo e está relacionado ao procedimento de coleta de sangue. Os benefícios foram adequadamente descritos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Foi descrito como os participantes da pesquisa serão identificados e selecionados para o estudo (p.9 da nova versão).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE foi revisado.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Recomendada a aprovação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista as considerações acima, este CEP entende que o projeto pode ser aprovado.

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br