



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO



ERIKA PAULA SILVA FREITAS DE OLIVEIRA

**STATUS DE ZINCO E FATORES DE RISCO CARDIOMETABÓLICOS EM
INDIVÍDUOS COM SÍNDROME METABÓLICA**

NATAL/RN

2016

ERIKA PAULA SILVA FREITAS DE OLIVEIRA

**STATUS DE ZINCO E FATORES DE RISCO CARDIOMETABÓLICOS EM
INDIVÍDUOS COM SÍNDROME METABÓLICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Orientadora: Prof^a Dr^a Karine Cavalcanti Maurício de Sena Evangelista

NATAL/RN

2016

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial do Centro Ciências da Saúde - CCS

Oliveira, Erika Paula Silva Freitas de.

Status de zinco e fatores de risco cardiometabólicos em indivíduos com síndrome metabólica / Erika Paula Silva Freitas de Oliveira. - Natal, 2016.

68f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Karine Cavalcanti Maurício de Sena Evangelista.

Dissertação (Mestrado em Nutrição)-Departamento de Nutrição. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

1. Zinco - Dissertação. 2. Síndrome metabólica - Dissertação. 3. Biomarcadores - Dissertação. 4. Ingestão dietética de zinco - Dissertação. 5. Fatores de risco - Dissertação I. Evangelista, Karine Cavalcanti Maurício de Sena. II. Título.

RN/UF/BS-CCS

CDU 612.39

ERIKA PAULA SILVA FREITAS DE OLIVEIRA

**STATUS DE ZINCO E FATORES DE RISCO CARDIOMETABÓLICOS EM
INDIVÍDUOS COM SÍNDROME METABÓLICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Aprovada em 01 de DEZEMBRO de 2016.

Profª Drª Lucia de Fátima Campos Pedrosa
Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Nutrição
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Karine Cavalcanti Maurício de Sena Evangelista
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN
Orientadora

Prof. Dr. André Gustavo Pires de Sousa
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN
Membro interno

Prof. Dra. Dilina do Nascimento Marreiro
Universidade Federal do Piauí - UFPI
Membro Externo

A Deus, por permitir que eu chegasse até aqui.

À minha família.

*Aos meus pais, ao meu marido e,
especialmente, aos filhos que a vida
nos presenteará.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter concebido a mim saúde, força, energia e paz ao longo dessa jornada, e em todos os momentos da minha vida. Agradeço imensamente por Ele ter me dado a sabedoria necessária para enfrentar os obstáculos encontrados ao longo do caminho, tornando-o mais leve de ser percorrido.

Aos meus pais, Rosangela e Graco, por serem exemplos de dedicação e amor incondicional em todos os momentos da minha vida e da vida do meu irmão. Sinto-me imensamente feliz em orgulhar vocês.

Ao meu marido, Juliano, por estar junto comigo em mais uma etapa da vida. Obrigada pelo apoio, incentivo, tolerância, companheirismo e por dividir comigo as angústias do caminho, mesmo quando estava tão distante. Seu amor e sua presença tornaram a caminhada mais fácil de ser percorrida.

Ao meu irmão, Matheus, minha avó, Vovó Zilma, meus tios e primos pela torcida e apoio. Ao meu primo/sobrinho, Guilherme, por ter me alegrado tanto e me feito esquecer do cansaço. Sua chegada foi um presente na vida de todos nós. As minhas amigas da vida inteira, pelo companheirismo, amizade, pelos inúmeros momentos de alegria e descontração e pela convivência virtual diária.

A minha querida orientadora, Prof^a Dr^a Karine Sena, pelos ensinamentos, pela paciência, incentivo e delicadeza sempre presentes. Obrigada por me acolher e me mostrar o caminho da nutrição clínica experimental.

A Prof^a Dr^a Lúcia Pedrosa e Prof^a Dr^a Severina Carla pelos ensinamentos, incentivo, apoio e torcida.

A todos os colegas do Departamento de Nutrição da UFRN pelo apoio e torcida. As Prof^a Dr^a Renata, Prof^a Dr^a Bruna e Prof^a Dr^a Thais, obrigada especial, pela amizade, por estarem comigo desde o início, vibrarem com cada passo dado e pela maneira como viabilizaram meus momentos de ausência. As Prof^a Dr^a Ana Heloneida, Prof^a

Dr^a Karla Suzanne e Prof^a Dr^a Larissa, por me instigar a entrar num programa de pós-graduação.

A equipe do Laboratório de Técnica Dietética. Além das professoras, as monitoras e Débora. Meninas, obrigada pela torcida, pelo apoio e por terem muitas vezes exercido minha função nos inúmeros momentos de ausência.

Aos colegas de turma “Mestrandos nota 100”, primeira turma do Programa de Pós-graduação em Nutrição da UFRN. Obrigada pelos momentos de estudo em grupos, pelas discussões sempre enriquecedoras, pela companhia e por dividir as alegrias e angústias. Estar na mesma turma que vocês foi um grande presente.

As colegas Séphora Louyse e Aline Tuane pela companhia diária, por dividir as alegrias e as tantas ansiedades. Às colegas Heloísa Fernanda e Acsa, por me ajudarem nas análises de zinco. A Márcia pelo apoio antes e durante as análises de zinco.

A Brunna, que exerceu muito mais do que sua função como servidora na UFRN. Obrigada pelo apoio incondicional, disponibilidade, por estar presente em todas as análises e por me acalmar sempre que necessário.

As alunas de iniciação científica, Giovana Gurgel, Julierle Carla, Luana Matos, Mirna Gabrielle e Regina Avelino. Obrigada por estarem presentes nas coletas, no laboratório e por dividirem comigo o trabalho. A ajuda de vocês foi fundamental.

Aos médicos endocrinologistas, Dr. Josivan Lima e demais endocrinologistas do ambulatório de endocrinologia do Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL), por abraçarem o projeto e colaborarem com a coleta de dados.

A Prof^a Dr^a Maria das Graças Almeida, Departamento de Farmácia, pela disponibilidade e ajuda no processo de análises de zinco. Ao Núcleo de Ensino e Pesquisa em Petróleo e Gás (NUPEG), Departamento de Engenharia Química, em especial ao técnico José Batista, pela viabilidade e ajuda imprescindível nas análises de zinco.

Aos indivíduos que aceitaram participar da pesquisa. Obrigada pela disponibilidade e compreensão.

Enfim, agradeço profundamente a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para o êxito deste estudo.

RESUMO

A síndrome metabólica (SM) é uma doença multifatorial, cujas alterações fisiopatológicas podem comprometer o *status* de zinco. O objetivo deste estudo foi avaliar os biomarcadores do *status* de zinco e as associações com fatores de risco cardiometabólicos em indivíduos com SM. Trata-se de um estudo tipo caso-controle, desenvolvido com 88 adultos e idosos com SM, caracterizados segundo os critérios do *National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III* (NCEP/ATP-III), e 37 indivíduos sem SM ou outra condição clínica com influência nos parâmetros de zinco. Foram realizadas avaliações clínicas, antropométricas, perfil lipídico, glicêmico e inflamatório. Verificou-se a ingestão de zinco, concentrações de zinco no plasma e eritrócito, bem como a excreção de zinco na urina, pelo método de espectrofotometria de absorção atômica. Diferenças entre os grupos foram avaliadas por modelos de regressão. Correlações foram identificadas pelo coeficiente de *Pearson* (r). A idade média dos participantes foi de 50 (11) anos e 44 (11) anos para o grupo de pacientes com SM e controles, respectivamente. A média da ingestão calórica diária foi significativamente maior para os pacientes com SM ($p = 0,003$), e a ingestão dietética de ambos os grupos caracterizou-se como hiperproteica, normoglicídica e normolipídica. O consumo médio de zinco foi significativamente menor no grupo SM comparado com o controle (6,57(1,64) mg/dia vs 9,37(2,41) mg/dia; $p < 0,001$). Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de zinco no plasma (88,81(18,28) $\mu\text{g/dL}$ vs 87,82(17,44) $\mu\text{g/dL}$; $p > 0,05$). Identificou-se concentrações significativamente maiores de zinco no eritrócito no grupo SM (47,47(8,29) $\mu\text{g/gHb}$ vs 41,43(7,37) $\mu\text{g/gHb}$; $p < 0,001$), independente dos ajustes por covariáveis. A excreção de zinco na urina foi significativamente maior no grupo SM (554,80(291,00-787,60) $\mu\text{g/24h}$ vs 375,40(197,60-597,50) $\mu\text{g/24h}$; $p = 0,008$), e os ajustes por idade e sexo explicaram 21% das diferenças ($R^2 = 0,21$; $p < 0,001$). No grupo SM foram constatadas associações significativas entre zincúria e a glicemia de jejum ($r = 0,479$), circunferência da cintura ($r = 0,253$), triglicerídeos ($r = 0,360$), hemoglobina glicada (HbA1c) ($r = 0,250$), *Homeostasis model assessment – insulin resistance* (HOMA-IR) ($r = 0,223$) e proteína C reativa ultra-sensível (PCR-us) ($r = 0,427$) (todos $p < 0,05$). Na SM observamos inadequações na ingestão de zinco e confirmamos comprometimento no *status* de zinco, caracterizadas por aumento do zinco no eritrócito e maior zincúria, embora as concentrações de zinco no plasma

estejam dentro dos valores de referência. Alterações dos fatores de risco cardiometabólicos influenciam na zincúria de pacientes com SM.

Palavras-chave: síndrome metabólica, zinco, biomarcadores, ingestão dietética de zinco, fatores de risco.

ABSTRACT

Metabolic syndrome (MS) is a multifactorial disease whose pathophysiological alterations might compromise zinc status. The aim of this study was to evaluate zinc status biomarkers and their associations with cardiometabolic risk factors in individuals with MS. This is a study case-control, developed with 88 adults and elderly with SM, according to the *National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III* (NCEP / ATP-III), and 37 individuals without MS or other clinical condition with influence on zinc status. Clinical and anthropometric assessments were performed and lipid, glycemic, and inflammatory profiles were also obtained. It was evaluated zinc intake, plasma zinc, erythrocyte zinc, and urinary zinc excretion levels, by atomic absorption spectrophotometry. Differences between groups were evaluated by regression models. Correlations were identified by Pearson coefficient (r). The average age of participants was 50 (11) years and 44 (11) years for the group of patients with MS and controls, respectively. The average energy intake was significantly higher in patients with MS ($p = 0.003$) and dietary intake in both groups was characterized as high percentage of protein intake, and a proper percentage of carbohydrate and fat intake. Zinc intake average was significantly lower in MS group compared with control group (6.57 (1.64) mg/day vs 9.37 (2.41) mg/day; $p < 0,001$). No significant differences were observed in plasma zinc levels (88.81(18.28) $\mu\text{g/dL}$ vs 87.82(17.44) $\mu\text{g/dL}$; $p > 0.05$). It was found significantly higher erythrocyte zinc levels in the MS group (47.47(8.29) $\mu\text{g/gHb}$ vs 41.43(7.37) $\mu\text{g/gHb}$; $p < 0.001$) independent from co-variable adjustments. Urinary zinc excretion level was significantly higher in the MS group (554.80(291.00-787.60) $\mu\text{g/24h}$ vs 375.40(197.60-597.50) $\mu\text{g/24h}$; $p = 0.008$), and adjustments for age and sex explained 21% of the difference, ($R^2 = 0.21$, $p < 0.001$). SM group were found significant associations between zincuria and fasting blood glucose level ($r = 0.479$), waist circumference ($r = 0.253$), triglyceride levels ($r = 0.360$), glycated hemoglobin (HbA1c) levels ($r = 0.250$), homeostatic model assessment - insulin resistance (HOMA-IR) ($r = 0.223$) and high-sensitivity C-reactive protein levels (hs-PCR) ($r = 0.427$) (all $p < 0.05$). In SM we confirmed inadequacies in zinc intake and confirmed impairments in zinc status, characterized by increasing the erythrocytes zinc and higher zincuria, although plasma zinc levels were within the reference values. plasm

zinc levels into references values. Alterations in cardiometabolic risk factors influence zincuria in patients with MS.

Key words: metabolic syndrome, zinc, biomarkers, zinc intake, risk factors.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	<i>American Diabetes Association</i> (Associação Americana de Diabetes)
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CEP-HUOL	Comitê de Ética em Pesquisa do HUOL
DCV	Doenças cardiovasculares
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
EAR	<i>Estimated Average Requirements</i> (Necessidade Média Estimada)
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ERO	Espécies reativas ao oxigênio
GPx	Glutationa peroxidase
HbA1c	Hemoglobina Glicada
HDL-c	<i>High-density lipoprotein</i> (Lipoproteína de alta densidade)
HOMA-IR	<i>Homeostasis model assessment – insulin resistance</i> (Modelo de avaliação da homeostase - resistência à insulina)
HUOL	Hospital Universitário Onofre Lopes
IMC	Índice de Massa Corporal
LDL-c	<i>Low density lipoprotein</i> (Lipoproteína de baixa densidade)
MT	Metalotioneína
MTF-1	<i>Metal-response element-binding transcription factor-1</i> (Fator de transcrição metal responsivo 1)
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> (Coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato)
NCEP-ATP III	<i>National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III</i> (Programa Nacional de Educação sobre o Colesterol – Tratamento de Adultos Painel III)
NOS	<i>Nitric oxide synthase</i> (óxido nítrico sintase)
NUPEG	Núcleo de Ensino e Pesquisa em Petróleo e Gás
PCR-us	Proteína C reativa ultra sensível
RDA	<i>Recommended Dietary Allowance</i> (Recomendação Dietética)

	Diária)
SISVAN	Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional do Brasil
SM	Síndrome metabólica
SOD	Superóxido dismutase
TSH	Hormônio estimulante da tireoide
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
UL	<i>Tolerable Upper Intake Level</i> (Níveis Superiores Toleráveis de Ingestão)
VIGITEL	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
ZIP	<i>Zrt-Irt-like protein</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA.....	17
3. OBJETIVOS.....	18
3.1. OBJETIVO GERAL.....	18
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
4.1. SÍNDROME METABÓLICA.....	19
4.2. ZINCO.....	21
4.3. RELAÇÃO DO ZINCO COM FATORES DE RISCO CARDIOMETABÓLICOS E SM.....	24
5. METODOLOGIA.....	29
5.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO....	29
5.2. AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA.....	32
5.3. AVALIAÇÃO DO CONSUMO DIETÉTICO.....	33
5.4. AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL.....	34
5.5. ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	34
5.5.1. Avaliação dos Biomarcadores de Zinco.....	35
5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
6. ARTIGO PRODUZIDO.....	39
6.1. O artigo intitulado “Zinc status biomarkers and cardiometabolic risk factors in metabolic syndrome: a case control study” foi submetido para publicação no periódico “Nutrients”, que possui fator de impacto 3,759 e Qualis A1 da CAPES para área de Nutrição.....	39
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
REFERÊNCIAS.....	56
APÊNDICES.....	62
ANEXOS.....	65

1. INTRODUÇÃO

A síndrome metabólica (SM) é um transtorno complexo que envolve um conjunto de fatores de risco cardiovascular, cujas principais alterações são a intolerância à glicose, a adiposidade abdominal, a hipertensão arterial (HAS) e a dislipidemia aterogênica^{1,2}. A prevalência de SM e dos fatores associados tem sido estudada em algumas populações, destacando que em países latino-americanos, incluindo o Brasil, a prevalência é de 24,9%³.

Na fisiopatologia da SM, a resistência à insulina parece explicar grande parte dos problemas que acontecem no indivíduo com SM⁴. Essa condição clínica é caracterizada por transtornos na secreção e sinalização do receptor da insulina e no metabolismo lipídico, resultando em hipertrigliceridemia e baixo HDL-c⁵. Além disso, o acúmulo de gordura visceral favorece o processo inflamatório, potencializando a resistência à insulina⁶, o aumento do estresse oxidativo e comprometimento da vasodilatação, contribuindo para a ativação da aterogênese, aumentando os riscos para o surgimento das doenças cardiovasculares (DCV)^{7,8}.

A SM apresenta etiologia multifatorial, em que estão envolvidos fatores genéticos, metabólicos e ambientais, tendo como principais fatores de risco o sedentarismo, a obesidade e a ingestão alimentar inadequada⁵. Assim, a dieta apresenta relevância no acometimento da doença, considerando as relações de alguns nutrientes com o desenvolvimento de alterações fisiopatológicas associadas à SM, como por exemplo a ingestão insuficiente de fibras, ácidos graxos mono e poliinsaturados, cálcio, vitamina D e minerais antioxidantes, bem como a alta ingestão de ácidos graxos saturados, açúcar refinado e sódio⁹⁻¹¹.

Dentro desse contexto, as inadequações na ingestão de zinco também parecem favorecer a ocorrência de SM ou seus componentes^{12,13}. Este mineral apresenta estreita relação com os fatores de risco cardiometabólicos envolvidos na SM, uma vez que o zinco exerce funções na promoção da lipogênese, no transporte de glicose nas células, síntese e secreção de insulina^{14,15}, na atividade de enzimas que regulam a pressão arterial¹⁶, no controle do processo inflamatório e do estresse oxidativo, bem como, na regulação gênica e na homeostase cardiovascular¹⁷⁻²⁰.

No entanto, os estudos que abordam a avaliação do *status* de zinco em pacientes com SM são escassos e os resultados têm sido controversos²¹⁻²⁴. Adicionalmente, existem lacunas na literatura sobre estudos que explorem a

ingestão de zinco na dieta concomitante a outros biomarcadores bioquímicos. Majoritariamente, os estudos consideram o zinco no plasma ou soro²²⁻²⁶ como biomarcador do *status* de zinco, e pouco exploram o zinco na urina e os biomarcadores celulares, como o zinco no eritrócito^{27,28}.

Diante da relevância que o zinco exerce em vários aspectos fisiopatológicos da SM e os fatores associados, explorar o papel deste mineral em pacientes adultos e idosos com SM trará informações importantes sobre o comportamento do zinco no contexto dos pacientes atendidos em uma unidade ambulatorial de endocrinologia referência do estado de Rio Grande do Norte. Essas informações subsidiarão condutas clínico-nutricionais, no sentido de corrigir possíveis inadequações desse mineral, contribuindo para a prevenção de complicações da SM decorrentes do desequilíbrio na homeostase do zinco.

2. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

O zinco desperta interesse no estudo das suas relações com a SM, pois apresenta papel estrutural, catalítico e regulatório em diversas proteínas, envolvidas no controle de mecanismos fisiopatológicos relacionados a essa doença^{15,16,29-31}. Estudos demonstram associações entre o zinco e os componentes da SM, em especial glicemia de jejum^{32,33}, pressão arterial^{22,24} e obesidade abdominal^{22,34}. Adicionalmente, autores demonstram que quanto maior o número de componentes da SM, menor a concentração de zinco no plasma²⁴.

A possibilidade de inadequação na ingestão dietética em pacientes com SM é iminente, gerando incertezas sobre as repercussões no *status* do mineral neste grupo de pacientes. Inadequações na ingestão de zinco foram verificadas em um estudo anterior realizado com pacientes com SM do Estado do Rio Grande do Norte, registrando-se 34,8% de prevalência de inadequação de zinco para o sexo feminino e 75,5% para o sexo masculino³⁵.

Existem lacunas na literatura sobre estudos que explorem a ingestão de zinco na dieta concomitante a outros biomarcadores bioquímicos. Majoritariamente, os estudos utilizam o zinco no plasma como biomarcador do *status* de zinco, e pouco exploram o zinco na urina e os biomarcadores celulares^{27,28}. Considerando que não há estoque de zinco no organismo e que a regulação homeostática desse mineral é complexa, envolvendo mecanismos de regulação do *turnover* celular¹⁹, autores sugerem que investigar o *status* desse micronutriente, por meio de um marcador isolado pode afetar a conclusão ou a generalização sobre resultados específicos³⁶. Portanto, de acordo com os resultados inconclusivos sobre o *status* de zinco, especialmente em populações clínicas, como em pacientes com SM, autores sugerem que os biomarcadores celulares, além dos potenciais, como a excreção de zinco na urina, podem ser recomendados como novos alvos, e juntamente com o zinco no plasma e a ingestão dietética, podem fornecer informações mais fidedignas sobre o *status* de zinco desses indivíduos^{27,37}.

Diante do exposto, buscando elucidar o *status* de zinco e compreender as relações do mineral com os fatores cardiometabólicos da SM, esse estudo foi desenvolvido no sentido de fundamentar estratégias para auxiliar na prevenção de complicações decorrentes do desequilíbrio na homeostase do zinco, as quais potencializarão o risco para o desenvolvimento das DCV em pacientes com SM.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os biomarcadores do *status* de zinco e as associações com fatores de risco cardiometabólicos em indivíduos com SM.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o estado nutricional antropométrico, perfil metabólico e a ingestão de energia, macronutrientes, fibra e zinco dos indivíduos estudados;
- Observar a frequência dos fenótipos que caracterizaram o diagnóstico da SM;
- Determinar a concentração de zinco no plasma, no eritrócito e a excreção de zinco na urina de indivíduos com SM e controles.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. SÍNDROME METABÓLICA

A SM é uma doença multifatorial cujas alterações incluem fatores de risco metabólicos que parecem ter efeito direto sobre a doença aterosclerótica. Os principais fatores reconhecidos são a dislipidemia aterogênica, a hipertensão arterial, a intolerância à glicose e as manifestações consequentes de estados pró-inflamatório e pró-trombótico³⁸. Ainda não existe um consenso na literatura sobre os critérios para o diagnóstico da SM. A maioria considera a presença de hipertensão arterial ou uso de anti-hipertensivos, hipertrigliceridemia, diminuição das concentrações de HDL-c, hiperglicemia ou uso de hipoglicemiantes orais e aumento da circunferência da cintura^{1,39}.

De acordo com o NCEP-ATP III⁴⁰, para o diagnóstico da doença deve ser identificada a presença de três ou mais dos seguintes componentes: circunferência da cintura maior que 102 cm para homens e maior que 88 cm para mulheres; concentrações de triglicerídeos igual ou maior que 150 mg/dL, concentração de HDL-c menor que 40mg/dL em homens e 50 mg/dL em mulheres, pressão arterial sistólica maior ou igual a 130 mmHg ou diastólica maior ou igual a 85 mmHg e glicemia de jejum maior ou igual a 110mg/dL. O ponto de corte para a glicemia de jejum foi posteriormente atualizado conforme a recomendação da Associação Americana de Diabetes (*American Diabetes Association, ADA*), que definiu normoglicemia quando a glicemia de jejum for menor que 100mg/dL. Essa modificação foi realizada com a finalidade de prevenir de maneira eficaz as complicações micro e macrovasculares do diabetes *mellitus* (DM)⁴¹.

Segundo a Federação Internacional de Diabetes⁴², em 2007, cerca de 25% da população mundial tinha o diagnóstico de SM. Em um estudo realizado nos Estados Unidos, foi observado que houve uma redução da prevalência de SM na população adulta, de 25,5% em 1999, para 22,9% em 2010, contudo, ocorreu aumento dos componentes da SM, tais como, a glicemia de jejum e a circunferência da cintura, 7,0% e 10,7%, respectivamente⁴³. Em países latino-americanos foi observado que a prevalência geral de SM é de 24,9% em populações estudadas de Porto Rico, Chile, Colômbia, Peru, Venezuela, México e Brasil, apresentando-se mais frequente nas mulheres e em pessoas com mais de 50 anos de idade³.

No Brasil, dados do estudo de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), realizado em 2007 com 54.251 adultos brasileiros, indicaram que a SM atingiu 14,2% da população estudada⁴⁴. Comparando as informações do VIGITEL coletados nos anos de 2006 e 2014, observou-se um aumento no percentual das doenças relacionadas com a SM na população adulta das capitais brasileiras e Distrito Federal, com destaque para a obesidade (11,8% para 17,9%), DM (5,5% para 8,0%) e hipertensão arterial (21,6% para 24,8%)^{45,46}. Em uma revisão sistemática publicada no ano de 2013 sobre a prevalência de SM em diferentes regiões do Brasil foi observado que esta doença acometeu 29,8% da população urbana e 20,1% da rural⁴⁷.

Considerando os aspectos fisiopatológicos da SM, observa-se que o aumento da gordura visceral está relacionado com diversos problemas metabólicos característicos desta síndrome, como a resistência à insulina. Diante do acúmulo da gordura visceral, o tecido adiposo libera quantidades abundantes de ácidos graxos livres para a corrente sanguínea, levando à síntese excessiva de triglicerídeos pelo fígado, culminando na resistência muscular e hepática à insulina².

O aumento da gordura visceral, também contribui para a inflamação observada na SM, potencializando a resistência à insulina. Nesta situação, ocorre redução da produção de alguns fatores sintetizados pelos adipócitos devido à infiltração de macrófagos no tecido adiposo. A interação dos macrófagos com os adipócitos leva à liberação aumentada das concentrações circulantes de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e IL-6) e adipocitocinas. Esse aumento de mediadores inflamatórios pode reduzir a secreção de insulina e levar a apoptose de células beta, favorecendo a progressão do DM tipo 2⁴⁸.

A hiperglicemia crônica característica da SM favorece a geração de espécies reativas ao oxigênio (ERO), resultando em estresse oxidativo nas células beta do pâncreas. Essas células têm baixa atividade de defesa, por meio de enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutase (SOD), catalase, e glutathione peroxidase (GPx), se comparadas com outros tecidos, e isso contribui para a ação das ERO, potencializando o estado hiperglicêmico⁴⁹.

Com a sinalização da insulina diminuída, uma série de reações metabólicas é desencadeada, contribuindo para a progressão de DCV como, por exemplo, aumento da produção de colágeno pelo músculo liso vascular e diminuição

da produção de óxido nítrico, um potente vasodilatador, resultando em disfunção endotelial e ativação de múltiplas vias envolvidas na aterogênese⁵⁰.

A SM tem etiologia multifatorial, em que coexistem interações entre fatores genéticos, metabólicos e/ou ambientais². Dentre os fatores ambientais, a dieta tem fundamental importância, uma vez que seus componentes influenciam diretamente a doença, sejam como fatores de proteção ou como fatores de risco⁵¹. Neste sentido, estudos têm investigado o papel de alguns nutrientes nas diversas vias fisiopatológicas relacionadas à SM^{5,15}, com destaque para o zinco, seja pela sua relação como agente antiinflamatório e antioxidante⁵², na proteção celular ou na participação de reações enzimáticas^{19,20,18}.

4.2. ZINCO

O zinco é um elemento traço essencial envolvido em diversas funções no organismo e distribuído em vários tecidos do corpo, principalmente ossos, músculos, fígado e pele⁵³. As principais fontes alimentares desse micronutriente são os alimentos de origem animal, como ostras, mariscos, peixes, ovos, fígado, miúdos e carnes vermelhas. Por outro lado, os alimentos contendo altos teores de carboidratos possuem um menor conteúdo de zinco⁵⁴. A recomendação dietética diária (*Recommended Dietary Allowance*, RDA) de zinco para adultos na faixa de idade entre 19 a 70 anos é de 8mg/dia para as mulheres e 11mg/dia para os homens. Os níveis superiores toleráveis de ingestão (*Tolerable Upper Intake Level*, UL) são de 40mg/dia⁵⁵.

A ingestão inadequada de zinco, ou os fatores que interferem na sua absorção ou biodisponibilidade, pode levar ao estado de deficiência desse mineral, acarretando perda de apetite, anosmia, lesões na pele e, ainda, alterações do sistema imune²⁰. Muitas doenças têm relação com a deficiência de zinco, sejam elas neurológica, hepática, doença do sistema cardiovascular e alterações endócrino-metabólicas¹⁸.

Em relação aos aspectos metabólicos do zinco, sabe-se que a absorção ocorre no intestino delgado (duodeno e jejuno) e, posteriormente, é distribuído para os tecidos periféricos^{53,56}. Tanto a absorção pelas células intestinais como a distribuição para os demais tecidos são mediadas por proteínas transportadoras de zinco que fazem parte de duas famílias de genes, a *Solute Carrier Family* (SLC30A),

As funções bioquímicas do zinco são reflexo do papel estrutural, catalítico e regulatório desse mineral. É um componente construtivo de muitas enzimas ou proteínas importantes, como as conhecidas “*zinc fingers protein*” (dedos de zinco), responsável pela estabilidade da estrutura dessas proteínas⁵⁴, ligando-se em um complexo tetraédrico a quatro cisteínas ou, em alguns casos, a histidina²⁷. Esse mineral está diretamente envolvido na catálise de reações enzimáticas que controlam diferentes processos celulares, incluindo transdução de sinal, transcrição, divisão, diferenciação, proliferação e adesão celular. Além de estar envolvido na atividade de enzimas que controlam processos de síntese de DNA, o zinco, regula a expressão gênica, por ser um componente básico que estimula a transcrição, ao se ligar ao fator de transcrição metal responsivo 1 (*metal-response element-binding transcription factor-1*, MTF-1). Quando as concentrações celulares de zinco aumentam, o MTF-1 desempenha um papel central na homeostase do mineral, aumentando a transcrição de um grande número de genes. Além disso, muitos mecanismos de reparo de DNA são mediados por zinco^{27,53}.

O zinco apresenta função antioxidante por meio dos seguintes mecanismos: (1) inibição da ação da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADPH)³⁰; (2) competição com ferro e cobre pelos sítios de ligação da membrana das células⁵⁸; (3) cofator para a enzima antioxidante SOD; (4) indução da geração de MT. Em geral, zinco é capaz de se ligar aos grupos sulfidríla de várias moléculas, protegendo-as contra a oxidação⁵².

Esse micronutriente apresenta funções no sistema imune. O zinco e a MT afetam o desenvolvimento, a maturação e a função de células *natural killer*, inibem a ativação do fator nuclear *Kappa B*, influenciam processos de fagocitose dos macrófagos e neutrófilos. Na resposta imune adaptativa, o zinco atua tanto na imunidade humoral (linfócitos B), como na mediada por células (linfócitos T). As células B são dependentes de zinco para sua proliferação, enquanto que as células T, para sua diferenciação, dependem do hormônio timulina, secretado por células epiteliais do timo, que requer o mineral como um cofator. A timulina existe no plasma de duas formas, uma forma ativa ligada a zinco e uma forma inativa sem o mineral^{20,31,52}.

O zinco tem um mecanismo homeostático altamente eficaz e, diferente de outros micronutrientes, não é armazenado no organismo. A avaliação do *status*

desse mineral é feita por meio de marcadores que controlam a homeostase, tais como a ingestão dietética, concentrações no plasma, no eritrócito e na urina. O zinco no plasma normalmente é o biomarcador mais utilizado, pois é sensível para detectar deficiência grave, com limitações para identificar a deficiência marginal. Em algumas situações os valores dentro da faixa de referência podem não refletir com segurança os estoques corpóreos, atribuídos às flutuações de cerca de 20% que ocorrem durante o dia, além de alterações decorrentes de infecção aguda, inflamação, cirrose, hipoalbuminemia, gravidez e uso de contraceptivos³⁷. Assim, autores sugerem que a avaliação em conjunto de biomarcadores de nutrientes devem ser utilizadas, a fim de expandir a compreensão do papel do nutriente no organismo³⁶.

Em situações normais, quando há baixa ingestão de zinco ou as concentrações corpóreas encontram-se reduzidas, as perdas através do trato gastrointestinal e rins são reguladas para manter as concentrações dentro da faixa de referência^{27,37}. Contudo, em situações que alteram o controle metabólico do zinco, como por exemplo, na SM, pode haver comprometimento do sistema homeostático do mineral¹⁵.

4.3. RELAÇÃO DO ZINCO COM FATORES DE RISCO CARDIOMETABÓLICOS E SM

Conforme descrito anteriormente, o zinco desempenha funções biológicas relacionadas aos mecanismos fisiopatológicos da SM, porém a relação do *status* de zinco com os fatores de risco cardiometabólicos que envolvem a SM isoladamente parece ser melhor registrado na literatura. Estudos confirmam uma associação inversa das concentrações de zinco com a resistência à insulina ou glicemia de jejum^{32,33}, com a pressão arterial^{22,24}, com a circunferência da cintura^{22,34} e com os triglicérides^{22,23}. Quanto ao HDL-c, os achados não apresentam associações significativas com o zinco no soro^{23-25,59}, no entanto, encontrou-se uma associação positiva entre HDL-c e o zinco no cabelo²¹.

Os mecanismos que explicam a relação do zinco com a resistência à insulina e o DM referem-se à influência desse mineral na promoção da lipogênese, transporte de glicose nas células¹⁵ e, principalmente, a participação do mineral na

síntese, armazenamento e secreção de insulina¹⁴. A maior quantidade de zinco encontra-se nos grânulos de secreção de insulina, formando uma rede cristalina de hexâmeros insolúveis na qual seis moléculas de insulina são complexadas com dois íons Zn^{2+} ⁶⁰. Parte do *pool* de íons zinco da célula beta é co-secretado com a insulina após a estimulação com glicose. Imediatamente após a secreção, a estrutura de hexâmero se dissocia em monômero ativo de insulina e íons zinco, provavelmente causada por uma combinação de uma rápida redução da pressão desses íons e a variação do pH de 5,5 para 7,4¹⁵. A super secreção de insulina pode esgotar o conteúdo de zinco nas células beta⁶¹, podendo também contribuir para a apoptose dessas células¹⁵.

Outro mecanismo que envolve a participação do zinco na secreção de insulina diz respeito ao ZnT8, que é expresso predominantemente nas células beta do pâncreas. De acordo com Davidson et al.⁶⁰, polimorfismos no gene SLC30A8, que codifica ZnT8, estão associados ao risco de diabetes tipo 2. A alta expressão de ZnT8 em células do tipo INS-1 melhora a secreção de insulina estimulada pela glicose e a baixa regulação de ZnT8 parece reduzir o conteúdo e a secreção de insulina, em resposta a um estímulo hiperglicêmico¹⁴. Além do ZnT8, outros transportadores de zinco podem estar envolvidos em processos de sinalização de insulina e controle glicêmico, reforçando a participação do mineral na secreção desse hormônio e homeostase da glicose⁶². Estudos confirmam menores concentrações plasmáticas de zinco em pacientes com diabetes tipo 2 ou resistência à insulina^{32,63}.

Quanto à relação do zinco com a regulação da pressão arterial, observa-se que o papel desse mineral é multinível. Sugere-se que na primeira fase da hipertensão as alterações no metabolismo do zinco são de natureza compensatórias, tentando diminuir a pressão arterial. Com o tempo, essa compensação pode resultar na perda de homeostase do mineral, o que torna parte do mecanismo que promove o aumento da pressão arterial¹⁶.

Na hipertensão arterial, a baixa concentração de zinco no soro é um mecanismo fisiológico para reduzir a pressão arterial, uma vez que suprime a atividade de enzimas envolvidas na vasoconstrição: a enzima conversora de angiotensina (ECA), a enzima conversora da endotelina e a endopeptidase neutra, todas metalopeptidases dependentes de zinco. Por outro lado, o excesso de zinco intracelular pode ativar o sistema renina angiotensina devido ao aumento do pH do

citoplasma, conseqüente do aumento da atividade da metaloenzima anidrase carbônica. Além disso, a baixa concentração de zinco extracelular favorece o aumento da tensão na parede arterial devido ao acúmulo de cálcio intracelular, causados tanto pelo bloqueio dos canais de cálcio, como pela liberação de cálcio dos retículos sarcoplasmático para dentro do citoplasma¹⁶. As alterações patológicas na homeostase de zinco levam a liberação inadequada de cálcio, conforme observado em certas anormalidades cardíacas, incluindo insuficiência cardíaca e arritmias⁶⁴.

Um dado que reforça a participação do zinco no controle da pressão arterial, é o fato do zinco atuar como um co-fator de óxido nítrico sintase (*nitric oxide synthase*, NOS), uma metaloenzima envolvida na regulação da pressão arterial e função cardiovascular. A NOS catalisa a geração de óxido nítrico, um fator importante na regulação do fluxo de sangue, pressão arterial, taxa de filtração glomerular, sódio e excreção renal de água, contratilidade miocárdica e frequência cardíaca. Na deficiência de zinco, a geração e a ação do óxido nítrico estarão comprometidas, havendo um aumento na vasoconstrição e, por conseguinte, aumento da pressão sanguínea, fator de risco conhecido para SM. Ademais, o aumento de radicais livres nas paredes dos vasos diminui a ação do óxido nítrico¹⁷.

Além da própria fisiopatologia da hipertensão arterial envolver alterações na homeostase do zinco, os fármacos utilizados para o tratamento de portadores de hipertensão também interferem no equilíbrio desse mineral. Em um estudo realizado com pacientes portadores de hipertensão arterial, constatou-se que a classe dos diuréticos, dos inibidores de ECA e dos inibidores de angiotensina II estiveram relacionados com o aumento da perda urinária de zinco, bem como observou-se redução da concentração de zinco no plasma no grupo de pacientes estudados. Os efeitos da classe de beta bloqueadores sob o zinco não é bem esclarecido e os bloqueadores dos canais de cálcio não pareceram ter efeito significativo sobre a homeostase do mineral⁶⁵.

Um ponto importante da fisiopatologia da SM é o acúmulo da gordura abdominal, que repercute em alterações no perfil inflamatório e estresse oxidativo e, conseqüentemente, na homeostase do zinco. Sendo assim, achados clínicos sugerem que o metabolismo do zinco pode ser afetado pela influência do cortisol em indivíduos com acúmulo de gordura abdominal⁶⁶. A presença de estresse oxidativo e inflamação crônica afeta a síntese de glicocorticoides, e este, por sua vez, induz a

expressão de metalotioneína, interferindo no metabolismo do zinco⁶⁷. A produção de citocinas pró-inflamatórias, a IL-6, por exemplo, pode promover um aumento na expressão do gene do transportador de zinco, ZIP14⁶⁸. Noh et al.⁶⁹ afirmaram que a expressão de uma série de transportadores de zinco, ZnT4, ZnT5, ZnT7, ZnT9, Zip1 e Zip6, é inversamente associada com marcadores inflamatórios característicos da SM, como a proteína C reativa e o fator de necrose tumoral.

Na SM, além de todos os fatores de risco cardiometabólicos já descritos, alterações no perfil lipídico também parecem influenciar o metabolismo do zinco. Um estudo de metanálise demonstrou que a suplementação de zinco tem efeito favorável nos parâmetros lipídicos do plasma. De maneira geral, a suplementação do zinco reduziu significativamente triglicerídeos, colesterol total e lipoproteína de baixa densidade (*low density lipoprotein*, LDL-c). Os resultados para HDL-c apresentam comportamento diferente, a depender da população estudada⁷⁰.

Diante das considerações apresentadas, identifica-se que os fatores cardiometabólicos que envolvem a SM apresentam relação com o metabolismo do zinco, de forma isolada ou conjuntamente. A literatura registra concentrações de zinco no cabelo significativamente menores em adultos coreanos com SM em comparação aos controles, embora não tenha sido registrada associação significativa com nenhum dos componentes da SM²¹. Maiores concentrações de zinco no soro foram positivamente associadas com o diagnóstico de SM em homens, enquanto que uma associação negativa foi observada no grupo de mulheres, sugerindo um efeito protetor do zinco contra a SM no sexo feminino²².

Por outro lado, foram encontradas concentrações de zinco no soro significativamente maiores em poloneses com SM em comparação com grupo controle²³. Outra investigação não confirmou associação significativa entre as concentrações de zinco no soro e a prevalência da SM em uma população coreana, bem como não houve diferenças significativas entre as concentrações de zinco de participantes com e sem SM²⁴.

Dessa forma, o *status* de mineral pode variar, dependendo de quais e quantos são os fatores de risco metabólicos presentes no diagnóstico do indivíduo, explicando em parte as divergências sobre o *status* de zinco em pacientes com SM. Essa informação é reforçada por Seo et al.²⁴, quando ao estudar as relações do zinco em pacientes com SM, observaram que quanto maior o número de

componentes presente no diagnóstico da doença, menor a concentração de zinco no plasma, ressaltando a importância de se avaliar o fenótipo dos indivíduos com SM.

Reforça-se, portanto, a importância de se estudar o *status* de zinco, considerando diferentes biomarcadores, dentro com contexto da SM e fatores de risco cardiometabólicos associados. Essas informações auxiliarão conduta clínico-nutricionais cuja finalidade seja a prevenção de complicações da SM decorrentes do desequilíbrio na homeostase do zinco.

5. METODOLOGIA

5.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO

O estudo realizado foi do tipo longitudinal, caso-controle não pareado, desenvolvido com pacientes adultos e idosos, portadores de SM, de ambos os sexos, selecionados no Ambulatório de Endocrinologia do Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL), referência no estado do Rio Grande do Norte, e no Ambulatório do Departamento de Nutrição, Campus Central, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Os participantes foram selecionados obedecendo ao fluxo normal de atendimento do Ambulatório no período de março de 2015 a fevereiro de 2016 e foram submetidos a uma avaliação clínica realizada por médico endocrinologista participante da pesquisa.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUOL (CEP-HUOL), conforme determinado pelo Conselho Nacional de Saúde - Resolução nº 466/2012 (CAAE 38566914.5.0000.5292). O parecer consubstanciado do CEP-HUOL encontra-se no Anexo 1. Todos os participantes, após leitura e compreensão, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

No grupo caso, foram incluídos os indivíduos de ambos os sexos, com idade acima de 20 anos, diagnosticados como portadores de SM segundo critérios do NCEP-ATP III³, que incluem a presença de pelo menos três das seguintes alterações: circunferência da cintura >102 cm em homens e >88 cm em mulheres; triglicerídeos \geq 150 mg/dL; HDL Colesterol <40 mg/dL em homens e <50 mg/dL em mulheres; pressão arterial \geq 130 mmHg ou \geq 85 mmHg e glicemia de jejum \geq 110 mg/dL. O ponto de corte de glicemia de jejum foi ajustado segundo a ADA³⁹, considerando valores alterados acima de 100mg/dL.

Neste grupo não foram incluídos pacientes com DM tipo 1, DM tipo 2 com uso de insulina, uso de glicocorticoides nos últimos 3 meses, alterações da função renal e hepática (valores três vezes acima da faixa de referência das transaminases), insuficiência cardíaca descompensada, estado de gravidez ou lactação, uso de suplemento de vitamínico-mineral. Considerando a necessidade da coleta de informações referentes ao consumo alimentar por meio do Recordatório de

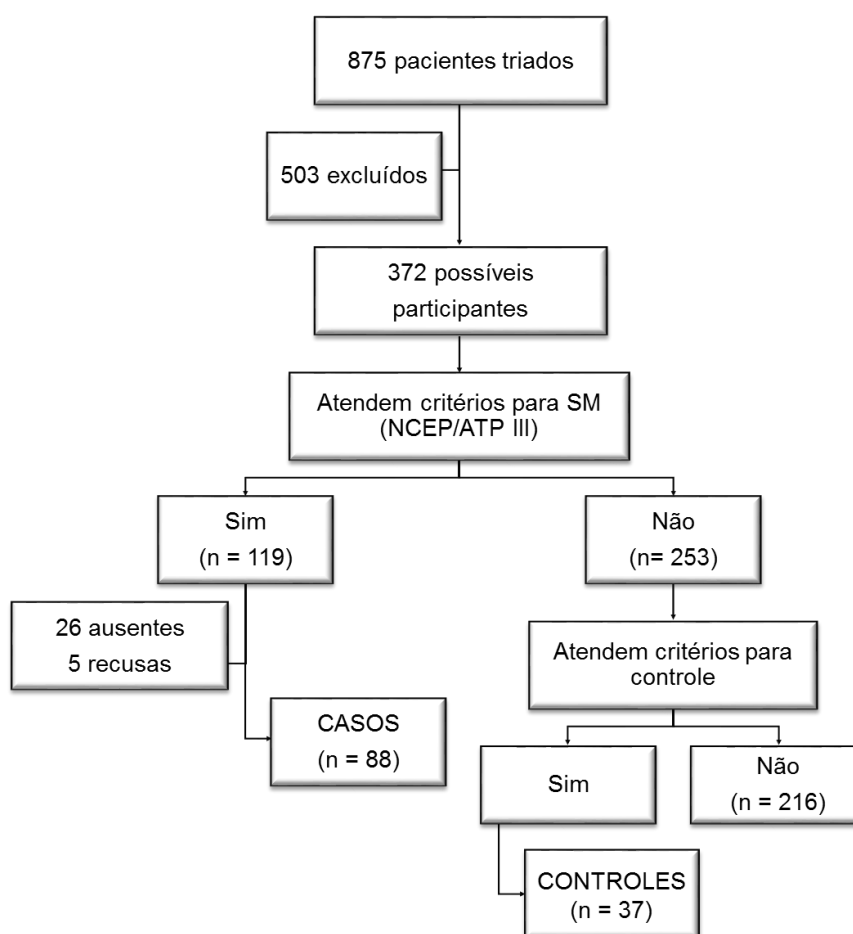
24 horas, não foram incluídos no estudo pessoas com problemas de memória ou de doença mental.

No grupo controle foram selecionados participantes de ambos os sexos, idade superior a 20 anos, que apresentaram circunferência da cintura <102 cm em homens e <88 cm em mulheres, sem diagnóstico de hipertensão arterial e sem uso de medicamento anti-hipertensivo, sem resistência à insulina, DM tipo 2 e sem uso de hipoglicemiante. Foram considerados como critérios de exclusão os mesmos definidos para o grupo de pacientes com SM.

Ao longo do período da coleta de dados, foram consultados 875 prontuários, dentre estes, 119 eram de pessoas que atendiam critérios para diagnóstico de SM. Dos 119 indivíduos eleitos para participar do estudo no grupo de pacientes com SM, 26 não compareceram ao atendimento clínico e 5 se recusaram a participar da pesquisa, caracterizando 26% de perdas e um total de 88 participantes no grupo caso. Para a formação do grupo controle, foram avaliados 253 indivíduos, porém, 37 atenderam os critérios de inclusão específicos para este grupo (Figura 2).

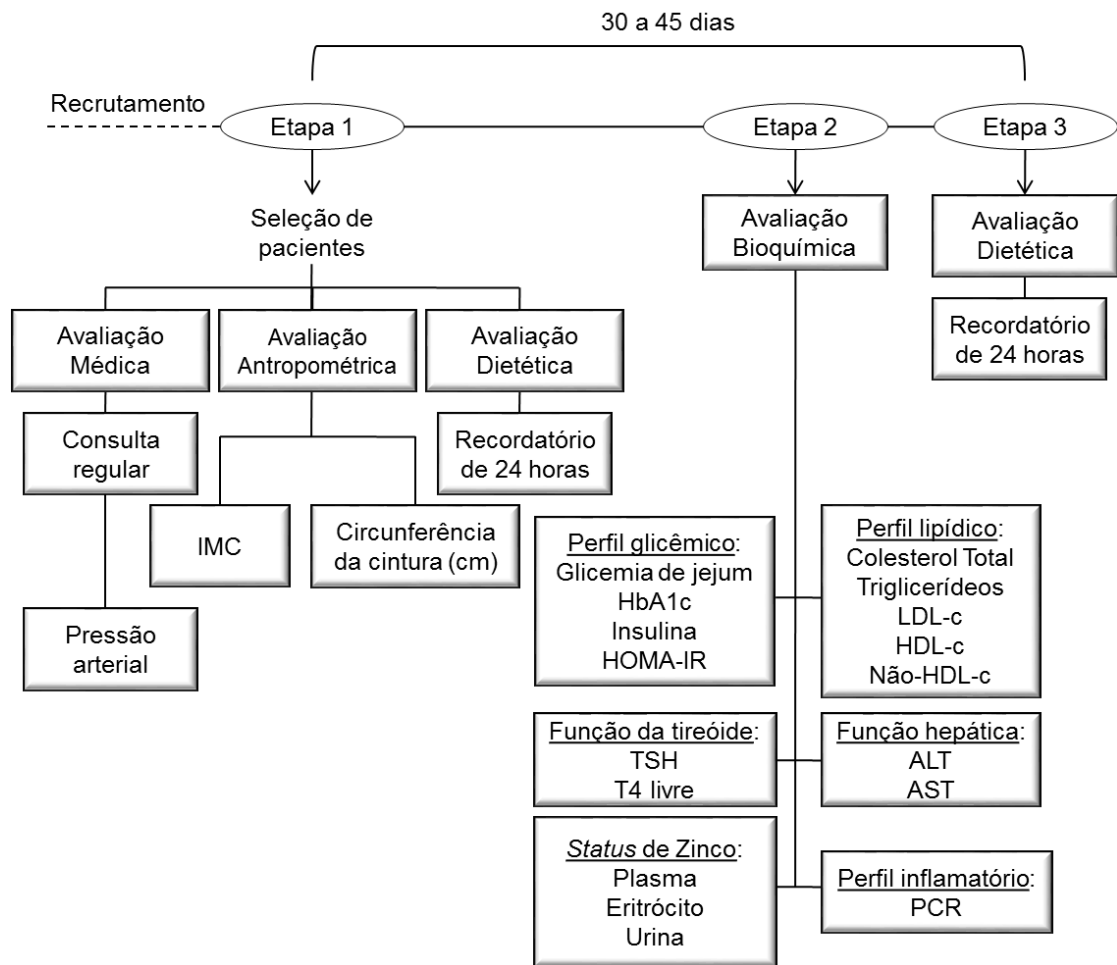
Devido à essa baixa taxa de recrutamento (125 indivíduos, 88 com SM e 37 controles), o estudo apresentou um poder estatístico de 20,5% para detectar uma diferença de 4µg/dL (ou mais) nas concentrações de zinco no plasma entre os grupos, com base em uma estimativa mais apurada do desvio-padrão populacional (18 µg/dL), um nível alfa de 5% e um desenho de caso-controle não pareado.

Figura 2. Fluxograma de recrutamento de participantes do estudo.



Os indivíduos que aceitaram formalmente participar do estudo na primeira visita ambulatorial responderam a um formulário contendo informações pessoais e de saúde, sendo realizado o atendimento clínico, com a solicitação dos exames bioquímicos. Em seguida, foram encaminhados para realização das medidas antropométricas e para responder ao inquérito alimentar por meio do recordatório de 24 horas. Os participantes foram orientados a comparecer ao ambulatório mais uma vez para realização do segundo inquérito alimentar, bem como para o recebimento dos resultados dos exames bioquímicos e orientações nutricionais, obedecendo ao intervalo de 30 a 45 dias. Para a obtenção de informações adicionais, necessárias ao preenchimento de dados do participante da pesquisa, foram consultados os respectivos prontuários. O desenho do estudo encontra-se representado na Figura 3.

Figura 3. Desenho do estudo.



5.2. AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

Considerou-se como parâmetro de avaliação antropométrica o Índice de Massa Corporal (IMC), que corresponde à razão do peso pela altura ao quadrado ($\text{peso}/\text{altura}^2$). A massa corporal foi mensurada utilizando balança digital com capacidade para 150 kg e precisão de 0,1 kg (Tanita®, modelo MEA-03140). A estatura foi aferida com auxílio de estadiômetro portátil Sanny®. A classificação do IMC para adultos e idosos foi realizada conforme os pontos de corte recomendados pelo Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional do Brasil (SISVAN)⁷¹.

A circunferência da cintura foi mensurada em duplicata com fita métrica inextensível. A medida foi obtida na metade da distância entre a crista ilíaca e o

rebordo costal inferior⁷². Foram utilizados para classificação os padrões de referência sugeridos pela NCEP-ATPIII⁴⁰.

5.3. AVALIAÇÃO DO CONSUMO DIETÉTICO

O consumo de alimentos foi obtido por meio do método Recordatório de 24 horas, aplicado duas vezes, com intervalo entre 30-45 dias. Para auxiliar na quantificação dos alimentos consumidos em medidas caseiras, foram adotados modelos fotográficos que ajudaram aos entrevistados na identificação dos utensílios que utilizam no seu dia a dia, bem como, a quantificar o tamanho das porções em pequena, média ou grande dos alimentos e bebidas consumidas. Após a obtenção dos dados em medidas caseiras, realizou-se a conversão em gramas e mililitros. A análise das dietas foi feita utilizando o Virtual Nutri Plus 2.0[®] (São Paulo, Brasil). Os alimentos que não foram encontrados no banco de dados do *software* foram adicionados a partir da composição das diversas tabelas e rótulos dos produtos; assim como as preparações, as quais foram determinadas por meio de fichas dietéticas.

Foram avaliadas a ingestão de energia, macronutrientes e fibra, seguindo a recomendação da I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica¹, ou seja: 20kcal a 25kcal/kg peso de gasto energético total, 50 a 60% de calorias totais de carboidratos, 25 a 35% de gordura total, 0,8g a 1,0g/kg de peso atual/dia ou 15% de calorias totais de proteínas e 20 a 30g de fibra. Para avaliar a adequação de zinco consumido foram utilizados os valores de referência para população, necessidade média estimada (*Estimated Average Requirements - EAR*), de 9,4mg/dia para homens e 6,8mg/dia para mulheres⁷³. A estimativa de distribuição alimentar habitual do grupo foi realizada pela aplicação de testes estatísticos para se obter os valores dos nutrientes ajustados pela variabilidade intra e interpessoal e energia^{74,75}. A prevalência de inadequação de zinco foi estimada considerando a proporção de indivíduos com ingestão abaixo dos valores de EAR.

5.4. AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL

A pressão arterial sistólica e diastólica foi avaliada durante consulta clínica de acordo com os procedimentos da VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial⁷⁶. Valores para pressão sistólica ≥ 130 mmHg e/ou pressão diastólica ≥ 85 mmHg foram considerados elevados.

5.5. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Para realização das análises bioquímicas, foram coletadas amostras de sangue dos indivíduos após jejum noturno de 12 horas por punção venosa padrão, utilizando-se seringas e agulhas de inox estéreis e descartáveis. O sangue foi distribuído em tubos com e sem anticoagulantes, de acordo com os procedimentos específicos para cada análise.

Foram realizadas as seguintes análises bioquímicas: glicemia de jejum, hemoglobina glicada (HbA1c), insulina, colesterol total, triglicerídeos, HDL-c e LDL-c, proteína C reativa ultra sensível (PCR-us), hormônio estimulante da tireoide (TSH), T4 livre, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), zinco no plasma, eritrócito e urina. As dosagens de glicemia de jejum, colesterol total e triglicerídeos foram realizadas pelo método enzimático e as medidas da concentração de HDL-c foram realizadas por ensaio colorimétrico direto. Os valores de LDL-c foram obtidos pela aplicação da fórmula de *Friedewald*⁷⁷. Não-HDL-c foi calculado utilizando a fórmula: não-HDL-c = colesterol total – HDL-c. As análises de insulina, TSH e T4 foram realizadas por ensaio quimioluminescente. A HbA1c e PCH-us foram realizadas por método de imunoturbidimetria, enquanto que AST e ALT foram realizados pelo método enzimático UV. Para todos os métodos foram utilizados os kits da Wiener Lab[®] (equipamento CMD 800iX1), exceto para a dosagem de hormônios, que foram utilizados os kits da Beckman Coulter[®] (equipamento UniCel[®] Dxl 800 Immunoassay System). Todas estas análises foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do HUOL-UFRN.

O marcador utilizado para avaliar a resistência à insulina, *homeostasis model assessment – insulin resistance* (HOMA-IR), foi obtido por meio

de valores de insulina e glicemia de jejum: $[(\text{insulina} \mu\text{U/mL} \times \text{glicemia mmol/L}) / 22,5]^{78}$.

5.5.1. Avaliação dos Biomarcadores de Zinco

Para a análise bioquímica de zinco, todo o material utilizado nos procedimentos de coleta da amostra e análise foi devidamente desmineralizado em solução de ácido nítrico 20% por, no mínimo 12 horas, e enxaguado com água desmineralizada, de acordo com protocolo estabelecido.

As amostras de sangue para as análises de zinco foram coletadas em tubos desmineralizados, utilizando-se solução de citrato de sódio a 30% como anticoagulante. Posteriormente, o sangue foi centrifugado a 1.076 força-G (3.000RPM) por 15 minutos, 4°C, e separado o plasma. Em seguida, o concentrado de hemácias foi submetido a três lavagens subsequentes com 5mL de solução de cloreto de sódio a 0,9%, rotação de 2.240 força-G (3.300 RPM), a 4°C, durante 15 minutos. O plasma e eritrócitos foram armazenados a -20°C até o momento das análises. Para análise de zinco na urina, coletou-se a urina de 24hs em recipiente desmineralizado, devendo ser armazenado em geladeira até a entrega no Ambulatório. Após o recebimento, o material foi homogeneizado, verificado o volume total e separadas duas alíquotas que foram armazenadas a -20°C até o momento das análises.

As determinações de zinco no plasma, eritrócito e urina foram realizadas por espectrofotometria de absorção atômica, utilizando-se o equipamento Spectra Varian AA-240 (Varian®, EUA), do Núcleo de Ensino e Pesquisa em Petróleo e Gás (NUPEG) do Departamento de Engenharia Química – UFRN, considerando um comprimento de onda de 231,9nm, fenda de 1,0nm, amperagem de 5,0 mA, fator de expansão 1,0 e fluxo da amostra de 5mL/min. As curvas foram preparadas utilizando-se como padrão a solução de zinco Tritisol (Merck®), definindo-se os pontos na curva, nas concentrações de 0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 e 1,0 µg/mL. A curva padrão para a leitura de zinco no plasma foi preparada com adição de glicerol na concentração de 5%.

As análises foram realizadas em duplicata e o resultado foi obtido a partir das médias dos valores, estabelecendo-se um coeficiente de variação inferior a

10%. Para certificação das análises de minerais foram utilizados como materiais de referência os padrões Seronorm™ Trace Elements Serum L-1 (Noruega) (Referência 201405, Lote 0903106), preparados de acordo com as recomendações do fabricante. Estes padrões foram utilizados tanto nas análises de zinco no plasma como eritrócitos e urina.

A determinação da concentração de zinco no plasma foi realizada segundo o método proposto por Rodrigues et al.⁷⁹. Amostras de 500µL de plasma foram preparadas diluindo-se em ultra-pura (Milli-Q®), na proporção de 1:4 e aspiradas diretamente na chama do aparelho. Os resultados foram expressos em µg de Zn/dL. Foram considerados como referência para zinco no plasma os valores de 70 a 110 µg Zn/dL⁸⁰.

Já as análises de zinco no eritrócito foram realizadas de acordo com Whitehouse et al.⁸¹, seguindo a padronização de metodologia proposta por Sena et al.⁸⁶. Uma alíquota de 300µL de eritrócito foi diluída com água ultra-pura (Milli-Q®) na proporção de 1:3 e em seguida pipetados 300µL deste lisado (lisado 1), em duplicata, para uma diluição subsequente na proporção de 1:9 (lisado 2). Após homogeneização, as amostras do lisado 2 foram lidas diretamente em chama. Os resultados foram expressos em µg Zn/mL e µg de Zn/g de hemoglobina, considerando como valores de referência 10 – 15µg de Zn/mL e 40 - 44 µg de Zn/g Hemoglobina⁸⁰.

Com a finalidade de expressar os resultados de zinco/massa de hemoglobina, foi realizada a determinação de hemoglobina no eritrócito. Para tanto, foram utilizados os kits de reagente da *Labtest Diagnóstica*®, reagente de cor (RCOR CAT 43) e realizada leitura por espectrofotometria.

A determinação da concentração de zinco na urina foi realizada pelo método proposto por Kiilerich et al.⁸². As amostras de urina foram diluídas em água deionizada na proporção de 1:1 (2mL/2mL). Em seguida, as amostras foram cuidadosamente homogeneizadas sob agitação e lidas por aspiração em chama direta, após ajuste das condições de leitura do aparelho. Os resultados foram expressos em µg Zn/24h, considerando como referência valores de 300 a 600µg Zn/24horas⁸³.

5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a realização da análise estatística completa, incluindo todos os participantes do estudo, foram aplicadas metodologias de imputação múltipla dos dados faltantes (*missing data*) para as seguintes variáveis: insulina, HbA1c, HOMA-IR, triglicérides, LDL-c, PCR-us, zinco no plasma, zinco no eritrócito, zinco na urina. As variáveis com dados faltantes foram imputadas por meio de equações em cadeia (Apêndice 1), metodologia também denominada de especificação condicional completa, onde modelos de imputação univariados condicionais são especificados de modo separado para cada variável. Foi assumido que os dados estão faltantes ao acaso - *missing at random (MAR)*. O objetivo dessa metodologia não é recriar os dados faltantes, mas, sim, inferir sobre como seria o resultado estatístico final⁸⁴. Após a imputação, as análises foram conduzidas de forma tradicional por meio de metodologias apropriadas.

Para a análise descritiva das variáveis contínuas utilizou-se média (desvio-padrão) (DP), média (intervalo de confiança [IC] de 95%) e mediana (intervalo interquartil) quando apropriado. A distribuição das variáveis contínuas foi avaliada visualmente pela construção de histogramas. Devido à característica moderadamente simétrica da maioria das variáveis, utilizou-se abordagens paramétricas, seguindo as orientações de Fagerland⁸⁵. Contagens e proporções foram utilizadas para sumarizar variáveis binárias. Para comparação intragrupo (caso e controle) foi utilizado o teste “t” de *Student* para amostras independentes e o teste de exato de *Fisher* para testar diferenças entre variáveis contínuas e proporções, respectivamente.

O efeito dos biomarcadores de zinco foi estimado pela diferença entre a média do grupo caso e a média do grupo controle. A diferença entre casos e controles é representada pela variável Δ , onde $\Delta = (\text{média do grupo caso}) - (\text{média do grupo controle})$. A diferença, Δ , foi ajustada para covariáveis por meio de modelos de regressão linear simples e modelos de regressão linear múltipla.

As correlações entre os fatores de risco cardiometabólicos e biomarcadores do *status* zinco foram avaliadas pelo coeficiente de *Pearson* (r). Para as variáveis que tiveram observações imputadas, o coeficiente de *Pearson* foi computado por meio do coeficiente de regressão linear simples. Nessas análises, as

variáveis foram centralizadas em suas médias e padronizadas pelo desvio-padrão amostral. Os percentis 25, 50 e 75 para as variáveis com dados imputados foram construídos com base em modelos de regressão quantílica sem uma variável preditora. O nível de significância α adotado para todas as análises foi de 5%. O *software* utilizado foi o Stata 14.0 (*Stata Corporation, College Station, TX, EUA*).

Para a avaliação da ingestão dos nutrientes foram aplicados testes estatísticos específicos, no sentido de ajustar os dados considerando as variâncias intra e interpessoais e ingestão energética, resultando em valores mais precisos e exatos. Inicialmente, foi construído um banco de dados em planilha Excel a partir dos dados exportadas do *software* Virtual Nutri Plus 2.0[®], relativos à ingestão de zinco. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* SPSS, versão 17.0 (*Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, EUA*), análise descritiva (média e desvio padrão) com as variáveis dietéticas, sendo verificada a normalidade pelo teste *Kolmogorov-Smirnov Z* para cada variável.

A partir dos dados ajustados pela variância intra e interpessoal, foi realizado o ajuste pela energia proposto por Willett e Stampfer⁷⁵. Posteriormente, foi realizada uma análise de regressão linear simples, obtendo-se o valor estimado da ingestão do nutriente e calculado o resíduo da regressão, que é representado pela diferença de ingestão observada do nutriente e a ingestão estimada para cada indivíduo, de acordo com a ingestão calórica avaliada pela regressão linear. Foi adicionado a este, uma constante ao valor do nutriente residual, fornecendo a quantidade do nutriente ajustado, ou seja, sem influência da energia. A prevalência de ingestão inadequada de zinco do grupo foi obtida por meio da aplicação de fórmulas específicas.

6. ARTIGO PRODUZIDO

6.1. O artigo intitulado “*Zinc status biomarkers and cardiometabolic risk factors in metabolic syndrome: a case control study*” foi submetido para publicação no periódico “*Nutrients*”, que possui fator de impacto 3,759 e Qualis A1 da CAPES para área de Nutrição

14/10/2016

Manuscript Revision

MDPI Journals A-Z Information & Guidelines About Editorial Process kcmsena@yahoo.com.br My Profile Logout Submit

User Menu

- [User Profile](#)
- [Manage E-Mail Alerts](#)
- [Manage E-Mail Newsletters](#)
- [Manage Saved Searches](#)
- [Change Password](#)
- [Edit Profile Logout](#)

Submissions Menu

- [Submit Manuscript](#)
- [Display Submitted Manuscripts](#)
- [English Editing](#)
- [Invoices](#)
- [Display Co-Authored Manuscripts](#)
- [Help](#)

Reviewers Menu

- [Reviewing Preferences](#)

Manuscript ID	nutrients-158567
Manuscript Status	Submitted
Manuscript Title	Zinc status biomarkers and cardiometabolic risk factors in metabolic syndrome: a case control study
Journal	Nutrients
Article type	Article
Abstract	Metabolic syndrome (MS) involves pathophysiological alterations that might compromise zinc status. The aim of this study was to evaluate zinc status biomarkers and their associations with cardiometabolic factors in patients with MS. Our case control study included 88 patients with MS, and 37 controls. We performed clinical and anthropometric assessments and obtained lipid, glycemic, and inflammatory profiles. We also evaluated zinc intake, plasma zinc, erythrocyte zinc, and urinary zinc excretion levels. The average zinc intake was significantly lower in the MS group ($p < 0.001$). Regression models indicated no significant differences in plasma zinc levels ($all > 0.05$) between the two groups. We found significantly higher erythrocyte zinc levels in the MS group ($p < 0.001$) independent from co-variable adjustments. Urinary zinc excretion level was significantly higher in the MS group ($p = 0.008$), and adjustments for age and sex explained 21% of the difference, ($R^2 = 0.21$, $p < 0.001$). There were significant associations between zincuria and fasting blood glucose level ($r = 0.479$), waist circumference ($r = 0.253$), triglyceride levels ($r = 0.360$), glycated hemoglobin levels ($r = 0.250$), homeostatic model assessment insulin resistance ($r = 0.223$), and high-sensitivity C-reactive protein levels ($r = 0.427$) ($all p < 0.05$) in the MS group. In conclusion, impairments in zinc status were observed in patients with MS, and cardiometabolic risk factors influence zincuria.
Authors	Erika P. S. Freitas , Aline T. O. Cunha , S�ephora L. S. Aquino , Lucia F. C. Pedrosa , Severina C. V. C. Lima , Josivan G. Lima , Maria Das Graças Almeida , Karine C. M. Sena-Evangelista *
Author Emails	erikapsf@hotmail.com, nine_tuane@hotmail.com, sephoralouyse@msn.com, ifcpedrosa@gmail.com, scvclima@gmail.com, josivanlima@gmail.com, mgalmeida84@gmail.com, kcmsena@yahoo.com.br
Date of submission	14 October 2016
Preprints	We now offer the option to make your (not yet peer-reviewed) manuscript available online immediately on the new preprint platform Preprints. Preprints permanently archives full text documents and data More...
Files	
Coverletter File	coverletter.v1.pdf
Manuscript	manuscript.v1.docx
Figures	figures.v1.zip
Funding	
Funding information	Programa 158/Bolsas acordo CAPES/FAPERJ: FAPERJ/CAPES 006/2014

Article

Zinc status biomarkers and cardiometabolic risk factors in metabolic syndrome: a case control study

Erika P. S. Freitas¹, Aline T. O. Cunha², Séphora L. S. Aquino¹, Lucia F. C. Pedrosa^{1,3}, Severina C. V. C. Lima^{1,3}, Josivan G. Lima⁴, Maria G. Almeida⁵ and Karine C. M. Sena-Evangelista^{1,3,*}

¹ Postgraduate Nutrition Program, Center for Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal RN 59078-970, Brazil; erikapsf@hotmail.com (E.P.S.F.); sephoralouyse@msn.com (S.L.S.A.); lfcpedrosa@gmail.com (L.F.C.P.); scvclima@gmail.com (S.C.V.C.L.); kcmsena@yahoo.com.br (K.C.M.S.E.)

² Postgraduate Center for Health Sciences, Center for Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal RN 59012-570, Brazil; nine_tuane@hotmail.com (A.T.O.C.).

³ Department of Nutrition, Center for Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal RN 59078-970, Brazil.

⁴ Department of Clinical Medicine, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal RN 59010-180, Brazil; josivanlima@gmail.com (J.G.L.).

⁵ Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal RN 59012-570, Brazil; mgalmeida84@gmail.com (M.G.A.).

* Correspondence: kcmsena@yahoo.com.br; Tel.: +55-84-3342-2291

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: Metabolic syndrome (MS) involves pathophysiological alterations that might compromise zinc status. The aim of this study was to evaluate zinc status biomarkers and their associations with cardiometabolic factors in patients with MS. Our case control study included 88 patients with MS, and 37 controls. We performed clinical and anthropometric assessments and obtained lipid, glycemic, and inflammatory profiles. We also evaluated zinc intake, plasma zinc, erythrocyte zinc, and urinary zinc excretion levels. The average zinc intake was significantly lower in the MS group ($p < 0.001$). Regression models indicated no significant differences in plasma zinc levels ($\text{all} > 0.05$) between the two groups. We found significantly higher erythrocyte zinc levels in the MS group ($p < 0.001$) independent from co-variable adjustments. Urinary zinc excretion level was significantly higher in the MS group ($p = 0.008$), and adjustments for age and sex explained 21% of the difference, ($R^2 = 0.21$, $p < 0.001$). There were significant associations between zincuria and fasting blood glucose level ($r = 0.479$), waist circumference ($r = 0.253$), triglyceride levels ($r = 0.360$), glycated hemoglobin levels ($r = 0.250$), homeostatic model assessment - insulin resistance ($r = 0.223$), and high-sensitivity C-reactive protein levels ($r = 0.427$) ($\text{all } p < 0.05$) in the MS group. In conclusion, impairments in zinc status were observed in patients with MS, and cardiometabolic risk factors influence zincuria.

Keywords: metabolic syndrome, zinc, biomarkers, risk factors, cardiovascular diseases.

1. Introduction

Metabolic syndrome (MS) is a multifactorial disease, and is influenced by metabolic, genetic, and environmental factors. The main MS alterations are glucose intolerance, abdominal adiposity, arterial hypertension, atherogenic dyslipidemia, and the consequent manifestations of pro-inflammatory and pro-thrombotic states [1]. The prevalence of MS and associated factors has been studied in many populations. In Latin-American countries, including Brazil, the prevalence is 24.9% [2].

Zinc has attracted interest in studies of its relations to MS due to the fact that this mineral has structural, catalytic, and regulatory roles in many proteins involved in pathophysiological mechanisms related to MS [3]. Zinc is involved in insulin synthesis and secretion [4,5], and blood

pressure regulation [6], and has antioxidant and anti-inflammatory properties [7,8]. Inadequate zinc intake seems to lead to the occurrence of MS or its components [9,10]. However, studies evaluating zinc status in patients with MS have been controversial and have had inconclusive results [11–13]. Some of these studies demonstrated an association of zinc with MS components, such as fasting blood glucose (FBG) level [14,15], blood pressure [13,16], and abdominal obesity [16,17]. Additionally, some authors have shown that greater numbers of MS components are associated with lower plasma zinc concentrations [13].

There are gaps in the literature regarding zinc intake and other zinc biomarkers. The majority of the studies use plasma zinc as a zinc status biomarker and few explore urinary zinc excretion and cellular biomarkers, such as erythrocyte zinc [18,19]. Considering the fact that there are no zinc stores in organisms, and that homeostatic control of zinc is complex and can involve both fast and slow mechanisms for turnover of the cell regulation of zinc [20], some authors suggest that investigating zinc status through an isolated marker can affect the conclusions of studies or generalization made about specific results [21]. Thus, in order to better understand the relationship between zinc and MS, we evaluated zinc status biomarkers and their associations with cardiometabolic risk factors in individuals with MS.

2. Materials and Methods

2.1. Study population

The inclusion criteria for the MS group were age of 20-76 years, both sexes, and the presence of MS according to the criteria from the National Cholesterol Education Program – Third Adult Treatment Panel (NCEP-ATPIII) [22], which includes the presence of at least three of the following alterations: waist circumference (WC) >102 cm in men and >88 cm in women; triglyceride (TG) levels ≥ 150 mg/dL; high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c) <40 mg/dL in men and <50 mg/dL in women; systolic blood pressure (SBP) ≥ 130 mmHg and/or diastolic blood pressure (DBP) ≥ 85 mmHg and/or use of antihypertensive drugs and FBG ≥ 100 mg/dL and/or use of oral antidiabetic drugs. The FBG cut-off point was adjusted according to guidelines from the American Diabetes Association [23]. The inclusion criteria for the control group were WC <102 cm in men and <88 cm in women, absence of arterial hypertension, diabetes mellitus (DM), and insulin resistance, and the absence of antihypertensive and antidiabetic drug use.

The exclusion criteria for both groups were: type 1 DM, type 2 DM with insulin use, use of glucocorticoids in the last 3 months, use of vitamin-mineral supplements in the past 3 months, alterations in renal and hepatic function, and decompensated heart failure. Patients with memory or mental health issues and pregnant and nursing patients were also excluded.

The study population consisted of 88 patients with MS and 37 controls. Between March 2015 and February 2016, 875 medical records were screened, from which 119 individuals met the criteria for MS. However, 26 individuals did not appear for their clinical appointment and 5 refused to be a part of the research, leading to a total of 88 patients. Two-hundred and fifty-three individuals were contacted to be a part of the control group, but only 37 met the specific inclusion criteria.

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Hospital Universitario Onofre Lopes's Research Ethics Committee under protocol number CAAE no. 38566914.5.0000.5292, of February 27, 2015. All participants gave their informed consent for inclusion before they participated in the study.

2.2. Study design

The longitudinal study, which was a non-paired case-control study, was conducted at the Endocrinology Ambulatory department of Hospital Universitario Onofre Lopes, located in Natal/RN, Northeast Brazil. During the first appointment, the individual underwent a clinical assessment, where blood pressure was measured (spine pressure device, Mercury Plus, Unitec®), as recommended by the Sixth Edition of the Brazilian Guidelines on Arterial Hypertension [24]). The subject's weight

(digital balance, Tanita®, MEA-03140 model) and stature (portable stadiometer, Sanny®) were measured for body mass index (BMI) calculation. The BMIs were classified according to the cut-off points recommended by the Brazilian Food and Nutrition Surveillance System [25]. We also measured the WC at the midpoint between the last rib and the iliac crest, using an inextensible measuring tape. We also carried out the first nutritional survey, using a 24-hour recall (24-HR) and a questionnaire on personal and health information. Blood and urine sample collection for biochemical analysis was scheduled at this time. Thirty to forty-five days later, the individual's food intake was assessed (Figure 1).

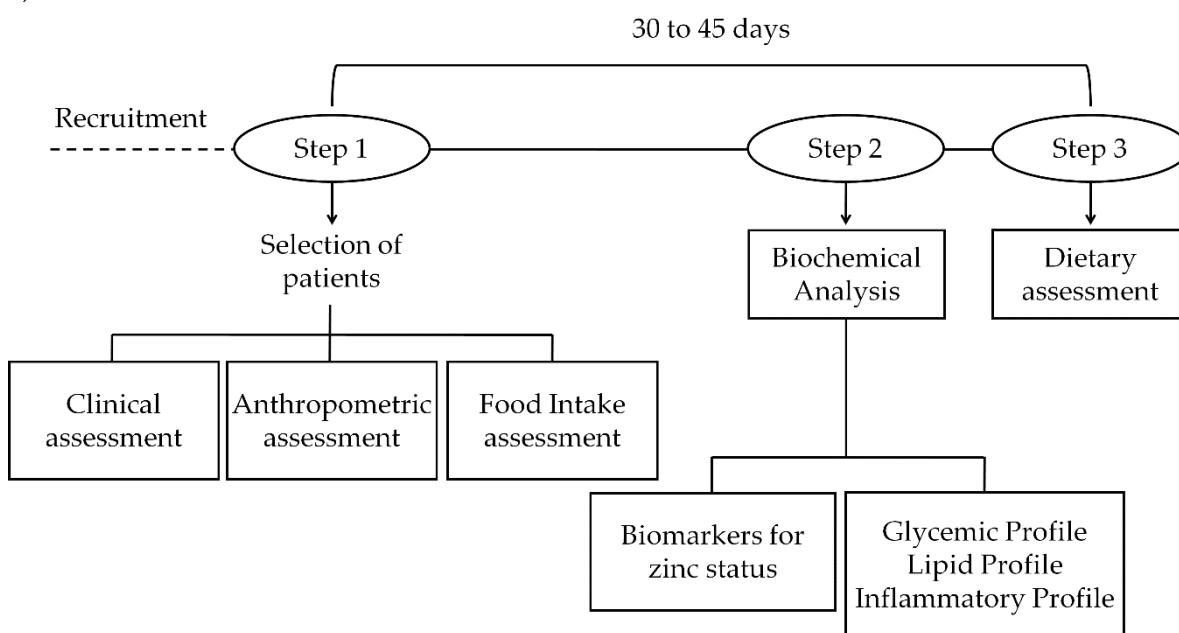


Figure 1. Study Design.

2.3. Food intake assessment

Habitual food intake was investigated using two 24-HRs, with an interval of 30-45 days. The subject's diet was analyzed using the Virtual Nutri Plus 2.0® software (São Paulo, Brazil). Nutritional information for new preparations and foods were added to the database as necessary along with data regarding nutritional composition from the Brazilian food composition table (TACO) and the United States Department of Agriculture (USDA).

The prevalence of inadequate zinc intake was estimated according to sex and age, using the estimated average requirements (EAR) cut-point method [26], considering the proportion of individuals with intake below the EAR value. Zinc values were adjusted based on intra- and inter-personal variability and energy [27,28].

2.4. Biochemical tests

Blood samples (20 mL) were collected via venipuncture after an overnight fasting of 10-12 hours. These samples were used for FBG, total cholesterol, and TG analysis, using an enzymatic method. HDL-c levels were determined via a direct colorimetric test, and low density lipoprotein cholesterol (LDL-c) levels were obtained using the Friedewald formula [29]. Non-HDL-c was calculated using the formula:

$$\text{non-HDL-c} = \text{CT} - \text{HDL-c} \quad (1)$$

Glycated hemoglobin (HbA1c) and high-sensitivity C-reactive protein (hs-PCR) were analyzed using the immunoturbidimetry method. All of the above tests were performed using CMD 800iX1 and Wiener Lab® (Wiener lab group, Argentina) kits. Insulin determination was performed using a chemiluminescent test, using an analysis kit from Beckman Coulter® (immunoassay system, Unicel®

DxI800, California, United States of America). To evaluate insulin resistance, we used the homeostasis model assessment – insulin resistance (HOMA-IR) index, which was obtained using insulin fasting values and FBG:

$$\text{HOMA-IR} = [(\text{insulin } \mu\text{U/mL} \times \text{FBG mmol/dL}) / 22.5] \quad (2)$$

2.4.1. Zinc status assessment biomarkers

Zinc status assessment was performed using plasma zinc, erythrocyte zinc, and urinary zinc excretion. To minimize mineral contamination, all glassware and plastic containers used during the blood collection and zinc analyses were carefully demineralized in a 20% nitric acid bath for at least 12 hours and rinsed 10 times with ultra-pure water (Milli-Q®).

Blood samples were collected in tubes containing 30% sodium citrate and separated into plasma and erythrocytes. In order to carry out the urinary zinc excretion analysis, we performed urine collection over a period of 24 hours. Plasma zinc, erythrocyte zinc levels, and urinary zinc excretion were determined by atomic absorption spectrophotometry, using Spectra Varian AA-240 (Varian Medical Systems, Inc., Milpitas, CA). We calibrated the assay using the following working conditions: wavelength, 231.9 nm; slit width, 1.0 nm; current, 5.0 mA; expansion factor, 1.0; and sample flow, 5 mL/minute. A standard zinc solution (Tritisol®, Merck, Germany) was used to define the points of the calibration curve, which included concentrations of 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, and 1.0 µg/mL. The standard curve for the reading of plasma zinc levels was prepared with the addition of 5% glycerol. Seronorm™ Trace Elements Serum L-1 solution (Norway) (Reference 201405, Lot 0903106) was used as reference for zinc analysis.

Plasma zinc levels were determined according to the method described by Rodrigues et al. [30]. We used values of 70 to 110 µg Zn/dL as reference for plasma zinc levels [31]. Zinc analysis in erythrocytes was performed according to Whitehouse et al. [32], following the standardization of the methodology proposed by Sena et al. [33]. The results were expressed as µg zinc/g of hemoglobin, with reference value of 40–44 µg Zn/g Hb [31]. In order to determine hemoglobin levels in erythrocytes, we used reagent kits from Labtest Diagnóstica® and a color reagent (RCOR CAT 43). We performed the experiments using spectrophotometry at 540 nm (Hach Company, model DR 5000, Germany). Determination of urinary zinc excretion was carried out using the method proposed by Kiilerich et al. [34]. The results were expressed as µg Zn/24 hours, with reference values of 300 to 600 µg Zn/24 hours [35].

2.5. Statistical analysis

Because of the low recruitment rate (125 individuals, 88 with MS and 37 controls), our study had a statistical power of 20.5% to detect a plasma zinc level difference of 4 µg/dL (or more) between the groups.

We first performed multiple missing data imputation techniques [36] for the following variables: insulin, HbA1c, HOMA-IR, TG, LDL-c, hs-PCR, plasma zinc, erythrocyte zinc, and urine zinc. Continuous variables were expressed as mean ± standard deviation (SD), mean (confidence interval [CI] of 95%), or median (interquartile interval), as appropriate. Continuous variable distributions were visually evaluated using histograms. Due to the moderately symmetrical characteristic of most variables, we used parametric approaches following the Fagerland guidelines [37]. Counts and proportions were used to summarize binary variables. For intragroup comparisons (case vs. control), we used the Student's t test for independent samples and Fisher's exact test to test differences among continuous variables and proportions, respectively. Differences between cases and controls are indicated by "Δ", where Δ = (case group mean) – (group control mean). The "Δ" difference was adjusted to co-variables through simple and multiple linear regression models. The correlations between MS cardiometabolic risk factors and zinc biomarkers were measured using the Pearson's correlation coefficient test (r). For variables with imputed observations, Pearson's coefficient was

computed using a simple linear regression coefficient. Statistical significance α was set at the 5% level. We used Stata 14.0 software (Stata Corporation, College Station, TX, USA).

3. Results

The general characteristics of the patients are summarized in Table 1. The mean age of patients with MS was significantly higher than that of subjects in the control group (50 (11) vs. 44 (11), $p = 0.011$). Females were predominant in both groups. The mean WC of patients with MS indicated an increased risk of cardiovascular disease. Patients with MS had dyslipidemia (92%), arterial hypertension (76%), and obesity (66%). We observed that 86% of the patients with MS met more than three MS diagnosis criteria. The most frequent components found were arterial hypertension or altered blood pressure (90%), increased WC (86%), and altered type 2 DM or FBG (76%).

We observed that the mean values of FBG, insulin, HbA1c (all $p < 0.001$), and HOMA-IR ($p = 0.002$) were significantly higher in the MS group than in the control group. Significantly lower values for HDL-c ($p < 0.001$) and higher TG values ($p = 0.034$) were observed in the MS group. The MS group had an inflammatory profile, as indicated by the significantly higher hs-PCR levels ($p < 0.001$).

The MS group had significantly lower zinc intake compared to the control group (6.57 (1.64) mg/day vs. 9.37 (2.41) mg/d, $p < 0.001$). We found a high prevalence of inadequate zinc intake in the participants of this study (56% of women and 95% of men in the MS group and 18% of women and 40% of men in the control group). We did not observe statistically significant differences in plasma zinc levels between the two groups ($p > 0.05$). However, erythrocyte zinc levels in patients with MS were significantly higher compared to the control group ($p < 0.001$). Patients with MS had increased urinary zinc excretion compared to control subjects, and the difference was statistically significant ($p = 0.008$).

Table 1. General characteristics, metabolic profiles, and zinc biomarkers.

Variables	Patients with MS (n = 88)	Control (n = 37)	p-value
Age (year) ^a	50 (11)	44 (11)	0.011
Sex (F/M)	64 / 24	25 / 12	0.666
WC (cm) ^a	105.50(12.60)	82.40(6.98)	<0.001
DM ^b	43 (49)	0	<0.001
Arterial hypertension ^b	67 (76)	0	<0.001
Obesity ^b	58 (66)	0	<0.001
Dyslipidemia ^b	81 (92)	23 (62)	<0.001
SBP (mmHg) ^a	134.85 (18.28)	114.46 (7.24)	<0.001
DBP (mmHg) ^a	88.47 (11.51)	74.59 (7.3)	<0.001
FBG (mg/dL) ^a	119.70(47.7)	84.70(11.27)	<0.001
Insulin (μUI/mL) ^c	8.87 (5.10-13.76)	4.95 (3.48-6.93)	<0.001
HbA1c (%) ^a	6.91 (1.67)	5.40(0.52)	<0.001
HOMA-IR ^c	2.35 (0.94-3.55)	0.99 (0.73-1.42)	0.002
Total cholesterol (mg/dL) ^a	210.73 (60.22)	212.97(49.08)	0.841
LDL-c (mg/dL) ^a	128.28 (48.44)	134.70 (43.83)	0.488
HDL-c (mg/dL) ^a	44.95 (9.32)	53.92 (11.34)	<0.001
TG (mg/dL) ^c	156.00 (126.90-215.50)	106.00 (75.00-177.00)	0.034
Non HDL-c (mg/dL) ^a	165.76 (57.99)	159.05 (48.76)	0.538
hs-PCR (mg/L) ^c	1.98 (0.67-6.59)	0.34 (0.09-0.98)	<0.001
Zinc intake (mg/d) ^a	6.57(1.64)	9.37(2.41)	<0.001
Plasma zinc (μg/dL) ^a	88.81 (18.28)	87.82 (17.44)	0.783
Erythrocyte zinc (μg/g Hb) ^a	47.47 (8.29)	41.43 (7.37)	<0.001
Urinary zinc excretion (μg/24 h) ^c	554.80 (291.00-787.60)	375.40 (197.60-597.50)	0.008

a Data presented as mean (standard deviation)

b Data presented as n (%)

c Data presented median (interquartile interval)

WC, waist circumference; DM, diabetes mellitus; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; FBG, fasting blood glucose; HbA1c, glycated hemoglobin; HOMA-IR, homeostasis model assessment – insulin resistance; LDL-c, low-density cholesterol; HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol; TG, triglyceride; non HDL-c, non high-density lipoprotein cholesterol; hs-PCR, high-sensitivity C-reactive protein.

Figure 2 shows the multiple linear regression models created to evaluate zinc intake and sex and age influences on the differences in plasma (2A), erythrocyte (2B), and urine zinc (2C) between patients with MS and controls. The regression models confirmed that there are no statistically significant differences in plasma zinc levels between patients with MS and controls independent of adjustment variables (all $p > 0.05$) (Figure 2A). Erythrocyte zinc levels were significantly higher in patients with MS in all adjustment models (all $p < 0.05$). We observed that the model without adjustment (model 1) already explains 10% of the variability in this measure ($R^2 = 0.10$, $p < 0.001$), confirming that there is no influence of co-variables, such as zinc intake, sex, and age on this measure (Figure 2B).

There were differences in urinary zinc excretion between the MS and control groups after adjustments for zinc intake, sex, age, and other combinations of variables (all $p < 0.05$). The MS group had a mean urinary zinc excretion 207.40 units higher than that of the control group (model 1). This difference increased following changes to the adjustment variables. The adjustment models 7 (sex and

age) and 8 (zinc intake, sex, and age) explained the variability the most, with both explaining 21% of the variability ($R^2 = 0.21$, $p < 0.001$) (Figure 2C). These models indicate that the mean urinary zinc excretion rate is 266.98 $\mu\text{g}/24$ hours higher in patients with MS group compared to controls.

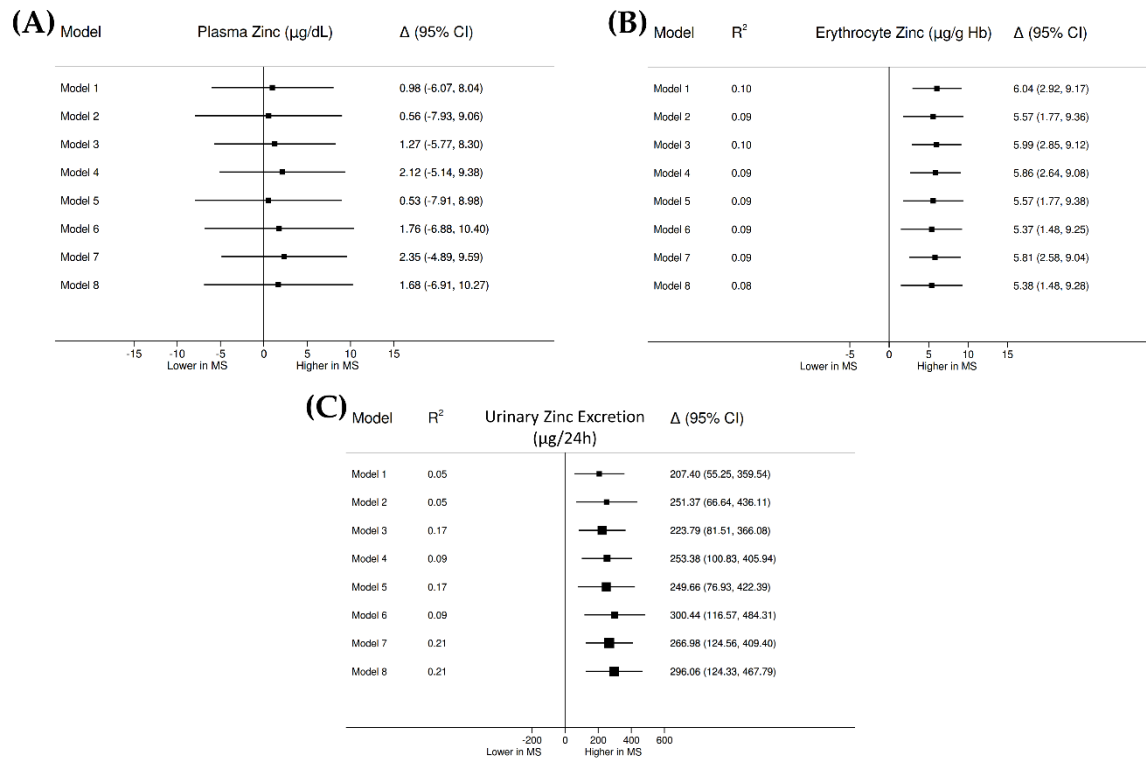


Figure 2. Forest plot for comparison of plasma zinc level (A), erythrocytes zinc level (B), and urinary zinc excretion (C) between patients with MS and the control group, according to the adjustment models. Model 1: without adjustment; Model 2: adjusted for zinc intake; Model 3: adjusted for sex; Model 4: adjusted for age; Model 5: Adjusted for dietary zinc and sex; Model 6: Adjusted for zinc intake and age; Model 7: adjusted for sex and age; and Model 8: Adjusted for zinc intake, sex, and age. Horizontal lines indicate the 95% confidence interval (CI) for each model. When the confidence interval does not cross the vertical axis (centered at zero), the difference in the zinc biomarker levels among the study groups is statistically significant ($p < 0.05$). If the confidence interval line is to the right of the central axis, it indicates that the zinc biomarker levels are higher for patients with MS compared to the control group. In contrast, if it is on the left of the central axis, it indicates that the levels are lower in the MS group in relation to the controls. R^2 : determination coefficient; Δ : estimates of the difference between patients with MS and controls, whose mean is inside the square (■); the area of each square is proportional to the variability explained by the model.

We did not observe significant associations between plasma and erythrocyte zinc levels and cardiometabolic risk factors in any of the groups. We observed statistically significant positive correlations between urinary zinc excretion and WC ($r = 0.253$, $p = 0.02$), TG ($r = 0.360$, $p < 0.01$), FBG ($r = 0.479$, $p < 0.01$), HbA1c ($r = 0.250$, $p = 0.02$), HOMA-IR ($r = 0.223$, $p = 0.04$), and hs-PCR ($r = 0.427$, $p < 0.01$) in patients with MS. This indicates that zincuria increases are proportional to the increases in alterations of most of the MS components and other cardiometabolic risk factors. The same results were not found in the control group. The only exceptions were WC ($r = 0.434$, $p < 0.01$) and DBP ($r = 0.499$, $p < 0.01$) (Table 2).

Table 2. Correlations between urinary zinc excretion and cardiometabolic risk factors.

Variables	Patients with MS		Controls	
	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>R</i>	<i>P</i>
WC (cm)	0.253	0.018	0.434	0.007
SBP (mmHg)	0.021	0.816	0.060	0.723
DBP (mmHg)	-0.048	0.676	0.488	0.002
TG (mg/dL)	0.360	<0.001	0.075	0.657
HDL-c (mg/dL)	-0.027	0.842	-0.248	0.138
FBG (mg/dL)	0.479	<0.001	0.147	0.384
HbA1c (%)	0.250	0.024	-0.142	0.403
Insulin (μ UI/mL)	0.029	0.787	-0.091	0.575
HOMA-IR	0.223	0.041	-0.065	0.700
hs-PCR (mg/L)	0.427	<0.001	0.303	0.082

WC, waist circumference; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; TG, triglyceride; HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol; FBG, fasting blood glucose; HbA1c, glycated hemoglobin; HOMA-IR, homeostasis model assessment – insulin resistance; hs-PCR, high-sensitivity C-reactive protein.

4. Discussion

To our knowledge, this is the first study to evaluate zinc status in patients with MS, considering zinc intake, plasma zinc, erythrocyte zinc, and urinary zinc excretion. We also studied the associations between these biomarkers and cardiometabolic risk factors. We found plasma zinc levels without any obvious indicative deficiencies in MS group although those patients have high prevalence of inadequate zinc intake. On the other hand, we observed increases in erythrocyte zinc levels and urinary zinc excretion. Alterations in cardiometabolic risk factors were positively associated only with urinary zinc excretion in patients with MS.

Assessments of zinc intake and mineral bioavailability are considered to be the best methods for estimating zinc levels at individual and population levels. These measures allow for the identification of deficiency risks [18]. Similarly, as observed in our study, Cunha et al. [38] found a high percentage of zinc intake inadequacy in patients with MS, and especially in men (75.5%). Other authors have also observed mineral intake inadequacies and have identified inverse associations with MS risk [9,10]. A possible explanation for the zinc intake inadequacies in our study is the restriction placed on certain food sources, especially foods from animal origin, that is recommended as a part of the MS treatment. Associations between dietary zinc intake and metabolic factors involved in the MS have been used to argue that deficiencies in zinc ingestion predispose to MS alterations, such as peripheral resistance to insulin, central obesity, and increases in blood pressure and TG level, and decreases in HDL-c level [4].

One specific result that attracted our attention was the fact that we did not observe correlations between zinc intake and plasma zinc levels. Additionally, we did not observe significant differences in plasma zinc levels between patients with MS and controls. Only 15% of the participants had plasma zinc values below 70 μ g/dL in either group. The literature is not very clear in this regard, as studies evaluating plasma zinc levels in patients with MS are inconclusive. A study performed using 1,926 Korean adults from both sexes also did not find significant differences in serum zinc levels between individuals with and without MS [13]. In contrast to our findings, Rotter et al. [12], observed significantly higher serum zinc levels in patients with MS than in controls in a study of 313 Polish men. In addition, in a populational study of 2,041 adult Iranians, it was found that higher serum zinc levels were associated with a lower MS prevalence in female subjects, while the opposite result was observed in male subjects [16].

Although only 1% of total zinc in the body is present in circulating blood, plasma zinc is an important biomarker and is sensitive enough to detect serious deficiencies, but has limitations in identifying marginal deficiencies. However, in order to interpret zinc levels in the plasma in clinical populations, one must consider other deficiency risk factors, such as inadequate dietary intake of zinc [18]. It is noteworthy that zinc has rigid homeostatic control and easily moves among cell compartments in order to keep the plasma mineral levels within a normal range [20]. However, we have also observed satisfactory plasma zinc levels with moderate alterations in the contents of this mineral, which may occur in order to avoid an impairment of homeostatic control [39]. Therefore, values within the reference range observed in patients with MS might not accurately reflect the corporeal zinc store, as zinc levels have fluctuations of around 20% during the day. Alterations in zinc may also occur following acute infection, hypoalbuminemia, and inflammation [40].

Some possible mechanisms may explain the plasma zinc levels observed in our study: (1) zinc mobilization among cell compartments, plasma, the liver, and the bone [41]; (2) the excretion of this mineral by the gastrointestinal tract, as zinc excretion via the intestinal lumen might be decreased, which would then reduce endogenous losses through feces [18]; and, (3) hyperglycemia, which is common in patients with MS may stimulate insulin secretion, where part of the zinc pool found in beta cells is secreted into the plasma together with the hormone [4].

Although other authors have observed negative associations between serum zinc levels and cardiometabolic risk factors, such as FBG, HOMA-IR, insulin, and blood pressure [13], and a positive association between serum zinc and HDL-c [16], we did not identify such associations in our study. This may be due to reduced numbers of participants, which resulted in a low statistical power for detecting outcomes of the plasma zinc variable. The rigid homeostatic control of the mineral implies that there are very small differences in plasma zinc levels between cases and controls. Thus, to confirm such associations, higher numbers of participants will be necessary.

Therefore, consistent with our inconclusive results regarding zinc status in the clinical population, some authors suggests that cell biomarkers might be recommended as new targets and, together with plasma zinc, provide more reliable information regarding zinc status in individuals [18]. Thus, we included the erythrocyte zinc assessment to fill the literature gaps regarding the use of this biomarker in patients with MS.

We found significantly higher erythrocyte zinc levels in the MS group compared to the control group, regardless of the participants' dietary zinc intake, sex, or age. The fact that we found no correlations between erythrocyte zinc levels and cardiometabolic risk factors such as hs-PCR may be explained by the fact that this biomarker is not very sensitive to variations in zinc intake and is suggestive of functional mineral deficiencies [18].

However, the high erythrocyte zinc levels observed in 64% of patients with MS supports a previous study by Dias et al. [42]. The authors of that study observed that patients with altered inflammatory profiles, similar to our patients, had mean erythrocyte zinc levels above the reference values. By contrast, in obese women, mean erythrocyte zinc values were found to be below 40 µg/gHb, which was significantly lower than that observed in the control group [17].

Our results indicate that patients with MS have an inflammatory profile, which was confirmed by the high hs-PCR values, which were significantly higher than those of controls. Alterations in lipid profiles, obesity, and type 2 DM lead to inflammation and oxidative stress [43]. The presence of inflammatory markers leads to alterations in the regulation of the genes for transporters of zinc and metallothionein, which compromises the redistribution of minerals in blood cells [44]. It is suggested that oxidative stress is present in type 2 DM [45] and obesity [46], which are frequent clinical conditions in our population, favors the liberation of metallothionein and increases intracellular zinc concentrations. Furthermore, oxidative damage induced by type 2 DM seems to be more prominent in erythrocytes. This favors increases in antioxidant concentrations as a mechanism of compensation to protect cells [45].

The increased urinary zinc excretion in patients with MS was the most remarkable alteration. We found that 30% of the patients had hyperzincuria. In agreement with our findings, Martins et al. [46]

observed that urinary zinc excretion is significantly higher in obese women compared to controls. In our study, the differences between the MS and control groups were better explained when we applied corrections for age and sex. In fact, increases in age lead to worst renal efficiency, which contributes to the increase in urinary zinc excretion. In addition, differences in body composition between men and women explain the higher excretion of zinc in males [47]. This information reinforces the importance of corrections for these co-variables when considering zinc excretion.

Our findings confirmed the strong influence of cardiometabolic risk factors on zincuria. The effects were especially significant for WC, hs-PCR, TG, and glycemic profile variables, regardless of dietary zinc intake. In a study of Chinese adults, it was found that DM or pre-DM subjects have higher zinc excretion [48]. Additionally, Feng et al. [49] found that urine zinc is positively correlated with FBG, and that this condition raises DM risk.

Certainly, MS cardiometabolic risk factors seem to have a more determinant role on zincuria than dietary zinc intake. In fact, the literature indicates that decreases in urinary zinc excretion are only observed with diets containing less than 1mg zinc/day [18]. The association between cardiometabolic risk factors and zincuria, confirmed in our study, highlights the fact that this condition seems to result from alterations in glucose metabolism caused by MS pathophysiological mechanisms. Abdominal adiposity, which is a remarkable characteristic of patients with MS, stimulates an increase in the liberation of free fatty acids and results in an increase in hepatic TG synthesis. This leads to muscular and hepatic insulin resistance. Additionally, abdominal adiposity induces an increase in circular inflammatory mediators, which lead to hyperglycemia [1]. The glycosuria resulting from chronic hyperglycemia influences the active transport of zinc in renal tubular cells and promotes the increase in urinary loss of this mineral [49]. In addition, albumin and other enzymes can attach to zinc and, when excreted, can lead to excretion of this mineral [50].

Other factors that might explain the increase in urinary excretion are the use of drugs for arterial hypertension, which was present in over 50% of our patients with MS. The results of a systematic review [51] confirmed that diuretics, angiotensin converting enzyme inhibitors, and angiotensin 2 receptor antagonists are related to increases in zinc urinary loss, which affects zinc metabolism.

Our work is not free from limitations. These limitations are as follows: (1) The study has a non-paired case control design, but we used regression models to consider confounding variables, such as age and sex, in addition to searching for individuals with similar social-economic conditions; (2) Even before using several recruiting strategies, the reduced numbers of participants limited the statistical power of the analysis to detect differences in the primary variable – plasma zinc – between the two groups; (3) Systematic and random mistakes in dietary intake evaluation are possible. However, the data were collected by trained professionals, who were careful to ensure the best reliability for information regarding zinc content in the tables used to track food composition.

5. Conclusions

Patients with MS had impairments in zinc status. This was characterized by an increase in erythrocyte zinc and higher urinary zinc excretion more so than the high prevalence of inadequate zinc intake. Alterations in cardiometabolic components lead to higher urinary zinc excretion in patients with MS. The results of this study highlight the importance of considering several biomarkers when assessing zinc status in MS and recognizing the relationship between this mineral and the pathophysiology of the disease. In addition, investigate biomarkers little explored in the literature have expanded our knowledge and provided us with more information regarding zinc status. MS is a multifactorial disease where each individual has his or her own characteristics, depending on a number of criteria involved in disease diagnosis. Thus, studying the phenotype of each individual as it relates to zinc biomarkers will provide more reliable answers regarding the role of zinc in the mechanisms involved in MS.

Acknowledgments: We would like to acknowledge the graduate students who took part in data collection: Giovana Gurgel, Julierle Targino, Luana Matos, Mirna Cassemiro and Regina Avelino. We also appreciate the efforts of the laboratory technicians Brunna Rodrigues and José Batista.

Author Contributions: KCMS, LFCP, JGL, and EPSF conceived the study and designed the protocol. EPSF, ATOC, and SLSA collected data. KCMS, EPSF, and MGA contributed reagents/materials/analysis tools. EPSF, KCMS, ATOC, SCVCL, LFCP, and SLSA analyzed the data. EPSF and KCMS wrote the manuscript. Overall responsibility: EPSF, ATOC, SLSA, LFCP, SCVCL, JGL, MGA, and KCMS. All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

References

1. Samson, S.L.; Garber, A.J. Metabolic syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* **2014**, *43*, 1–23.
2. Márquez-Sandoval, F.; Macedo-Ojeda, G.; Viramontes-Hörner, D.; Fernández Ballart, J.D.; Salvadó, J.S.; Vizmanos, B. The prevalence of metabolic syndrome in Latin America: a systematic review. *Public Health Nutr* **2011**, *14*, 1702–1713.
3. Chasapis, C.T.; Loutsidou, A.C.; Spiliopoulou, C.A.; Stefanidou, M.E. Zinc and human health: an update. *Arch Toxicol* **2012**, *86*, 521–534.
4. Miao, X.; Sun, W.; Fu, Y.; Miao, L.; Cai, L. Zinc homeostasis in the metabolic syndrome and diabetes. *Front Med China* **2013**, *7*, 31–52.
5. Lemaire, K.; Chimienti, F.; Schuit, F. Zinc transporters and their role in the pancreatic b-cell. *J Diabetes Investig* **2012**, *3*, 202–211.
6. Tubek, S. Role of zinc in regulation of arterial blood pressure and in the etiopathogenesis of arterial hypertension. *Biol Trace Elem Res* **2007**, *117*, 39–51.
7. Kloubert, V.; Rink, L. Zinc as a micronutrient and its preventive role of oxidative damage in cells. *Food Funct* **2015**, *6*, 3195–3204.
8. Bonaventura, P.; Benedetti, G.; Albarede, F.; Miossec, P. Zinc and its role in immunity and inflammation. *Autoimmun Rev* **2015**, *14*, 277–285.
9. Li, Y.; Guo, H.; Wu, M.; Liu, M. Serum and dietary antioxidant status is associated with lower prevalence of the metabolic syndrome in a study in Shanghai, China. *Asia Pac J Clin Nutr* **2013**, *22*, 60–68.
10. Al-Daghri, N.M.; Khan, N.; Alkharfy, K.M.; Al-Attas, O.S.; Alokail, M.S.; Alfawaz, H.A.; Alothman, A.; Vanhoutte, P.M. Selected dietary nutrients and the prevalence of metabolic syndrome in adult males and females in Saudi Arabia: A pilot study. *Nutrients* **2013**, *5*, 4587–4604.
11. Choi, W.; Kim, S.; Chung, J. Relationships of hair mineral concentrations with insulin resistance in metabolic syndrome. *Biol Trace Elem Res* **2014**, *158*, 323–329.
12. Rotter, I.; Kosik-Bogacka, D.; Dołęgowska, B.; Safranow, K.; Lubkowska, A.; Laszczyńska, M. Relationship between the Concentrations of Heavy Metals and Bioelements in Aging Men with Metabolic Syndrome. *Int J Environ Res Public Health* **2015**, *12*, 3944–3661.
13. Seo, J.; Song, S.; Han, K.; Lee, K.; Kim, H. The associations between serum zinc levels and metabolic syndrome in the Korean population: findings from the 2010 Korean National Health and Nutrition Examination Survey. *PLoS One* **2014**, *9*, 1–10.
14. Ahn, B.; Kim, M.J.; Koo, H.S.; Seo, N.; Joo, N.; Kim, Y. Serum zinc concentration is inversely associated with insulin resistance but not related with metabolic syndrome in nondiabetic Korean adults. *Biol Trace Elem Res* **2014**, *160*, 169–175.
15. Al-Timimi, D.J.; Mahmoud, H.M.; Mohammed, D.A.; Ahmed, I.H. Serum Zinc and Metabolic Health Status in Siblings of Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *J Clin Diagn Res* **2015**, *9*, 5–8.
16. Ghasemi, A.; Zahediasl, S.; Hosseini-Esfahani, F.; Azizi, F. Gender differences in the relationship between serum zinc concentration and metabolic syndrome. *Ann Hum Biol* **2014**, *41*, 436–442.
17. Ferro, F.E.D.; de Lima, V.B.S.; Soares, N.R.M.; Cozzolino, S.M.F.; Marreiro, D.N. Biomarkers of metabolic syndrome and its relationship with the zinc nutritional status in obese women. *Nutr Hosp* **2011**, *26*, 650–654.
18. King, J.C.; Brown, K.H.; Gibson, R.S.; Krebs, N.F.; Lowe, N.M.; Siekmann, J.H.; Raiten, D.J. Biomarkers of Nutrition for Development (BOND) - Zinc Review. *J Nutr* **2016**, *146*, 858 – 885.
19. Lowe, N.M. Assessing zinc in humans. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **2016**, *19*, 321–327.
20. Maret, W. Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life. *Adv Nutr* **2013**, *4*, 82–91.
21. Raiten, D.J.; Combs G.F., Jr. Directions in Nutritional Assessment- Biomarkers and bio-indicators: providing clarity in the face of complexity. *Sight Life* **2015**, *29*, 39–44.
22. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of

- High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* **2002**, *106*, 3143-3421.
23. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **2004**, *27*, 5–10.
 24. Sociedade Brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Hipertensão, Sociedade Brasileira de Nefrologia. VI Brazilian Guidelines on Hypertension. *Arq Bras Cardiol* **2010**, *95*, 1–51.
 25. Ministério da Saúde do Brasil, Coordenação Geral da Política de Alimentação e Nutrição. *Vigilância alimentar e nutricional - Sisvan: orientações básicas para a coleta, processamento, análise de dados e informação em serviços de saúde*. Ministério da Saúde: Brasília, DF, Brasil, 2004. pp. 120.
 26. Institute of Medicine. *DRI. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc*. National Academy Press: Washington, DC, EUA, 2002, pp. 773.
 27. Nusser, S.M., Carriquiry, A.L., Dodd, K.W., Fuller, W.A. A Semiparametric Transformation Approach to Estimating Usual Daily Intake Distributions. *J Am Stat Assoc* **1996**, *91*, 1440–1449.
 28. Willett, W., Stampfer, M.J. Total energy intake: implications for epidemiologic analyses. *Am J Epidemiol* **1986**, *124*, 17–27.
 29. 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* **1972**, *18*, 499–502.
 30. Rodrigues, M.P.; Narizano, A.; Demezlo, V.; Cid, A.A. A simple method for a determination of zinc human plasma levels by flame atomic absorption spectrophotometry. *At Spectros* **1989**, *10*, 68–70.
 31. Gibson, R.S. *Principles of Nutritional Assessment*. 1st ed. Oxford University Press: New York, EUA, 1990, pp. 691.
 32. 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* **1982**, *28*, 475–80.
 33. de Sena, K.C.M.; Arrais, R.F.; Almeida, M.G.; de Araújo, D.M.; dos Santos, M.M.; de Lima, V.T.; Pedrosa, L.F.C. Effects of zinc supplementation in patients with type 1 diabetes. *Biol Trace Elem Res* **2005**, *105*, 1–9.
 34. Küllerich, S.; Christensen, M.S.; Naestoft, J.; Christiansen, 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.
 35. Gibson, R.S. Assessment of chromium, copper and zinc status. In: *Principles of Nutritional Assessment*. 2nd ed. Gibson, R.S.; Oxford University Press: New York, EUA, 2005; volume 1, pp. 683–748.
 36. Li, P.; Stuart, E.A.; Allison, D.B. Multiple Imputation: A Flexible Tool for Handling Missing Data. *JAMA* **2015**, *314*, 1966–1967.
 37. Fagerland, M.W. t-tests, non-parametric tests, and large studies—a paradox of statistical practice? *BMC Med Res Methodol* **2012**, *12*, 1–7.
 38. da Cunha, A.T.O.; Pereira, H.T.; de Aquino, S.L.S.; Sales, C.H.; Sena-Evangelista, K.C.M.; Lima, J.G.; Lima, S.C.V.C.; Pedrosa, L.F.C. Inadequacies in the habitual nutrient intakes of patients with metabolic syndrome: a cross-sectional study. *Diabetol Metab Syndr* **2016**, *8*, 1-9.
 39. Hambidge, M. Biomarkers of trace mineral intake and status. *J Nutr* **2003**, *133*, 948 – 955.
 40. Lowe, N.M.; Fekete, K.; Decsi, T. Methods of assessment of zinc status in humans: a systematic review. *Am J Clin Nutr* **2009**, *89*, 2040–2051.
 41. Hennigar, S.R.; Kelley, A.M.; McClung, J.P. Metallothionein and Zinc Transporter Expression in Circulating Human Blood Cells as Biomarkers of Zinc Status: a Systematic Review. *Adv Nutr* **2016**, *7*, 735–746.
 42. Dias, P.C.S.; Sena-Evangelista, K.C.M.; Paiva, M.S.M.O.; Ferreira, D.Q.C.; Ururahy, M.A.G.; Rezende, A.A.; Abdalla, D.S.P.; Pedrosa, L.F.C. The beneficial effects of rosuvastatin are independent of zinc supplementation in patients with atherosclerosis. *J Trace Elem Med Biol* **2014**, *28*, 194–199.
 43. Esser, N.; Legrand-Poels, S.; Piette, J.; Scheen, A.J.; Paquot, N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* **2014**, *105*, 141–150.
 44. Foster, M.; Petocz, P.; Samman, S. Inflammation markers predict zinc transporter gene expression in women with type 2 diabetes mellitus. *J Nutr Biochem* **2013**, *24*, 1655–1661.
 45. Cruz, K.J.C.; de Oliveira, A.R.S.; Marreiro, D. N. Antioxidant role of zinc in diabetes mellitus. *World J Diabetes* **2015**, *6*, 333–337.
 46. Martins, L.M.; de Oliveira, A.R.S.; Cruz, K.J.C.; de Araújo, C.G.B.; de Oliveira, F.E.; de Souza, G.S.; Nogueira,

- N.N.; Marreiro, D.N. Influence of cortisol on zinc metabolism in morbidly obese women. *Nutr Hosp* **2014**, *29*, 57–63.
47. Brown, K.H.; Rivera, J.A.; Bhutta, Z.; Gibson, R.S.; King, 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.* **2004**, *25*, 99–203.
48. Xu J; Zhou Q; Liu G; Tan Y; Cai L. Analysis of Serum and Urinal Copper and Zinc in Chinese Northeast Population with the Prediabetes or Diabetes with and without Complications. *Oxid Med Cell Longev* **2013**, *2013*, 1–11.
49. Feng, W.; Cui, X.; Liu, B.; Liu, C.; Xiao, Y.; Lu, W.; Guo, H.; He, M.; Zhang, X.; Yuan, J.; Chen, W.; Wu, T. Association of urinary metal profiles with altered glucose levels and diabetes risk: A population-based study in China. *PLoS One* **2015**, *10*, 1–18.
50. Al-Timimi, D.J., Sulieman, D.M., Hussen, K.R. Zinc status in type 2 diabetic patients: relation to the progression of diabetic nephropathy. *J Clin Diagn Res* **2014**, *8*, 4–6.
51. Braun, L.A.; Rosenfeldt, F. Pharmaco-nutrient interactions - A systematic review of zinc and antihypertensive therapy. *Int J Clin Pract* **2013**, *67*, 717–725.



© 2016 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os principais resultados desse estudo sinalizam para o comprometimento no *status* de zinco caracterizado pelo aumento do zinco no eritrócito e alta excreção urinária de zinco, além da alta prevalência de inadequação na ingestão dietética do mineral em pacientes com SM atendidos em um Ambulatório de Referência do Rio Grande do Norte. As associações registradas nesse estudo reforçam a participação dos fatores de risco cardiometabólicos na zincúria de pacientes com SM. Considerando a SM uma doença multifatorial, cujo diagnóstico depende do número de critérios envolvidos os quais determinam diferentes fenótipos, como desdobramento desse estudo vislumbra-se a possibilidade de estudar o *status* de zinco em pacientes com SM de diferentes fenótipos, objetivando trazer respostas mais fidedignas acerca da participação do mineral nos mecanismos envolvidos na SM.

Neste estudo observou-se 16 diferentes fenótipos, sendo que mais da metade dos pacientes apresentavam mais de 3 critérios (59%) de diagnóstico para a doença, com predominância para o fenótipo “presença de hipertensão arterial ou pressão arterial alterada, presença de DM ou glicemia de jejum alterada, circunferência da cintura aumentada e baixas concentrações de HDL-c” (18%). Contudo, considerando o pequeno “n” amostral, esses resultados não foram explorados no artigo principal.

A avaliação do *status* de zinco é complexa devido ao rígido controle homeostático do mineral para manter as concentrações de zinco no plasma, principal biomarcador, dentro dos valores de referência. A fim de expandir o conhecimento sobre o papel do zinco no grupo de pacientes com SM, buscamos estudar outros biomarcadores, que estivessem dentro das nossas possibilidades: ingestão dietética, zinco no plasma, zinco no eritrócito e excreção urinária de zinco. Contudo, a literatura atual chama a atenção para a importância de incluir na avaliação do *status* de zinco ferramentas genômicas, e os estudos sugerem que as proteínas dependentes de zinco podem refletir com segurança o *status* desse mineral. Assim, avaliar a expressão gênica de MT e alguns transportadores de zinco (ZIP e Znt), apresenta-se como uma perspectiva futura de continuidade do trabalho iniciado neste mestrado.

Os resultados encontrados neste estudo sugerem que os indivíduos com SM podem estar em uma condição de risco para deficiência de zinco, portanto, a realização de um programa de intervenção com o mineral poderia contribuir para a melhora do perfil antioxidante e inflamatório, bem como no controle da hiperglicemia. No entanto, ressalta-se que o benefício da intervenção será maior se o paciente estiver em tratamento clínico que contemple a melhora do perfil antropométrico, glicêmico e inflamatório.

Como limitações deste trabalho têm-se: (1) o desenho do estudo é do tipo caso controle não pareado, porém utilizaram-se modelos de regressão considerando variáveis de confundimento como idade e sexo, além de buscar indivíduos que apresentassem condições sócio-econômicas semelhantes; (2) mesmo diante das diversas estratégias de recrutamento, o número reduzido de participantes limitou o poder estatístico para detectar diferença na variável primária – zinco no plasma – entre os grupos; (3) erros sistemáticos e aleatórios na avaliação do consumo alimentar e dietético, porém os dados foram coletados por profissionais treinados, tomando cuidado em garantir a maior fidedignidade das informações do teor de zinco nas tabelas de composição de alimentos utilizadas.

Resultados complementares desse estudo acerca do consumo alimentar e dietético dos indivíduos com SM serão explorados em um segundo artigo, cujo objetivo será identificar as associações entre os alimentos cardioprotetores e os fatores de risco cardiometabólicos. O manuscrito está em fase de construção e será submetido a um período de classificação B1 para área de Nutrição na CAPES.

A experiência do curso de Mestrado em Nutrição da UFRN oportunizou ampliar o conhecimento na área de nutrição experimental, estudo com micronutrientes, além de ter sido uma grande oportunidade de aprendizado multidisciplinar. Neste período, houve uma evolução considerável do conteúdo teórico-prático, ampliando as possibilidades de atribuições e despertando para atividades de ensino, pesquisa e extensão.

Ressalta-se que no decorrer do mestrado foram produzidos até o momento 5 resumos, envolvendo temas relacionados aos dados coletados para a dissertação de mestrado, os quais foram apresentados em congressos científicos locais e nacionais:

1. Associação entre fatores dietéticos e os componentes da síndrome metabólica - 13º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição 2015.
2. Avaliação do controle metabólico de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 - II Congresso Norte e Nordeste de Nutrição Clínica e Esportiva - Connae 2016.
3. Perfil antropométrico e hábitos de vida de adultos e idosos com diabetes *mellitus* tipo 2 - XXIV Congresso Brasileiro de Nutrição - Conbran 2016.
4. Efeito do controle glicêmico sobre a zincúria em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 - XXIV Congresso Brasileiro de Nutrição - Conbran 2016.
5. Relação entre o consumo de energia, macronutrientes e fibra com perfil metabólico em pacientes com diabetes tipo 2 - XXIV Congresso Brasileiro de Nutrição - Conbran 2016.

Além disso, dois Trabalhos de Conclusão de Curso do Curso de Graduação em Nutrição e um do Curso de Graduação em Farmácia foram elaborados a partir de dados coletados para esta dissertação. Um desses trabalhos me proporcionou a oportunidade de participar como coorientadora. Ao longo do período de pós-graduação, nosso grupo de pesquisa realizava reuniões científicas para discussão de artigos científicos e projetos de pesquisa de outros colegas, bem como respectivos desenhos de estudo e metodologias aplicadas. Estes momentos proporcionaram estudo contínuo e atualizado de assuntos pesquisados pelo grupo, bem como direcionaram a um pensamento crítico e reflexivo acerca do estudo científico.

Além disso, tive a oportunidade ímpar de participar na organização e elaboração de de ação de extensão intitulado “I CAPACITAÇÃO DE PESQUISA EM NUTRIÇÃO (I CAPEN)”, na função de ministrante, cujo público alvo foram os alunos alunos de graduação e pós-graduação.

A experiência de Mestrado Acadêmico em Nutrição, trouxe, além de todo o conhecimento adquirido, a oportunidade de trabalhar com profissionais de diferente áreas de conhecimento, com pacientes e, principalmente, oportunizou a retomada dos estudos. Isso trouxe a certeza que a busca pelo conhecimento não deve parar e é construída ao longo da vida. Além disso, ampliou meus pensamentos para futuros trabalhos, focando a pesquisa em prol da sociedade.

REFERÊNCIAS

1. Sociedade Brasileira de Hipertensão, Sociedade Brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia, Sociedade Brasileira de Diabetes, Sociedade Brasileira da Obesidade. I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. Vol. 84, Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 2005. p. 3–28.
2. Samson SL, Garber AJ. Metabolic syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2014; 43(1):1–23.
3. Márquez-Sandoval F, Macedo-Ojeda G, Viramontes-Hörner D, Fernández Ballart J, Salas Salvadó J, Vizmanos B. The prevalence of metabolic syndrome in Latin America: a systematic review. *Public Health Nutr.* 2011 Oct 13; 14(10):1702–13.
4. Eckel RH, Alberti K, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet.* 2010 Jan;375(9710):181–3.
5. Kaur J. A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiol Res Pract.* 2014;2014:1–21.
6. Guven S, Matfin G, Kuenzi J. Diabetes Mellitus e Síndrome Metabólica. In: Porth CM, Matfin G, editors. *Fisiopatologia.* 8th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010. p. 1070–103.
7. Rochette L, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Set;1840(9):2709–29.
8. Stančáková A, Laakso M. Genetics of metabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord.* 2014 Dez 16;15(4):243–52
9. Calton EK, James AP, Pannu PK, Soares MJ. Certain dietary patterns are beneficial for the metabolic syndrome: reviewing the evidence. *Nutr Res.* 2014;34(7):559–68.
10. Vasmehjani AA, Paknahad Z, Maracy MR. Association of dietary vitamin D, serum 25-hydroxyvitamin D, insulin-like growth factor-1 concentrations and components of metabolic syndrome among Iranian women. *Adv Biomed Res.* 2014;3:159.
11. Velázquez-López L, Santiago-Díaz G, Nava-Hernández J, Muñoz-Torres A V, Medina-Bravo P, Torres-Tamayo M. Mediterranean-style diet reduces metabolic syndrome components in obese children and adolescents with obesity. *BMC Pediatr.* 2014;14:175.
12. Li Y, Guo H, Wu M, Liu M. Serum and dietary antioxidant status is associated with lower prevalence of the metabolic syndrome in a study in Shanghai, China. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2013;22(1):60–8.
13. Al-Daghri NM, Khan N, Alkharfy KM, Al-Attas OS, Alokail MS, Alfawaz HA, et al. Selected dietary nutrients and the prevalence of metabolic syndrome in adult males and females in Saudi Arabia: A pilot study. *Nutrients.* 2013;5(11):4587–604.
14. Myers SA, Nield A, Myers M. Zinc transporters, mechanisms of action and therapeutic utility: implications for type 2 diabetes mellitus. *J Nutr Metab.* 2012;

- 2012:173712.
15. Miao X, Sun W, Fu Y, Miao L, Cai L. Zinc homeostasis in the metabolic syndrome and diabetes. *Front Med China*. 2013;7(1):31–52.
 16. Tubek S. Role of zinc in regulation of arterial blood pressure and in the etiopathogenesis of arterial hypertension. *Biol Trace Elem Res*. 2007; 117(1–3):39–51.
 17. Tomat AL, Costa M de los Á, Arranz CT. Zinc restriction during different periods of life: Influence in renal and cardiovascular diseases. *Nutrition*. 2011;27(4):392–8.
 18. Kaur K, Gupta R, Saraf SA, Saraf SK. Zinc: The Metal of Life. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2014 Jul; 13(4):358–76.
 19. Maret W. Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life. *Adv Nutr*. 2013;4(1):82–91.
 20. Chasapis CT, Loutsidou AC, Spiliopoulou CA, Stefanidou ME. Zinc and human health: an update. *Arch Toxicol*. 2012 Abr; 86(4):521–34.
 21. Choi WS, Kim SH, Chung JH. Relationships of hair mineral concentrations with insulin resistance in metabolic syndrome. *Biol Trace Elem Res*. 2014;158(3):323–9.
 22. Ghasemi A, Zahediasl S, Hosseini-Esfahani F, Azizi F. Gender differences in the relationship between serum zinc concentration and metabolic syndrome. *Ann Hum Biol*. 2014; 41(5):436–42.
 23. Rotter I, Kosik-Bogacka D, Dołęgowska B, Safranow K, Lubkowska A, Laszczyńska M. Relationship between the Concentrations of Heavy Metals and Bioelements in Aging Men with Metabolic Syndrome. *Int J Environ Res Public Health*. 2015 Abr 10; 12(4):3944–61.
 24. Seo J, Song S, Han K, Lee K, Kim H. The associations between serum zinc levels and metabolic syndrome in the Korean population: findings from the 2010 Korean National Health and Nutrition Examination Survey. *PLoS One*. 2014; 9(8):1–10.
 25. Obeid O, Elfakhani M, Hlais S, Iskandar M, Batal M, Mouneimne Y, et al. Plasma copper, zinc, and selenium levels and correlates with metabolic syndrome components of lebanese adults. *Biol Trace Elem Res*. 2008; 123(1–3):58–65.
 26. Czernichow S, Vergnaud A, Galan P, Arnaud J, Favier A, Faure H, et al. Effects of long-term antioxidant supplementation and association of serum antioxidant concentrations with risk of metabolic syndrome in adults. *Am J Clin Nutr*. 2009; 90(2):329–35.
 27. King JC, Brown KH, Gibson RS, Krebs NF, Lowe NM, Siekmann JH, et al. Biomarkers of Nutrition for Development (BOND)-Zinc Review. *J Nutr*. 2016 Mar 9; 146(4):858S–885S.
 28. Lowe NM. Assessing zinc in humans. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2016 Jun 24; 19(5):321–7.
 29. Lemaire K, Chimienti F, Schuit F. Zinc transporters and their role in the pancreatic b-cell. *J Diabetes Investig*. 2012; 3(3):202–11.
 30. Kloubert V, Rink L. Zinc as a micronutrient and its preventive role of oxidative

- damage in cells. *Food Funct.* 2015 Oct; 6(10):3195–204.
31. Bonaventura P, Benedetti G, Albaredo F, Miossec P. Zinc and its role in immunity and inflammation. *Autoimmun Rev.* 2015; 14(4):277–85.
 32. Ahn B, Kim MJ, Koo HS, Seo N, Joo N-S, Kim Y-S. Serum zinc concentration is inversely associated with insulin resistance but not related with metabolic syndrome in nondiabetic Korean adults. *Biol Trace Elem Res.* 2014 Ago; 160(2):169–75.
 33. Al-Timimi DJ, Mahmoud HM, Mohammed DA, Ahmed IH. Serum Zinc and Metabolic Health Status in Siblings of Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *J Clin Diagn Res.* 2015 Dez; 9(12):BC05-8.
 34. Ferro FED, Lima VBS, Soares NRM, Cozzolino SMF, Marreiro DN. Biomarkers of metabolic syndrome and its relationship with the zinc nutritional status in obese women. *Nutr Hosp.* 2011; 26(3):650–4.
 35. da Cunha ATO, Pereira HT, de Aquino SLS, Sales CH, Sena-Evangelista KCM, Lima JG, et al. Inadequacies in the habitual nutrient intakes of patients with metabolic syndrome: a cross-sectional study. *Diabetol Metab Syndr.* 2016 Dez 14; 8(32):1–9.
 36. Raiten D, Combs GJ. Directions in Nutritional Assessment- Biomarkers and bio-indicators: providing clarity in the face of complexity. *Sight Life.* 2015; 29(1):39–44.
 37. Lowe NM, Fekete K, Decsi T. Methods of assessment of zinc status in humans: a systematic review. *Am J Clin Nutr.* 2009 Jun; 89(6):2040S–2051S.
 38. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Circulation.* 2005; 112(17):2735–52.
 39. Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International . *Circulation.* 2009 Oct 20; 120(16):1640–5.
 40. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and T of HBC in A (Adult TPI. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation [Internet].* 2002 Dez 17;106(25):3143–421.
 41. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 2004; 27(Suppl 1):S5–10.
 42. International Diabetes Federation. The IDF consensus worldwide definition of the Metabolic Syndrome. Bruxelles: IDF Communications; 2007. p. 24.
 43. Beltrán-Sánchez H, Harhay MO, Harhay MM, McElligott S. Prevalence and Trends of Metabolic Syndrome in the Adult U.S. Population, 1999–2010. *J Am Coll Cardiol.* 2013 Ago; 62(8):697–703.
 44. Sá NNB de, Moura EC. Factors associated with the burden of metabolic

- syndrome diseases among Brazilian adults. *Cad saúde pública*. 2010 Set; 26(9):1853–62.
45. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. *Vigitel Brasil 2007 : vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico*. Vigitel. Brasília: Ministério da Saúde; 2009. p. 136.
 46. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não transmissíveis e Promoção da saúde. *VIGITEL 2014: Vigilância de fatores de Risco para doenças crônicas por inquérito telefônico*. Brasília: Ministério da Saúde; 2015. 135 p.
 47. Vidigal F de C, Bressan J, Babio N, Salas-Salvadó J. Prevalence of metabolic syndrome in Brazilian adults: a systematic review. *BMC Public Health*. 2013; 13(1198):1–7.
 48. 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; 105(2):141–50.
 49. Karunakaran U, Park K. A Systematic Review of Oxidative Stress and Safety of Antioxidants in Diabetes: Focus on Islets and Their Defense. *Diabetes Metab J*. 2013; 37(2):106.
 50. Carneiro J, Casimiro LG, Miranda M, Mendes MA, Caridade T, Monteiro T, et al. Insulin resistance and the metabolic syndrome : an immunological perspective. *J Endocrinol Diabetes Metab*. 2011; 6(2):91–100.
 51. de Oliveira EP, McLellan KCP, Vaz de Arruda Silveira L, Burini RC. Dietary factors associated with metabolic syndrome in Brazilian adults. *Nutr J*. 2012; 11(13):1–7.
 52. Prasad AS. Zinc: An antioxidant and anti-inflammatory agent: Role of zinc in degenerative disorders of aging. *J Trace Elem Med Biol*. 2014; 28(4):364–71.
 53. Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A, Itsumura N. The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. *Physiol Rev*. 2015; 95(3):749–84.
 54. Marreiro DN. Zinco. In: Cozzolino SMF, Cominetti C, editors. *Bases bioquímicas e fisiológicas da nutrição: Nas diferentes fases da vida, na saúde e na doença*. 2nd ed. São Paulo: Manole; 2013. p. 252–69.
 55. Trumbo P, Yates AA, Schlicker S, Poos M. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *J Am Diet Assoc*. 2001; 101(3):294–301.
 56. Gopalsamy GL, Alpers DH, Binder HJ, Tran CD, Ramakrishna BS, Brown I, et al. The relevance of the colon to zinc nutrition. *Nutrients*. 2015; 7(1):572–83.
 57. Maret W. The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. *J Nutr*. 2000; 130(5S Suppl):1455S–8S.
 58. Powell SR. Zinc and Health: Current Status and Future Directions The Antioxidant Properties of Zinc 1 , 2. 2000; 1488–92.
 59. Suarez-Ortegón MF, Ordoñez-Betancourth JE, Aguilar-de Plata C. Dietary zinc

- intake is inversely associated to metabolic syndrome in male but not in female urban adolescents. *Am J Hum Biol.* 2013; 25(4):550–4.
60. Davidson HW, Wenzlau JM, O'Brien RM. Zinc transporter 8 (ZnT8) and β cell function. *Trends Endocrinol Metab.* 2014; 25(8):415–24.
 61. Ruz M, Carrasco F, Rojas P, Codoceo J, Inostroza J, Basfi-Fer K, et al. Zinc as a potential coadjuvant in therapy for type 2 diabetes. *Food Nutr Bull.* 2013; 34(2):215–21.
 62. Myers S a. Zinc Transporters and Zinc Signaling: New Insights into Their Role in Type 2 Diabetes. *Int J Endocrinol.* 2015; 2015:1–7.
 63. Islam MR, Arslan I, Attia J, McEvoy M, McElduff P, Basher A, et al. Is serum zinc level associated with prediabetes and diabetes?: a cross-sectional study from Bangladesh. *PLoS One.* 2013; 8(4):1–9.
 64. Woodier J, Rainbow RD, Stewart AJ, Pitt SJ. Intracellular Zinc Modulates Cardiac Ryanodine Receptor-mediated Calcium Release. *J Biol Chem.* 2015 Jul 10; 290(28):17599–610.
 65. Braun LA, Rosenfeldt F. Pharmaco-nutrient interactions - A systematic review of zinc and antihypertensive therapy. *Int J Clin Pract.* 2013; 67(8):717–25.
 66. Martins LM, Oliveira ARS, Cruz KJC, Araújo CGB, de Oliveira FE, Sousa GS, et al. Influence of cortisol on zinc metabolism in morbidly obese women. *Nutr Hosp.* 2014; 29(1):57–63.
 67. Martinho A, Gonçalves I, Santos CR. Glucocorticoids regulate metallothionein-1/2 expression in rat choroid plexus: Effects on apoptosis. *Mol Cell Biochem.* 2013; 376(1–2):41–51.
 68. Feitosa MCP, Lima VBDS, Neto JMM, Marreiro DDN. Plasma concentration of IL-6 and TNF- α and its relationship with zincemia in obese women. *Rev Assoc Med Bras.* 2013; 59(5):429–34.
 69. Noh H, Paik HY, Kim J, Chung J. The alteration of zinc transporter gene expression is associated with inflammatory markers in obese women. *Biol Trace Elem Res.* 2014; 158(1):1–8.
 70. Ranasinghe P, Wathurapatha W, Ishara M, Jayawardana R, Galappathy P, Katulanda P, et al. Effects of Zinc supplementation on serum lipids: a systematic review and meta-analysis. *Nutr Metab (Lond).* 2015 Dez 4; 12(1):26.
 71. Ministério da Saúde do Brasil, Coordenação Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Vigilância alimentar e nutricional - Sisvan: orientações básicas para a coleta, processamento, análise de dados e informação em serviços de saúde. Ministério da Saúde. Brasília: Ministério da Saúde; 2004. p. 120.
 72. Lohman TG, Roche AF, Martorel R. Anthropometric Standardization Reference Manual. Champaign: Human Kinetics; 1988.
 73. Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington: National Academy Press; 2001. 773 p.

74. Nusser SM, Carriquiry AL, Dodd KW, Fuller WA. A Semiparametric Transformation Approach to Estimating Usual Daily Intake Distributions. *J Am Stat Assoc.* 1996 Dez; 91(436):1440–9.
75. Willett W, Stampfer MJ. Total energy intake: implications for epidemiologic analyses. *Am J Epidemiol.* 1986 Jul; 124(1):17–27.
76. Sociedade Brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Hipertensão, Sociedade Brasileira de Nefrologia. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arq Bras Cardiol.* 2010; 95:1–51.
77. 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(6):499–502.
78. Sociedade Brasileira de Diabetes - SBD. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2014-2015. São Paulo: AC Farmacêutica; 2015. p. 374.
79. Rodrigues MP, Narizano A, Demezlo V, Cid A. A simple method for a determination of zinc human plasma levels by flame atomic absorption spectrophotometry. *At Spectros.* 1989; 10(2):68–70.
80. Gibson RS. *Principles of Nutritional Assessment.* 1st ed. New York: Oxford University Press; 1990. 691 p.
81. 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):475–80.
82. Kiilerich S, Christensen MS, Naestoft J, Christiansen 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(2):231–9.
83. Gibson RS. Assessment of chromium, copper and zinc status. In: *Principles of Nutritional Assessment.* 2nd ed. New York: Oxford University Press; 2005. p. 683 – 748.
84. Li P, Stuart EA, Allison DB. Multiple Imputation: A Flexible Tool for Handling Missing Data. *JAMA.* 2015 Nov 10; 314(18):1966–7.
85. Fagerland MW. t-tests, non-parametric tests, and large studies—a paradox of statistical practice? *BMC Med Res Methodol.* 2012; 12(1):1–7.

APÊNDICE

APÊNDICE 1

Variáveis auxiliaadoras e equações para imputação de dados faltantes.

As equações em cadeia empregaram a *ingestao*, *hemoglobina*, *circunferência da cintura* e *altura* como variáveis auxiliaadoras (variáveis não consideradas na análise principal, mas úteis na imputação por estarem correlacionada com as variáveis com dados faltantes), bem como as demais variáveis de interesse e disponíveis do estudo. As equações em cadeia foram assim construídas:

Quadro 1. Esquema das equações em cadeia para imputação múltipla.

Variável imputada	Variáveis empregadas para imputar
HOMA-IR	Zinco no eritrócito ($\mu\text{g/ml}$) / Zinco no eritrócito ($\mu\text{g/g hb}$) / Zinco no plasma / Razão zinco-creatinina / Zinco na urina / IMC/ Ingestão (Kcal) / Grupo / Fenótipos / Glicemia de jejum / Carboidrato ajustado / Circunferência da cintura
Triglicerídeos	Zinco no eritrócito ($\mu\text{g/ml}$) / Zinco no eritrócito ($\mu\text{g/g hb}$) / Zinco no plasma/ Zinco na urina / sexo / Zinco dietético ajustado / Colesterol total / colesterol não HDL-c / AGS ajustado / Grupo Fenótipos / Gordura total (Kcal) ajustada / Glicemia de jejum / HDL-c / AGMI ajustada / Hipolipemiante / Gordura total (g) ajustada
Zinco no eritrócito ($\mu\text{g/ml}$)	Triglicerídeos / Zinco no eritrócito ($\mu\text{g/g hb}$) / Zinco no plasma / Zinco na urina / IMC / Razão cintura -quadril / Zinco dietético ajustado / AGS (g) ajustado / Antihipertensivo / Grupo / Fenótipos / Gordura total (Kcal) ajustada / Carboidrato (g) ajustado / AGMI (g) ajustado / Circunferência da cintura / Gordura total (g) ajustada
Zinco no eritrócito ($\mu\text{g/g hb}$)	Triglicerídeos / Zinco no eritrócito ($\mu\text{g/ml}$) / Zinco no plasma / Zinco na urina / IMC / Razão cintura -quadril / Zinco dietético ajustado / AGS (g) ajustado / Antihipertensivo / Grupo / Fenótipos / Gordura total (Kcal) ajustada / Carboidrato (g) ajustado / AGMI (g) ajustado / Circunferência da cintura / Gordura total (g) ajustada

Zinco no plasma	HOMA-IR /Triglicerídeos /Zinco no eritrócito ($\mu\text{g/ml}$) / Zinco no eritrócito ($\mu\text{g/g hb}$) / LDL-c /Zinco na urina / Insulina / Idade / Sexo /Zinco dietético ajustado / PAS / PAD / Colesterol total /Colesterol não HDL-c / Altura /Grupo /AGMII (g) ajustado / Circunferência da cintura / Hipolipemiante
LDL-c	HOMA-IR /Triglicerídeos /Zinco no eritrócito ($\mu\text{g/ml}$) / Zinco no eritrócito ($\mu\text{g/g hb}$) / Zinco no plasma / Razão zinco-creatinina / HbA1c /Zinco na urina / Insulina / PAD / Colesterol total /Colesterol não HDL-c /Grupo /HDL-c / Hipolipemiante
HbA1c	HOMA-IR /Triglicerídeos /Zinco no eritrócito ($\mu\text{g/ml}$) / Zinco no eritrócito ($\mu\text{g/g hb}$) / Zinco no plasma / LDL-c /Razão zinco-creatinina /Zinco na urina / Insulina /Idade / Hemoglobina /Grupo / Glicemia de jejum /HDL-c / AGMI (g) ajustado
Zinco na urina	HOMA-IR /Zinco no eritrócito ($\mu\text{g/ml}$) / Zinco no eritrócito ($\mu\text{g/g hb}$) / Zinco no plasma / LDL-c / Razão zinco-creatinina /Sexo /Zinco dietético ajustado / Altura / Fibra Total (g) /Ingestão (Kcal) /AGS (g) ajustado /Grupo /Gordura total (Kcal) ajustada / Glicemia de jejum /Carboidrato (g) ajustado / Circunferência da cintura / Gordura total (g) ajustada
PCR-HS	Zinco no eritrócito ($\mu\text{g/g hb}$) / Idade / Sexo /IMC /Razão cintura-quadril /Zinco dietético ajustado / Grupo /Fenótipos / Glicemia de jejum /Carboidrato (g) ajustado /Circunferência da cintura / Proteína (g) ajustada
Insulina	HOMA-IR /Zinco no eritrócito ($\mu\text{g/ml}$) / Zinco no eritrócito ($\mu\text{g/g hb}$) /Zinco no plasma / Razão zinco-creatinina /HbA1c /Zinco na urina / IMC /Zinco dietético ajustado / PAS /Grupo /Fenótipos /Gordura total (Kcal) ajustado / Glicemia de jejum /AGMII (g) ajustada / Circunferência da cintura / Gordura total (g) ajustado

ANEXO

ANEXO 1

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
ONOFRE LOPES-HUOL/UFRN



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO STATUS DE ZINCO EM PACIENTES COM SÍNDROME

Pesquisador: KARINE CAVALCANTI MAURÍCIO DE SENA EVANGELISTA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 38566914.5.0000.5292

Instituição Proponente: Departamento de Nutrição

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 970.705

Data da Relatoria: 27/02/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de Dissertação de mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Será do tipo caso-controle com pacientes adultos e idosos portadores de Síndrome metabólica (SM) atendidos no Ambulatório de Endocrinologia do Hospital Universitário Onofre Lopes e no ambulatório do Departamento de Nutrição da UFRN. Os sujeitos serão avaliados de acordo com os critérios do National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel (NCEP/ATPIII). Será realizada avaliação nutricional (peso, altura, circunferência da cintura), aplicação do recordatório de 4 horas, aferição da pressão arterial, análises bioquímicas de perfil lipídico, glicêmico e insulina e de zinco plasmático, eritrocitário e urinário.

Objetivo da Pesquisa:

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o status de zinco em pacientes com SM e fatores clínico-nutricionais associados.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a população quanto à idade, sexo e estado nutricional antropométrico;
- Identificar diferenças entre as concentrações plasmática, eritrocitária e urinária de zinco entre os grupos estudados;
- Avaliar a ingestão de energia, macronutrientes e zinco dos pacientes estudados;
- Associar os parâmetros de avaliação do zinco com os componentes específicos da SM;

Endereço: Avenida Nilo Peçanha, 620 - 3º subsolo

Bairro: Petrópolis

CEP: 59.012-300

UF: RN

Município: NATAL

Telefone: (84)3342-5003

Fax: (84)3202-3941

E-mail: cep_huol@yahoo.com.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
ONOFRE LOPES-HUOL/UFRN



Continuação do Parecer: 970.705

- Correlacionar os parâmetros de avaliação do status de zinco com a ingestão de zinco.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

Os riscos serão mínimos, porém, pode acontecer um desconforto proveniente da coleta de sangue como, por exemplo, manchas roxas no local da coleta. Pode ainda, ocorrer desconfortos ao realizar as medidas de peso, altura e largura da cintura e/ou ao informar sobre a alimentação. Os riscos/desconfortos serão minimizados COM A utilização de material estéril e a coleta realizada por um técnico experiente. As informações relatadas durante a coleta de dados serão realizadas em local reservado por profissionais treinados. Serão respeitadas as reações emocionais que possam interferir nos procedimentos, prevalecendo a vontade e bem-estar dos sujeitos. Caso ocorra alguma intercorrência os cuidados serão providenciados pela equipe.

BENEFÍCIOS

Oferecer aos participantes uma avaliação nutricional completa a partir das informações do peso, altura, largura da cintura e alimentação. Além disso, será realizada uma avaliação das concentrações de zinco e das outras substâncias do sangue. A partir desses resultados serão dadas orientações adequadas para alimentação, diminuindo os riscos para o desenvolvimento de outras doenças.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

É um projeto de relevância científica, está bem justificado e com objetivos claros. O método está bem definido e descrito o que caracteriza sua viabilidade de execução, uma vez que segue os preceitos éticos na realização de pesquisas com seres humanos (resolução 466/12), citando os riscos e como minimizá-los e os benefícios do estudo.

Endereço: Avenida Nilo Peçanha, 620 - 3º subsolo
Bairro: Petrópolis **CEP:** 59.012-300
UF: RN **Município:** NATAL
Telefone: (84)3342-5003 **Fax:** (84)3202-3941 **E-mail:** cep_huol@yahoo.com.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
ONOFRE LOPES-HUOL/UFRN



Continuação do Parecer: 970.705

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador apresentou todos os termos obrigatórios ao CEP: Carta de anuência, Declaração da instituição proponente, folha de identificação do pesquisador, folha de rosto da Plataforma Brasil e projeto detalhado da PB, projeto completo, TCLE (para o grupo caso e grupo controle) e o termo de autorização de uso de prontuários.

Recomendações:

Acrescentar as sugestões anteriores, no projeto de pesquisa, uma vez que não foi modificado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O pesquisador realizou as modificações sugeridas anteriormente pelo CEP.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

NATAL, 03 de Março de 2015

Assinado por:
Joao Carlos Alchieri
(Coordenador)

Endereço: Avenida Nilo Peçanha, 620 - 3º subsolo

Bairro: Petrópolis

CEP: 59.012-300

UF: RN

Município: NATAL

Telefone: (84)3342-5003

Fax: (84)3202-3941

E-mail: cep_huol@yahoo.com.br