



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

PAULA NASCIMENTO BRANDÃO LIMA

**POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO NO GENE DO ZNT8 (RS11558471) E
SUA RELAÇÃO COM O ESTADO NUTRICIONAL RELATIVO AO ZINCO E
MARCADORES GLICÊMICOS EM INDIVÍDUOS COM DIABETES *MELLITUS* TIPO 2**

ARACAJU

2018

PAULA NASCIMENTO BRANDÃO LIMA	POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO NO GENE DO ZNT8 (RS11558471) E SUA RELAÇÃO COM O ESTADO NUTRICIONAL RELATIVO AO ZINCO E MARCADORES GLICÊMICOS EM INDIVÍDUOS COM DIABETES MELLITUS TIPO 2 2018

PAULA NASCIMENTO BRANDÃO LIMA

**POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO NO GENE DO ZNT8 (RS11558471) E
SUA RELAÇÃO COM O ESTADO NUTRICIONAL RELATIVO AO ZINCO E
MARCADORES GLICÊMICOS EM INDIVÍDUOS COM DIABETES *MELLITUS* TIPO 2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da saúde.

Orientador(a): Profa. Dra. Kiriaque Barra Ferreira Barbosa

Co-orientador(a): Profa. Dra. Liliane Viana Pires

ARACAJU

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

L732p Lima, Paula Nascimento Brandão
Polimorfismo de nucleotídeo único no gene do ZnT8 (rs11558471) e sua relação com o estado nutricional relativo ao zinco e marcadores glicêmicos em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 / Paula Nascimento Brandão Lima ; orientadora Kiriague Barra Ferreira Barbosa ; coorientadora Liliane Viana Pires. – Aracaju, 2018.
85 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2018.

1. Deficiência de zinco. 2. Doenças crônicas. 3. Polimorfismo de nucleotídeo único. 4. Minerais. I. Barbosa, Kiriague Barra Ferreira, orient. II. Pires, Liliane Viana, coorient. III. Título.

CDU 61

PAULA NASCIMENTO BRANDÃO LIMA

**POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO NO GENE DO ZNT8 (RS11558471) E
SUA RELAÇÃO COM O ESTADO NUTRICIONAL RELATIVO AO ZINCO E
MARCADORES GLICÊMICOS EM INDIVÍDUOS COM DIABETES *MELLITUS* TIPO 2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da saúde.

Aprovada em: 23/08/2018.

Co-orientador(a): Profa. Dra. Liliane Viana Pires

1º Examinador(a): Profa. Dra. Ana Mara de Oliveira e Silva

2º Examinador(a): Profa. Dra. Vivianne de Sousa Rocha

ARACAJU

2018

Dedico este trabalho a minha família, de sangue e de coração, por terem sido luz na minha trajetória e por sempre me instigarem a continuar.

AGRADECIMENTOS

Acredito que as coisas acontecem no momento certo. Do mesmo modo, acredito que o universo te retorna aquilo que você oferece. E, acima de tudo, acredito que existe uma força maior olhando por nós. Essa trajetória foi repleta dessas constatações e não poderia deixar de enaltecer a minha gratidão as pessoas que tão lindamente fizeram parte de tudo isso.

Em primeiro lugar agradeço a Deus por ter zelado os meus passos e ter colocado em minha vida pessoas incríveis, as quais quero levar para sempre comigo. Agradeço também por ter me deparado com pessoas sempre dispostas a ajudar e ter conseguido chegar ao fim dessa jornada da melhor maneira possível.

Aos meus pais Paulo dos Santos Lima e Valquiria N. Brandão Lima por todo o esforço despendido ao longo de todos esses anos para me proporcionar educação, por terem apoiado o meu sonho e terem vivido cada momento dessa pesquisa ao meu lado, ajudando sempre do jeitinho que podiam. Mãe, obrigada pelo exemplo de força e determinação, pelo amor incondicional e por ter feito da minha felicidade uma prioridade. Pai, obrigada por sempre ter respeitado as minhas decisões, por me apoiar quando eu precisei e por ter, literalmente, me acompanhado em diversos momentos dessa pesquisa.

À minha irmã Viviane N. Brandão Lima por todo o amor, torcida, por me ouvir quando eu precisei e por ter vivido esse sonho ao meu lado. Obrigada pelos momentos de cumplicidade e por ter feito parte, com tanto amor, da nossa equipe multi.

À minha tia mãe Almira N. Brandão por sua presença na minha vida ao longo dos anos, seu amor e torcida.

À minha orientadora Kiriaque Barra Ferrerira Barbosa por ter confiado em mim e ter me dado essa oportunidade, por todo o carinho que sempre me tratou.

À minha co-orientadora Liliane Viana Pires agradeço por ter me recebido de coração aberto, por ter me dado a honra de aprender contigo e por ter caminhado ao meu lado por toda essa trajetória. Você me ensinou lições valiosas que vão além do conhecimento científico, foi um lindo exemplo de empatia, bondade, generosidade e fé. Mostrou em todos os momentos ética, dedicação e o quão belo é ser um professor. Obrigada por ter se tornado minha mentora de vida, por me ensinar com tanta doçura, pelos conselhos, ombro amigo e pela eterna amizade construída.

Essa trajetória foi marcada pelo “nós”, com cada vitória partilhada e festejada por essa grande e linda família LABNUT. Tenho muito orgulho do ambiente de trabalho que

construímos, onde o egoísmo nunca teve espaço. Um ambiente repleto de respeito, companheirismo e amizade. Portanto, agradeço com o maior amor do mundo:

À Beatriz Cruz pela parceria incrível de trabalho, por todo o carinho, por todas as palavras lindas que recebi, por ter sempre me acalentado com o lindo coração que possui.

À Gabrielli Barbosa de Carvalho por ter me acolhido em seu coração e ter aberto as portas do laboratório para mim. Obrigada pela amizade construída e pela grande parceria de trabalho e de vida. Sua presença tornou essa trajetória mais leve e colorida. Obrigada por todos os momentos incríveis partilhados, por ter estado ao meu lado nos momentos difíceis, pelas risadas e carinho.

À Lohayne Dias por toda a doçura que sempre me tratou, pelo carinho ofertado, por sempre se preocupar comigo, pela ajuda e altas dicas de *networking*.

À Ramara Kadija Fonseca por ter me dado a chance de mostrar o meu coração, pelo laço criado, pela parceria, por ter se tornado minha irmã baiana. Evoluímos muito desde que começamos a trabalhar juntas e tenho certeza que a admiração é mútua. Como você me disse, nossas almas se conhecem de outra vida.

Agradeço também a Aline Rocha, Cynthia Batista, Elisângela Lima, Melissa Mercadante e Tiago Vila-Nova por toda a parceria, ajuda, risadas e carinho. Tenho certeza que a família LABNUT será eterna.

Às “florzinhas de Lili”, Leila Hashimoto e Luciane Alencar pela parceria e amizade. Vocês são seres iluminados.

Os amigos são a família que escolhemos, a quem decidimos amar e, sem dúvidas, foram a luz da minha trajetória. Portanto, agradeço com todo o amor:

Ao Alan Oliveira por toda a sua generosidade mesmo quando ainda não me conhecia. Nunca vou conseguir agradecer o suficiente por cada ajuda nas coletas e também nos experimentos. Obrigada pela amizade construída, pelas palavras de conforto, por cada risada, pelo grande carinho e por todos os momentos partilhados.

À Ana Mara de Oliveira e Silva pela amizade, conselhos, risadas e pelos momentos partilhados. Agradeço também por ter me ensinado com carinho e me instigado sempre a buscar conhecimento.

À Charlene Messias por ter me acolhido, por ter cuidado de mim e sempre torcer para que tudo desse certo. Obrigada por ter vivido todos os momentos bons e ruins ao meu lado, pelas risadas e papos do almoço, pelo cafézinho reconfortante e por cada “Bom dia” cheio de amor.

Ao Ítalo Silva Santos pelo companheirismo, amor e apoio que foram essenciais para eu dar início a essa jornada. Obrigada por cada vez que me disse “vai dar tudo certo”, por ter sempre acreditado no meu potencial e por cada conselho. Guardo cada palavra com muito carinho no meu coração e elas se fizeram presentes em diversos momentos dessa trajetória.

Ao José Alexandre Melo, meu irmão de todas as vidas, obrigada pela amizade linda, por todo o amor, torcida, por estar presente em todos os momentos. Obrigada por sempre me ouvir, por me ajudar, pelo ombro amigo e pelos risos proporcionados.

À Luciana Ramos por todo o amor e amizade, por sempre cuidar de mim. Obrigada por cada vez que me olhou nos olhos e perguntou se eu estava bem, pelas conversas, orações e ajuda em todos os momentos.

Ao Max Araújo pelo carinho e atenção, por ter se mostrado disposto a ajudar em inúmeros momentos e por todas as risadas compartilhadas.

Aos meus amigos da Pós (meus Pobritos), Gleiciane, Mayara, Mayra, Nayara, Vanessa e Válder pela companhia nos dias de aula, pelas risadas, apoio e por cada pensamento positivo.

À Adriane Araújo por seus sorrisos contagiantes e discursos sempre muito divertidos na hora do “café arrebatador”.

O caminho da ciência não é fácil e, na maioria das vezes, não é auto-suficiente. Quando trilhado em conjunto torna-se menos sofrido. Tive a honra de me deparar com pessoas dispostas a ajudar e partilhar dos seus recursos em prol dessa causa. Portanto, agradeço imensamente:

Ao parceiros do Lanef, Lafac, LAFAPI, GMBio e LQA. Aos alunos, que sem dúvida são a alma de cada laboratório, agradeço a ajuda ofertada desde as simples coisas até as mais complexas. Obrigada por me receberam com muita educação em cada um desses locais, vocês foram sensacionais. À Myrela Conceição (GMBio) pela simpatia e disposição em me ensinar. Também quero agradecer ao técnico Augusto pela simpatia que sempre me recebeu.

Aos professores Enilton Camargo, Jullyana de Souza, Luciane Moreno, Lucindo Quintans e Maria de Lourdes da Silva por terem permitido usar os laboratórios e equipamentos. Agradeço de maneira especial ao professor Silvânio Costa por ter me ajudado em uma parte crucial do meu trabalho. Obrigada pela gentileza que sempre me tratou e por ter tornado possível a apresentação dos dados de zinco nessa dissertação. Agradeço também ao professor José Rodrigo Santos, do Departamento de Estatística, pela ajuda com o cálculo amostral.

Ao Samir Hipólito e à Adnivia Santos agradeço imensamente pela ajuda durante os experimentos finais. Vocês são um exemplo de altruísmo.

À professora Analícia Rocha Santos Freire pela contribuição valiosa no desenvolvimento desse trabalho e por tão prontamente ter aceitado o convite para participar da banca de qualificação. Acima de tudo, obrigada pela amizade e carinho.

À professora Vivianne de Sousa Rocha por todas as orientações e sugestões nas análises de ingestão alimentar desde a banca de qualificação até os resultados finais que compõem esse trabalho.

Ao Sr. Carlos do Departamento de Morfologia, obrigada por todas as conversas, carinho, ajuda e simpatia sem igual.

Ao Ulabclin (Hospital Universitário) e à Ivone Camargo por terem nos recebido e realizado algumas análises bioquímicas.

Ao Cafisio por ter gentilmente cedido uma sala para a realização das coletas.

Ao Centro de Diabetes de Sergipe, em especial ao Dr. Raimundo Sotero e à nutricionista Cinthia Fontes, por terem auxiliado no recrutamento de voluntários.

À Dimese, em especial, ao Dr. Tarcísio Leão pela parceria na realização da determinação de peptídeo C e, acima de tudo, por sempre ter me recebido tão gentilmente.

À nutricionista Márcia Cândido por ter sido sempre solícita e auxiliado no recrutamento dos voluntários.

À Liga Acadêmica de Nutrição em Diabetes (LANUD) pelo espaço cedido e pela parceria no recrutamento dos voluntários.

À Secretaria de Saúde de Aracaju por ter permitido a realização dessa pesquisa nas Unidades Básicas de Saúde (UBS).

Às equipes de saúde da família de cada UBS na qual realizamos essa pesquisa, em especial, aos agentes comunitários de saúde, por terem recrutado os voluntários. Essa pesquisa não teria sido possível sem a parceria de vocês. Agradeço especialmente à Angélica (Colônia 13 - Lagarto) e à equipe da UBS do município de Santo Amaro das Brotas pela receptividade e por terem reafirmado no meu coração o principal motivo de realizar pesquisas científicas, que é trazer benefícios a comunidade. À irmã Ivone (*in memoriam*), obrigada por ter me recebido com doçura e ter se prontificado a ajudar. Nosso encontro nessa vida foi breve, mas seu sorriso ficou marcado no meu coração.

À cada um dos voluntários dessa pesquisa, minha eterna gratidão e que o conhecimento gerado seja sempre revertido em prol da saúde de todos vocês.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde e toda a sua equipe, obrigada por buscarem sempre o melhor para todos os alunos. Às meninas da secretaria, Erica, Patrícia e Gabriely, por cuidarem tão bem de nós.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (processo 455117/2014-4) pelo fomento disponibilizado para a execução desse trabalho. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior juntamente com a Fundação de Apoio à Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe pela bolsa de estudos.

“Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, pois cada pessoa é única, e nenhuma substitui a outra. Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só, nem nos deixa sós. Leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo. Há os que levam muito, mas não há os que não levam nada. Há os que deixam muito, mas não há os que não deixam nada. Essa é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova evidente que duas almas não se encontram ao acaso.”

(Antoine de Saint-Exupéry)

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita.”

(Mahatma Gandhi)

“Às vezes você faz escolhas na vida e às vezes as escolhas fazem você.”

(Gayle Forman)

RESUMO

Polimorfismo de nucleotídeo único no gene do ZnT8 (rs11558471) e sua relação com o estado nutricional relativo ao zinco e marcadores glicêmicos em indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2. Paula Nascimento Brandão Lima. 2018.

A presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene do ZnT8 nas células β pancreáticas pode afetar a homeostase de zinco, aumentando o risco de desenvolvimento de diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2). Em conjunto com o zinco, os minerais cálcio, potássio e magnésio possuem papel importante no metabolismo da insulina e no controle glicêmico. Diante disso, o estudo teve como objetivo avaliar a relação do SNP rs11558471 (A/G) no gene do ZnT8 no estado nutricional relativo ao zinco e no controle glicêmico, bem como associar a ingestão concomitante de minerais com os marcadores glicêmicos em indivíduos com DM2. Para isso, 110 indivíduos adultos com DM2 foram avaliados quanto à presença do SNP estudado, ingestão alimentar e marcadores do *status* de zinco, glicêmicos e lipídicos. Aplicaram-se os testes de ANOVA ou de Kruskal-Wallis para avaliar as variáveis de acordo com o genótipo (AA, AG e GG). A ingestão habitual foi estimada pelo *Multiple Source Method* e ajustada pelo método dos resíduos. Os indivíduos foram agrupados em dois grupos (*clusters*) com base nas semelhanças da ingestão alimentar de zinco, potássio, cálcio e magnésio pela análise hierárquica de agrupamento, sendo a diferença avaliada pelo teste t de *Student* para amostras independentes ou Mann-Whitney. O teste de correlação de Pearson foi aplicado e modelos de regressão linear múltipla e regressão logística binária foram construídos. *P*-valores < 0,05 e entre 0,05 e 0,10 foram considerados significativos e marginalmente significativos, respectivamente. Os indivíduos com genótipo AA apresentaram melhor função das células β pancreáticas quando comparados àqueles com alelo G, sendo essa diferença marginalmente significativa. Não foram observadas diferenças entre os genótipos quanto as demais variáveis. O HOMA2-%B foi associado às variações do SNP rs11558471 no gene do ZnT8 ($\beta = -0,185$, $p = 0,048$) e ao peptídeo C ($\beta = 0,243$, $p = 0,012$), sendo dependente do sexo. O risco de alterar o %HbA1c (>7%) foi associado à presença do genótipo de risco AA (OR = 3,263; IC 95% = 1,154; 9,229; $p = 0,026$), dependente do tempo de diagnóstico. Quanto ao estado nutricional relativo ao zinco, observou-se que 68,3% e 72,4% dos indivíduos avaliados apresentaram deficiência desse mineral no plasma e eritrócitos, respectivamente, além de elevada prevalência de inadequação na ingestão de zinco. A ingestão dos demais minerais também se mostrou com elevada probabilidade de inadequação. O grupo com menor ingestão concomitante dos quatro minerais (*cluster 1*) apresentou maiores %HbA1c ($p = 0,006$) e concentração sérica de triglicerídeos ($p = 0,010$). Além disso, o risco de alterar o %HbA1c foi associado a menor ingestão desses minerais (*Cluster 1*) (OR = 3,041, IC 95% = 1,131;8,175, $p = 0,028$). A ingestão de potássio ($\beta = -0,001$, $p = 0,017$) e magnésio ($\beta = -0,007$, $p = 0,015$) foi inversamente associada ao %HbA1c, sendo dependente do sexo e tempo de diagnóstico. Assim, o SNP rs11558471 não se relacionou com o estado nutricional relativo ao zinco e com as variáveis de controle glicêmico em indivíduos com DM2. No entanto, as variações no genótipo desse SNP foram associadas à redução da função das células β pancreáticas, e o genótipo AA mostrou-se preditor de alterações no %HbA1c. Além disso, a reduzida ingestão concomitante de zinco, potássio, cálcio e magnésio foi associada ao risco de controle glicêmico deficiente, sendo os minerais magnésio e potássio preditores do aumento no %HbA1c.

Palavras-chave: Deficiência de zinco. Doenças crônicas. Polimorfismo de nucleotídeo único. Minerais.

ABSTRACT

Single nucleotide polymorphism in the ZnT8 (rs11558471) and its relation to the nutritional status of zinc and glycemic markers in individuals with type 2 diabetes mellitus. Paula Nascimento Brandão Lima. 2018.

The presence of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the ZnT8 gene in pancreatic β -cells can affect zinc homeostasis, increasing the risk of developing type 2 diabetes mellitus (T2DM). Combined with zinc, the minerals calcium, potassium and magnesium play an important role in insulin metabolism and glycemic control. The objective of this study was to evaluate the relationship of SNP rs11558471 (A/G) in the ZnT8 gene in the nutritional status of zinc and glycemic control, as well as to associate the concomitant mineral intake with glycemic markers in individuals with T2DM. For this, 110 adult subjects with T2DM were evaluated for the presence of the studied SNP, food intake and zinc status, glycemic and lipid markers. The ANOVA or Kruskal-Wallis tests were applied to evaluate the variables according to the genotype (AA, AG and GG). The usual intake was estimated by the Multiple Source Method and adjusted by the residual method. The individuals were grouped into two groups (clusters) based on the similarities of zinc, potassium, calcium and magnesium intake by the hierarchical grouping analysis, the difference being evaluated by Student's t-test for independent samples or Mann-Whitney. The Pearson correlation test was applied and multiple linear regression and logistic regression models were constructed. P-values <0.05 and between 0.05 and 0.10 were considered significant and marginally significant, respectively. Individuals with AA genotype had better pancreatic β -cell function when compared to those with G allele, and this difference was marginally significant. No differences were observed among the genotypes and the other variables. HOMA2-%B was associated with variations of SNP rs11558471 in the ZnT8 gene ($\beta = -0.185$, $p = 0.048$) and C-peptide ($\beta = 0.243$, $p = 0.012$), being sex dependent. The risk of altering %HbA1c ($> 7\%$) was associated with the presence of the AA risk genotype (OR = 3.263, 95% CI = 1.154, 9.229, $p = 0.026$), depending on the diagnosis time. Regarding zinc nutritional status, it was observed that 68.3% and 72.4% of the individuals evaluated showed deficiency of zinc in plasma and erythrocytes, respectively, in addition to a high prevalence of zinc intake. The intake of the other minerals also showed a high probability of inadequacy. The group with the lowest concomitant intake of the four minerals (cluster 1) had higher %HbA1c ($p = 0.006$) and serum triglyceride concentration ($p = 0.010$). In addition, the risk of altering %HbA1c was associated with lower intake of these minerals (Cluster 1) (OR = 3.041, 95% CI = 1.131, 8.175, $p = 0.028$). Potassium ($\beta = -0.001$, $p = 0.017$) and magnesium intake ($\beta = -0.007$, $p = 0.015$) were inversely associated with %HbA1c, being sex and diagnostic time dependent. Thus, the SNP rs11558471 was not related to the nutritional status relative to zinc and to the glycemic control variables in subjects with T2DM. However, variations in the genotype of this SNP were associated with reduced pancreatic β -cell function, and the AA genotype was a predictor of changes in %HbA1c. In addition, the reduced concomitant intake of zinc, potassium, calcium and magnesium was associated with the risk of glycemic control deficient, with the magnesium and potassium minerals predicting the increase in %HbA1c.

Keywords: Zinc deficiency. Chronic diseases. Single nucleotide polymorphism. Minerals.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Valores de referência para o diagnóstico de diabetes <i>mellitus</i> tipo 2.	20
Figura 1 - Participação do zinco no mecanismo de liberação da insulina pelas células β pancreáticas.	25
Figura 2 - Participação do zinco no mecanismo de sinalização de insulina.	27
Figura 3 - Fluxograma das atividades realizadas na pesquisa.	35
Quadro 2 - Pontos de corte adotados para avaliação dos indivíduos incluídos no presente estudo.	40
Figura 4 - Histograma da ingestão ajustada de zinco e prevalência de inadequação da ingestão para o grupo de indivíduos com diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 (n = 95).	47
Figura 5 - Histograma da ingestão ajustada de magnésio e prevalência de inadequação da ingestão para o grupo de indivíduos com diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 (n = 95).	48
Figura 6 - Histograma da ingestão ajustada de cálcio e prevalência de inadequação da ingestão para o grupo de indivíduos com diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 (n = 95).	48
Figura 7 - Histograma da ingestão ajustada de potássio para o grupo de indivíduos com diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 (n = 95).	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência do alelo de risco (A) no gene do ZnT8 (rs11558471) em diferentes grupos populacionais.....	31
Tabela 2 - Variáveis clínicas e bioquímicas dos indivíduos com diabetes <i>mellitus</i> tipo 2.....	43
Tabela 3 – Frequência genotípica observada e frequência esperada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg para o SNP rs11558471 no gene do ZnT8 dos indivíduos com diabetes <i>mellitus</i> tipo 2.	45
Tabela 4 - Variáveis clínicas, bioquímicas e do estado nutricional relativo ao zinco dos indivíduos com diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 (DM2) distribuídos conforme o genótipo do SNP rs11558471 no gene do ZnT8.....	45
Tabela 5 - Modelo de regressão linear múltipla entre HOMA-%B (variável dependente) e as variáveis da concentração de peptídeo C e o genótipo do ZnT8 e em indivíduos com diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 (DM2).....	46
Tabela 6 - Modelo de regressão logística binária do percentual de hemoglobina glicada (%HbA1c), variáveis do estado nutricional relativo ao zinco e SNP rs11558471 no gene do ZnT8 em indivíduos com diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 (DM2).....	47
Tabela 7 - Variáveis clínicas, bioquímicas e de ingestão de nutrientes dos indivíduos com diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 (DM2) de acordo como os <i>clusters</i> definidos a partir da ingestão dos micronutrientes (zinco, potássio, cálcio e magnésio).....	50
Tabela 8 - Modelo de regressão logística binária do percentual de hemoglobina glicada (%HbA1c) e dos <i>clusters</i> formados a partir da ingestão de minerais pelos indivíduos com diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 (DM2).....	51
Tabela 9 - Modelos de regressão linear multivariada do percentual de hemoglobina glicada (%HbA1c) (variável dependente) e a ingestão de minerais por indivíduos com diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 (DM2).....	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2	19
2.2 Zinco.....	22
2.3 Zinco e diabetes	24
2.4 Minerais e controle glicêmico	29
2.5 Transportador de zinco 8 e polimorfismo de nucleotídeo único.....	30
3 OBJETIVOS	33
3.1 Geral.....	33
3.2 Específicos.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Amostragem.....	34
4.2 Aspectos éticos.....	34
4.3 Protocolo experimental.....	35
4.4 Avaliação antropométrica	36
4.4.1 Peso	36
4.4.2 Estatura.....	36
4.4.3 Índice de massa corpórea (IMC)	36
4.4.4 Circunferência da cintura	36
4.4.5 Impedância bioelétrica	37
4.5 Coleta de material biológico, análises bioquímicas e genotipagem	37
4.5.1 Controle de contaminação.....	37
4.5.2 Sangue	37
4.5.3 Determinação do SNP rs11558471 no gene do ZnT8.....	38
4.5.4 Determinação da concentração de zinco no plasma e eritrócitos.....	38
4.5.5 Determinação das variáveis glicêmicas e lipídicas	39
4.5.6 Índice de resistência à insulina (homeostasis model assessment – HOMA).....	40
4.6 Avaliação da ingestão alimentar	40
4.7 Avaliação estatística.....	41
5 RESULTADOS	43
5.1 Caracterização da população estudada e a relação do SNP rs11558471 com as demais variáveis analisadas	43

5.2 Ingestão alimentar habitual de micronutrientes e sua relação com o controle glicêmico.....	47
6 DISCUSSÃO	52
REFERÊNCIAS.....	60
APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO SOCIOECONÔMICO E DE ANAMNESE NUTRICIONAL	72
APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	74
APÊNDICE C – INSTRUMENTO DE AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR	80
ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	81
ANEXO B – ARTIGO PUBLICADO (PRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO)	84

1 INTRODUÇÃO

A Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) acomete milhões de pessoas em todo o mundo, sendo um problema de saúde pública. No Brasil atinge mais de 12 milhões de adultos, elevando os custos com o tratamento, visto ser uma doença crônica não transmissível com alto poder incapacitante. Estima-se que 20,3 milhões de brasileiros apresentarão a doença em 2045 (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017). Na capital de Sergipe, 9,2 % da população acima de 18 anos apresenta diagnóstico de diabetes conforme os dados do Vigitel 2016 (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico) (BRASIL, 2017).

Conceitualmente, DM2 é uma doença caracterizada por falhas na produção, secreção e/ou ação da insulina, o que afeta a homeostase da glicose sanguínea, resultando em hiperglicemia. A falta de controle da glicemia está associada ao desenvolvimento das complicações micro e macrovasculares, tais como retinopatia, perda da visão, nefropatia, insuficiência renal, neuropatia periférica e autonômica, doenças cardiovasculares e doença vascular cerebral (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018a; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017).

Ao longo dos últimos anos, estudos têm verificado a participação de minerais na síntese, secreção e ação da insulina, sendo considerados nutrientes essenciais para a homeostase do metabolismo glicídico. Dentre estes, os minerais zinco, potássio, cálcio e magnésio são estudados em virtude da atuação nos processos de produção, secreção e ação da insulina, bem como na manutenção e regulação das células β pancreáticas (CHATTERJEE et al., 2015; FU; GILBERT; LIU, 2013; SHAN et al., 2014; SOLATI et al., 2014).

Em adição, a deficiência de zinco tem sido relacionada ao controle glicêmico deficiente em indivíduos com DM2 (AL-MAROOF; AL-SHARBATTI, 2006; KAMBE; HASHIMOTO; FUJIMOTO, 2014; MIAO et al., 2013; OH; YOON, 2008; SAHARIA; GOSWAMI, 2013). A participação do zinco na síntese e secreção de insulina é regulada pela ação do transportador de zinco 8 (ZnT8) presente nas células β pancreáticas (CHIMIANTI et al., 2004; LEFEBVRE et al., 2012). O ZnT8 é responsável pela regulação da concentração de zinco celular, transportando este mineral para o interior de organelas intracelulares ou do citosol para fora das células (CHIMIANTI et al., 2004; EGEFJORD et al., 2009; WIJESEKARA et al., 2010).

Associado a isso, diversos estudos mostraram que a presença de polimorfismos de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphisms* - SNPs) no gene do ZnT8 aumenta o risco

de desenvolver DM2 (BOESGAARD et al., 2008; HUANG et al., 2010; WIJESEKARA et al., 2010; XU et al., 2011), por estar associado à redução na maturação, estocagem e secreção de insulina (FU et al., 2009; WIJESEKARA; CHIMIENTI; WHEELER, 2009).

Dentre os SNPs no gene do ZnT8 com conhecida relação com a diabetes, o rs11558471 caracteriza-se pela substituição da base adenina por guanina (A/G), na posição 117.173.494 do cromossomo 8, na região 3'UTR (*untranslated region*). Pesquisas prévias indicaram que o alelo A (alelo de referência) atribui risco para o desenvolvimento de DM2, bem como nefropatia diabética (DAVIDSON; WENZLAU; O'BRIEN, 2014; SEMAN et al., 2015). Ademais, foi mostrada associação inversa entre a ingestão de zinco e as concentrações de glicose em jejum em indivíduos com alelo de risco em diferentes populações (BERNÁ et al., 2014; HRUBY et al., 2013).

No entanto, estudos que avaliaram a presença do SNP rs11558471 no gene do ZnT8 relacionada ao *status* de zinco em indivíduos com DM2 e as variáveis do metabolismo da glicose são inexistentes na população brasileira. Em virtude da importância que os minerais exercem sobre tais relações, faz-se necessária a realização de estudos dessa natureza com o objetivo de traçar novas estratégias no tratamento de indivíduos com DM2.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diabetes *mellitus* tipo 2

Doença crônica de origem multifatorial, a DM2 consiste em falhas na produção, secreção e resistência à ação da insulina, ocasionando falhas na captação de glicose pelas células e consequentemente hiperglicemia. Em longo prazo, a hiperglicemia pode ocasionar retinopatia, perda da visão, nefropatia, insuficiência renal, neuropatia periférica e autonômica, doenças cardiovasculares, doença vascular cerebral, dentre outras (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018a; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017)

Estima-se que 425 milhões de pessoas no mundo são afetadas por essa doença, com projeção de um aumento de 48 % até o ano de 2045. O Brasil é o quarto país com o maior número de indivíduos acometidos com diabetes, apresentando um total de 12,5 milhões de casos em 2017 (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017). De acordo com dados do Vigitel 2016, Aracaju ocupou a terceira posição entre as capitais do Nordeste com maior prevalência de diabetes, ficando atrás de Natal e Recife, respectivamente (BRASIL, 2017). A diabetes gerou um gasto mundial de 850 bilhões de dólares em 2017, ocasionando grande impacto econômico para os sistemas de saúde (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017).

Ao contrário da diabetes *mellitus* tipo 1, que é resultante da destruição autoimune das células β pancreáticas, a DM2 corresponde a 90 % dos casos diagnosticados e está interligada ao estilo de vida e fatores ambientais, além de associar-se a fatores genéticos (DORIA; PATTI; KAHN, 2008; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017; KAMBE; HASHIMOTO; FUJIMOTO, 2014). O mundo vive um cenário epidêmico de obesidade, o qual relaciona-se com o aumento do risco cardiometabólico e de DM2 (DORIA; PATTI; KAHN, 2008; ESSER et al., 2014).

Atualmente, nota-se o crescente número de casos em diferentes faixas etárias, acometendo também crianças, adolescentes e adultos jovens (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017). Dentre os motivos para o aumento do número de casos de DM2, estão o sedentarismo, aspecto comum da população urbana que é a maior detentora de casos, o aumento da perspectiva de vida e a obesidade, frequentemente causada por escolhas alimentares não saudáveis (FLOR et al., 2015; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017; ISER et al., 2015).

Recomenda-se a realização de exames periódicos para triagem de pré-diabetes e risco de desenvolvimento de DM2 em indivíduos adultos assintomáticos a partir dos 45 anos, adultos de qualquer idade que estejam com sobrepeso ou obesidade ($IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$), crianças ou adolescentes com sobrepeso ou obesidade ($IMC >$ percentil 85 para idade e sexo ou peso para altura $>$ percentil 85 ou peso para altura $> 120 \%$ do ideal), além dos indivíduos que apresentam riscos adicionais, como a presença de outras comorbidades. Para o diagnóstico de DM2 podem ser considerados os valores de glicose em jejum, concentração de glicose após teste de tolerância oral a glicose e o percentual de hemoglobina glicada (%HbA1c) (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018a) (Quadro 1).

Quadro 1 - Valores de referência para o diagnóstico de diabetes *mellitus* tipo 2.

Marcadores	Valores
Glicose em jejum	$\geq 126 \text{ mg/dL}$ ($7,0 \text{ mmol/L}$)
Teste de tolerância oral a glicose (após 2 horas de administração da carga oral de 75 g de glicose)	$\geq 200 \text{ mg/dL}$ ($11,1 \text{ mmol/L}$)
%HbA1c	$\geq 6,5 \%$ ($48,0 \text{ mmol/L}$)

Fonte: American Diabetes Association (2018a).

O processo fisiopatológico da DM2 é resultante da resistência periférica à ação da insulina em conjunto com a secreção deficiente desse hormônio pelas células β pancreáticas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018a). A resistência à insulina é caracterizada pela diminuição da captação de glicose em tecidos-alvo (células musculares, hepáticas e adiposas) e falhas na inibição da gliconeogênese hepática, o que provoca hiperglicemia. Um estado compensatório é então instalado, promovendo aumento na produção e secreção de insulina até culminar em falência pancreática (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018a; CHENG; TSENG; WHITE, 2010; DORIA; PATTI; KAHN, 2008).

O acúmulo de gordura, em especial na região visceral, provoca redução na sensibilidade à insulina devido aos mecanismos de lipotoxicidade, liberação de hormônios e produção de citocinas pró-inflamatórias (KAHN, 2003; KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006). A produção aumentada da proteína ligante de retinol 4 (RBP4) observada nessa condição reduz a sinalização da enzima fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) no músculo e aumenta a expressão da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase no fígado, reduzindo a captação de glicose e intensificando a gliconeogênese (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006).

Os ácidos graxos livres liberados pelo tecido adiposo e a infiltração de macrófagos nesse tecido, bem como no fígado, músculos e pâncreas, ativam os receptores do tipo Toll (*Toll-like receptors*) provocando a produção crônica de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1). Com a produção dessas citocinas ocorre o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (CALLE; FERNANDEZ, 2012; LONTCHI-YIMAGOU et al., 2013).

Em conjunto, as citocinas e ERO ativam as quinases c-JUN N-terminal e o fator nuclear *kappa* B (NFkB), estimulando a resposta inflamatória a partir do sistema imune inato (CALLE; FERNANDEZ, 2012; ESSER et al., 2014; KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006). Dessa forma, as citocinas pró-inflamatórias produzidas pelo tecido adiposo interferem na cascata de sinalização da insulina por intermédio da fosforilação dos resíduos de serina do substrato do receptor de insulina (IRS), resultando na redução da síntese e da translocação do transportador de glicose 4 (GLUT4) para a membrana plasmática (CALLE; FERNANDEZ, 2012; LONTCHI-YIMAGOU et al., 2013).

A hiperglicemia por si induz o estresse oxidativo por intermédio dos mecanismos de auto-oxidação da glicose, via dos poliois, via das hexosaminas, formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), ativação da proteína quinase C e ativação da adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) oxidase (CALLE; FERNANDEZ, 2012; CHANG; YANG, 2016; FOLLI et al., 2011; TANGVARASITTICHA, 2015). Por consequência, a sinalização da insulina será comprometida visto a redução da ativação do IRS e de vias subsequentes (FOLLI et al., 2011).

O advento da nutrigenômica instigou o aumento das pesquisas acerca do papel dos nutrientes como moduladores de genes e de expressão proteica, fato que influencia o metabolismo celular (AFMAN; MÜLLER, 2006; KAMBE; HASHIMOTO; FUJIMOTO, 2014; SHAN et al., 2014). Além disso, estudos têm mostrado a participação de micronutrientes (zinco, cálcio, magnésio, potássio, cromo e vitamina D) no controle da diabetes, uma vez que alguns desses são cofatores de enzimas essenciais nas vias metabólicas da glicose, função das células β pancreáticas, na cascata de sinalização de insulina e defesa antioxidante do organismo (BHANOT; THOMPSON; MCNEILL, 1994; KHAN et al., 2015). A adequada ingestão de nutrientes associada à qualidade da dieta representa um importante pilar no controle da DM2 (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018b; LEY et al., 2014).

2.2 Zinco

O zinco é cofator catalítico de mais de 300 enzimas e apresenta funções catalíticas, estruturais e regulatórias. Estima-se que mais de 3 % do genoma humano codifica proteínas com domínios de ligação ao zinco (COUSINS; LIUZZI; LICHTEN, 2006). Desse modo, esse mineral integra o metabolismo dos carboidratos, lipídios, ácidos nucleicos e síntese de proteínas (DEVIRGILIIS et al., 2007). No corpo humano, 85 % do total de zinco está presente nos músculos e ossos, 11 % na pele e no fígado, sendo o restante distribuído em outros tecidos (MIAO et al., 2013). O zinco plasmático corresponde a menos que 0,2 % do total corporal (15 $\mu\text{mol/L}$) e varia de acordo com as necessidades corporais (BROWN; WUEHLER; PEERSON, 2001).

Este nutriente é amplamente distribuído nos alimentos, sendo as principais fontes os alimentos de origem animal (maior biodisponibilidade) como ostras, fígado, carne vermelha e ovos. Também é encontrado em fontes vegetais, como leguminosas e cereais integrais, legumes, nozes, sementes e produtos de soja. A absorção intestinal de zinco é influenciada pela solubilidade dos compostos na dieta, presença de ligantes de baixo peso molecular (aminoácidos, peptídeos e ácido picolínico) e pela competição com outros minerais por carreadores ou sítios de captação no intestino (BROWN; WUEHLER; PEERSON, 2001; CESAR; WADA; BORGES, 2005; INSTITUTE OF MEDICINE, 2006; ROOHANI et al., 2013). A recomendação de ingestão dietética diária de zinco para a população saudável adulta é de 11,0 mg/dia para homens e 8,0 mg/dia para mulheres (INSTITUTE OF MEDICINE, 2006).

Considerada problema nutricional mundial, a deficiência de zinco atinge em maior frequência os idosos, crianças, mulheres grávidas, vegetarianos, pessoas hospitalizadas e indivíduos com doenças crônicas (INSTITUTE OF MEDICINE, 2006; ROOHANI et al., 2013). A crescente incidência de deficiência na população geral pode ser atribuída à escolha frequente de alimentos ricos em carboidratos simples, fitatos e a reduzida ingestão dietética de proteína animal (CESAR; WADA; BORGES, 2005). A ingestão insuficiente de zinco pode ocasionar retardo no crescimento, diarreia, lesões de pele, alopecia, hipogonadismo, disfunção do sistema imunológico, doenças neurológicas e anorexia (KAMBE; HASHIMOTO; FUJIMOTO, 2014; PRASAD, 2013).

A homeostase do zinco é controlada por mecanismos de absorção, efluxo, distribuição e armazenamento, que são coordenados por dois tipos de proteínas transportadoras de zinco: ZnTs (SLC30A) e Zips (SLC39A). Os ZnTs são responsáveis pelo efluxo de zinco do citosol para o espaço extracelular ou para o interior dos compartimentos intracelulares. Já os Zips

permitem o influxo de zinco para o meio intracelular. A expressão desses transportadores é regulada em resposta às variações nas concentrações celulares de zinco, hormônios e citocinas (COUSINS; LIUZZI; LICHTEN, 2006; DEVIRGILIIS et al., 2007; MIAO et al., 2013; ROOHANI et al., 2013).

O zinco oriundo da alimentação é absorvido (cerca de 30 %) no intestino delgado por meio do transportador Zip4 e dentro dos enterócitos é compartimentalizado pelas metalotioneínas. Esta proteína é responsável pelo armazenamento e circulação intracelular de zinco, sequestrando ou liberando esse mineral de acordo com a necessidade do organismo. Uma vez absorvido, o zinco é transportado até o fígado, ligado principalmente à albumina (80 %) e α 2-macroglobulina (20 %). A partir do fígado, o zinco é distribuído para outros tecidos corporais (CHIMIENTI et al., 2004; DEVIRGILIIS et al., 2007; KAMBE; HASHIMOTO; FUJIMOTO, 2014; MIAO et al., 2013).

A excreção do zinco é realizada pelo trato gastrointestinal (maior quantidade), secreções biliares e intestinais, urina, suor, menstruação, sêmen, descamação da pele, unhas e cabelos (BROWN; WUEHLER; PEERSON, 2001; ROOHANI et al., 2013). O controle da excreção é exercido pela absorção intestinal, bem como, mecanismos de reabsorção (KREBS, 2000; ROOHANI et al., 2013). Não é observado na literatura consenso quanto ao melhor marcador para avaliação do estado nutricional de zinco, visto o controle rigoroso da homeostase de zinco corporal.

As concentrações plasmáticas de zinco são mais susceptíveis a variações, alterando-se rapidamente (~ 3 dias) frente a situações de estresse, infecções, processos inflamatórios, fatores hormonais, hipoalbuminemia, doenças intestinais e ingestão alimentar (BROWN, 1998; BROWN; WUEHLER; PEERSON, 2001; WOOD, 2000). Já o conteúdo de zinco nos eritrócitos corresponde a um estoque de meia vida longa, em torno de 120 dias, refletindo assim alterações de médio a longo prazo (GIBSON, 2005). Desse modo, são consideradas adequadas as concentrações de zinco plasmáticas de 70 a 110 $\mu\text{g/dL}$ (GIBSON, 2005) e as concentrações de zinco eritrocitárias de 40 a 44 $\mu\text{gZn/gHb}$ (GUTHRIE; PICCIANO, 1994).

Diante disso, são comumente utilizadas para avaliação do estado nutricional relativo ao zinco as determinações da atividade de metaloenzimas e das concentrações plasmáticas, eritrocitárias e urinária desse mineral, bem como da ingestão alimentar (ANDREE et al., 2004; BROWN, 1998; BROWN; WUEHLER; PEERSON, 2001; HAMBIDGE, 2000).

2.3 Zinco e diabetes

Estudos mostram que o zinco participa do processo de sensibilização à insulina, visto sua capacidade de alterar o número e a afinidade dos receptores de insulina (*Insulin receptor - IR*). Além disso, o zinco estimula proteínas envolvidas na cascata de sinalização da insulina, aumentando a translocação dos transportadores de glicose dos sítios intracelulares para a membrana plasmática (COULSTON; DANDONA, 1980; DEVIRGILIIS et al., 2007).

Além de compor o suco pancreático, o zinco é particularmente abundante nas ilhotas das vesículas secretórias do pâncreas, onde estabiliza a estrutura dos grânulos de insulina (DEVIRGILIIS et al., 2007). Descoberta em 1921 por Banting e Best, a insulina é um hormônio anabólico (BANTING; BEST, 1922) transcrito em resposta ao aumento da glicose circulante (ANDRALI et al., 2008; GOODISON; KENNA; ASHCROFT, 1992).

A insulina é traduzida inicialmente como pré-pró-insulina, um polipeptídeo formado por 110 aminoácidos contendo um peptídeo de sinal N-terminal. Este, por sua vez, comunica-se com a partícula de reconhecimento de sinal no retículo endoplasmático rugoso, facilitando a translocação da pré-pró-insulina para dentro desta organela, onde sofrerá uma reação de clivagem transformando-se em pró-insulina. Em seguida, a pró-insulina é dobrada e estabilizada a partir da ligação dos domínios A e B por intermédio de três ligações dissulfeto (FU; GILBERT; LIU, 2013; HUTTON, 1994; TOKARZ; MACDONALD; KLIP, 2018; WILCOX, 2005).

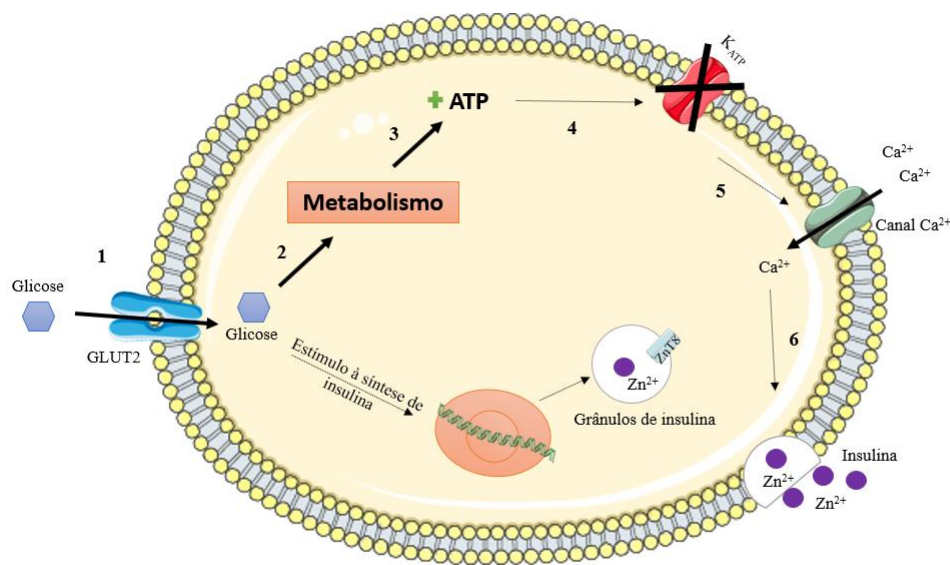
Posteriormente, a pró-insulina é transportada para o complexo de Golgi onde, dentro de grânulos de secreção imaturos, é clivada em insulina e peptídeo C pelas enzimas pró-hormônios convertases (PC1/3 e PC2) e carboxipeptidase E. No interior dos grânulos secretórios, a insulina se une a dois íons de zinco (Zn^{2+}) e um íon de cálcio (Ca^{2+}) formando um cristal insolúvel de formato hexamérico (DAVIDSON; WENZLAU; O'BRIEN, 2014; HUTTON, 1994; LIU et al., 2014; TOKARZ; MACDONALD; KLIP, 2018; WILCOX, 2005).

A secreção de insulina inicia em resposta a presença de nutrientes na circulação sanguínea como glicose, outros monossacarídeos, aminoácidos e ácidos graxos (FU; GILBERT; LIU, 2013). Dentre estes, a glicose é a principal substância estimuladora da secreção de insulina via transportador de glicose 2 (GLUT2) nas células β pancreáticas. Este mecanismo desencadeia reações de glicólise com consequente geração de ATP (*Adenosine TriPhosphate*) (FU; GILBERT; LIU, 2013; WEISS; STEINER; PHILIPSON, 2000).

O aumento de ATP dentro das células β pancreáticas promove o fechamento dos canais de potássio dependentes de voltagem, causando influxo de cálcio para a célula por meio dos

canais de cálcio dependentes de voltagem, o que provoca a mobilização dos grânulos secretórios e a secreção de insulina e zinco para a circulação sanguínea. Em conjunto, ocorre a ativação de fosfolipases e da proteína quinase C, a estimulação da atividade da adenil ciclase e da proteína quinase A (PKA) causando amplificação da secreção (CHIMIENTI et al., 2004; FU; GILBERT; LIU, 2013; WEISS; STEINER; PHILIPSON, 2000), conforme mostrado na figura 1.

Figura 1 - Participação do zinco no mecanismo de liberação da insulina pelas células β pancreáticas.



Células β pancreáticas

Fonte: Adaptado de Fu, Gilbert e Liu (2013). Legenda: 1) entrada da glicose nas células β pancreáticas por meio do GLUT2; 2) reações de glicólise; 3) produção de ATP; 4) fechamento dos canais de potássio dependentes de voltagem; 5) influxo de cálcio por meio dos canais de cálcio dependentes de voltagem; 6) secreção de insulina e zinco para a circulação sanguínea.

Nas células-alvo, o zinco apresenta atividade similar à insulina, cujo mecanismo de ação ocorre por intermédio da sua ligação ao IR presente na superfície da membrana celular (Figura 2). Esse receptor apresenta estrutura tetramérica, com a presença de duas subunidades α e duas subunidades β de controle alostérico (SALTIEL; KAHN, 2001). A ligação da insulina ao IR provoca a auto fosforilação da subunidade β e, em consequência, fosforilação dos resíduos de tirosina presentes em uma série de substratos intracelulares como: substrato do receptor de insulina (IRS-1 a 4), IRS/DOK4, IRS/DOK5, Gab-1 (proteína de ligação associada a GRB2), Cbl (Cbl proto-oncogene) e Shc (domínio 2 homólogo ao Src) (CHANG; CHIANG; SALTIEL, 2005; DU; WEI, 2014).

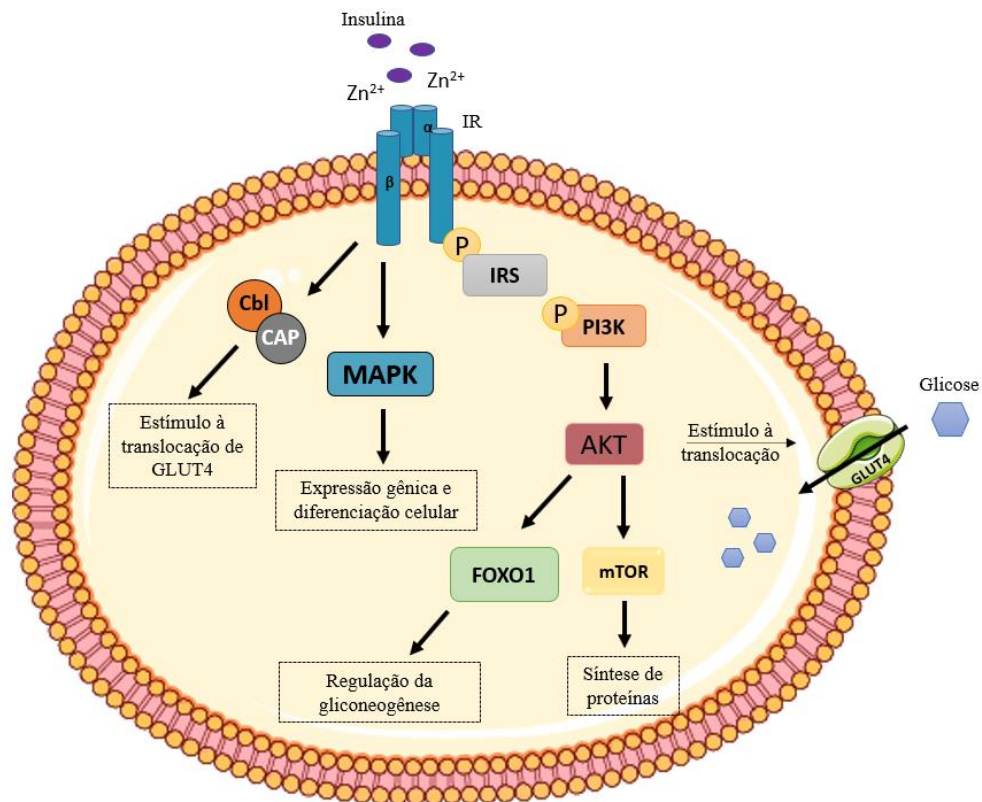
A sinalização da insulina nos hepatócitos é um importante mecanismo de regulação dos processos de glicólise, gliconeogênese e síntese de glicogênio (DAI et al., 2015; MANNING; CANTLEY, 2007). A insulina promove a fosforilação em tirosina dos resíduos do substrato IRS-1 e subsequente ativação das vias da PI3K e da proteína quinase B (Akt). A via da Akt regula a proliferação celular, bem como, inibe a gliconeogênese e a oxidação de ácidos graxos por intermédio da fosforilação do fator de transcrição FOXO1 (*Forkhead box protein O1*) e do coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo (PGC-1 α) (CHENG; TSENG; WHITE, 2010; MANNING; CANTLEY, 2007; YECIES et al., 2011).

A proteína Akt é responsável ainda por ativar o complexo mTORC1 (*Mammalian Target of Rapamycin Complex 1*) a partir da inibição do complexo TSC1-TSC2. A mTORC1 ativa a lipogênese, a via de síntese de colesterol e via das pentoses devido ao aumento do fator de transcrição SREBP1c (*sterol regulatory element-binding protein*). Em adição, a mTORC1 estimula o fator de transcrição HIF1- α (*Hypoxia-inducible factor 1- α*), responsável por ativar enzimas da glicólise (CHENG; TSENG; WHITE, 2010; MANNING; CANTLEY, 2007; MULUKUTLA et al., 2016; YECIES et al., 2011).

Nos tecidos musculares e adiposo, a insulina liga-se ao IR desencadeando a fosforilação dos substratos IRS. A cascata de sinalização é seguida pela ativação da via PI3K-Akt, com subsequente fosforilação da AS160 (*Akt substrate of 160 kDa*), ativação da Rab84 (*Ras-related protein Rab84*) e Rab13 (*Ras-related protein Rab13*) (tecidos musculares) ou da Rab10 (*Ras-related protein Rab10*) (tecido adiposo). A ativação dessas proteínas desencadeia interações de efetores, promovendo a translocação do GLUT4 até a membrana plasmática e favorecendo a captação da glicose (MANNING; CANTLEY, 2007; TOKARZ; MACDONALD; KLIP, 2018).

A fosforilação do IR ativa também o complexo Cbl/CAP (*Catabolite activator protein*), causando a sua translocação para a membrana plasmática. Em sucessão, a proteína CrkII (*Adapter molecule Crk*) migra para a membrana e forma um complexo com a proteína C3G (*Rap guanine nucleotide exchange factor 1*), com posterior ligação e ativação da proteína TC10 (*Small GTP-binding protein TC10*). Essa cascata fornece sinalização adicional para a translocação do GLUT4 para a membrana plasmática e captação da glicose (SALTIEL; KAHN, 2001). A glicose captada pelos transportadores de glicose pode ser utilizada em diversas vias, sendo principalmente utilizada como estoque (glicogênio), na via glicolítica e na via das pentoses fosfato (NELSON; COX, 2002).

Figura 2 - Participação do zinco no mecanismo de sinalização de insulina.



Células-alvo

Fonte: Adaptado de Fu, Gilbert e Liu (2013). Legenda: Zn^{2+} : zinco; Cbl/CAP: complexo *Cbl proto-oncogene* / *Catabolite activator protein*; MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinases*; IRS: Substrato do receptor de insulina; PI3K: enzima fosfatidilinositol-3-quinase; AKT: proteína quinase B; FOXO1: *Forkhead box protein O1*; mTOR: *Mammalian Target of Rapamycin Complex*.

Durante a glicólise, a glicose é fosforilada formando ATP e piruvato. O piruvato oriundo da glicólise sofre ação da piruvato desidrogenase, gerando acetil-CoA que seguirá para o ciclo de Krebs (tricarboxylic acid cycle - TCA), na matriz mitocondrial, onde é oxidado liberando ao final do ciclo CO_2 e energia nas formas de 3 NAD^+ , FAD (Flavin adenine dinucleotide) e uma molécula de ATP ou GTP (Guanosine TriPhosphate). Os produtos originados no ciclo de Krebs seguem para a fosforilação oxidativa que terá como produto final mais moléculas de ATP, suprimento energético para as funções celulares (CHENG; TSENG; WHITE, 2010; NELSON; COX, 2002).

Com a resistência à insulina, o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa são reduzidas, prejudicando a função mitocondrial e, conseqüentemente, causando falhas no metabolismo da glicose e dos lipídios e na síntese de proteínas (CHENG; TSENG; WHITE, 2010; MORINO; PETERSEN; SHULMAN, 2006). Em modelo animal, é possível observar a hiperativação da

FOXO1 na resistência à insulina, a qual aumenta a expressão do gene da heme oxigenase 1 (HMOX1) e o catabolismo do grupo heme. Desse modo, a fosforilação oxidativa é prejudicada, pois o grupo heme é cofator para o transporte de elétrons. Em conjunto, a oxidação do NADH é reduzida, o que compromete a oxidação de ácidos graxos e a biogênese mitocondrial (CHENG; TSENG; WHITE, 2010).

Os íons de zinco liberados podem também atuar de forma parácrina, promovendo a abertura dos canais de potássio dependentes de voltagem nas células α , inibindo a secreção de glucagon estimulada por piruvato (FRANKLIN et al., 2005; ZHOU et al., 2007). Em acréscimo, o zinco pode potencializar a secreção de insulina estimulada pela glicose circulante por intermédio da modulação conjunta com o ATP dos canais P2XR (receptor purinérgico P2X) (RICHARDS-WILLIAMS et al., 2008). Isto posto, a deficiência de zinco, comumente observada em indivíduos com DM2, acarreta redução da biossíntese e armazenamento de insulina nas células pancreáticas, bem como da sua sinalização (BASAKI et al., 2012; KHAN et al., 2015; MASOOD; BALOCH; GHORI, 2009; PRASAD, 2013; SAHARIA; GOSWAMI, 2013; XU et al., 2013).

Têm-se observado em indivíduos com DM2 concentrações reduzidas de zinco presente no plasma (OH; YOON, 2008), soro (AL-MAROOF; AL-SHARBATTI, 2006; MASOOD; BALOCH; GHORI, 2009; NSONWU et al., 2006), bem como a presença de hiperzincúria (NSONWU et al., 2006; XU et al., 2013). O estado nutricional deficiente de zinco contribui para o aumento da geração de citocinas pró-inflamatórias e também do estresse oxidativo, fatores que desempenham papel chave na progressão de complicações induzidas pela diabetes (BASAKI et al., 2012; KHAN et al., 2015; MASOOD; BALOCH; GHORI, 2009; SAHARIA; GOSWAMI, 2013; XU et al., 2013). Portanto, a manutenção das concentrações corporais de zinco são essenciais para a varredura dos radicais livres gerados, visto esse mineral ser componente da enzima antioxidante Superóxido dismutase (LUO et al., 2015).

Alguns estudos avaliaram o efeito da suplementação de zinco no controle glicêmico sendo observadas redução da glicose de jejum e do %HbA1c (PRASAD et al., 2013; WIJESEKARA, CHIMIENTI, WHEELER, 2009). Desse modo, o zinco apresenta-se como importante alvo terapêutico para prevenção, controle e redução das complicações decorrentes da DM2 (CARVALHO et al., 2017). Nesse contexto, o conhecimento dos genótipos associados a proteínas importantes para a biodisponibilidade de zinco tem sido cada vez mais explorado (AFMAN; MÜLLER, 2006; FERGUSON et al., 2007).

2.4 Minerais e controle glicêmico

Além do zinco podemos salientar a participação de outros minerais no metabolismo glicêmico. Dentre eles, o magnésio atua na secreção e sensibilidade à insulina, bem como na translocação do GLUT4 para a membrana plasmática devido a sua participação como cofator de enzimas do metabolismo da glicose (DONG et al., 2011; SALES et al., 2011; VERONESE et al., 2016). A partir da formação do complexo Mg-ATP são possíveis as reações de auto fosforilação da subunidade β dos receptores de insulina, proliferação e manutenção das células β pancreáticas, atividade das enzimas tirosinas quinases e de outras proteínas e substratos da cascata de sinalização da insulina (HRUBY et al., 2014; SALES et al., 2011).

Em conjunto, o cálcio e potássio permitem a liberação da insulina a partir dos grânulos secretórios (FU; GILBERT; LIU, 2013). No interior das células β pancreáticas, o aumento da relação intracelular ATP/ADP oriundos do metabolismo da glicose provoca o fechamento dos canais de potássio sensíveis ao ATP, acarretando a despolarização da membrana plasmática. Em sequência à despolarização ocorre a abertura dos canais de Ca^{2+} , permitindo influxo de cálcio para dentro das células e ativação da exocitose de grânulos de insulina (BONFANTI et al., 2015; FU; GILBERT; LIU, 2013). Ainda, a baixa concentração sérica de potássio pode ocasionar o aumento da resistência à insulina nos tecidos periféricos por mecanismos ainda não elucidados (CHATTERJEE et al., 2015).

É possível observar na literatura estudos que associem a baixa ingestão e concentração sérica desses minerais e o risco de desenvolvimento de DM2 (CHATTERJEE et al., 2012, 2015; DRAKE et al., 2017; HRUBY et al., 2014; VILLEGAS et al., 2009). Apesar disso, não são vastamente encontrados na literatura estudos que avaliem a relação desses minerais no controle glicêmico em indivíduos com a doença instalada.

Indivíduos com DM2 frequentemente apresentam reduzida ingestão de magnésio e hipomagnesemia (BARBAGALLO; DOMINGUEZ, 2015; SALES et al., 2011; SAMPAIO et al., 2014). Porém, estudos de suplementação desse mineral não apresentam consenso quanto aos efeitos positivos da suplementação na redução da glicemia e %HbA1c (EIBL et al., 1995; PAOLISSO et al., 1989; RODRÍGUEZ-MORÁN; GUERRERO-ROMERO, 2003; VALK et al., 1998). O mesmo aplica-se aos minerais cálcio e potássio, não sendo observadas evidências suficientes quanto a atuação desses minerais no controle glicêmico.

2.5 Transportador de zinco 8 e polimorfismo de nucleotídeo único

Identificado pela primeira vez em 2004, o ZnT8 é uma proteína de 369 aminoácidos codificada pelo membro 8 da família 30 de carreador de soluto. O gene do ZnT8 está localizado no cromossomo 8, na região 8q24.11 e apresenta 8 éxons, com tamanho total de 37 kb (CHIMIANTI et al., 2004).

O ZnT8 é composto estruturalmente por seis domínios transmembrana com um anel intracelular rico em histidina entre as hélices quatro e cinco (CHIMIANTI et al., 2004). Essa proteína é altamente expressa nas células β pancreáticas e pode ser observada ainda, em menor quantidade, nas células α do pâncreas e na retina (DAVIDSON; WENZLAU; O'BRIEN, 2014). Outros tecidos também apresentam expressão do gene do ZnT8 em menor proporção, entre os quais estão os do duodeno, endométrio, rins, testículos, estômago, intestino delgado, adipócitos e os linfócitos (DAVIDSON; WENZLAU; O'BRIEN, 2014; NCBI, 2018).

Nas células β pancreáticas, o ZnT8 é requerido para a acumulação regular de zinco dentro das vesículas intracelulares desempenhando, portanto, papel na biossíntese de insulina e tolerância à glicose (CHIMIANTI et al., 2004). Nicolson et al. (2009) mostraram, por meio de experimentos em animais, que o ZnT8 também atua na homeostase normal do peso corporal por mecanismos ainda não estabelecidos.

Variações nas sequências de DNA são comuns nos indivíduos, sendo responsáveis pela variabilidade interpessoal observada nas características fenotípicas e de suscetibilidade à doenças. Essas mutações apresentam-se de diferentes maneiras, entre estas a alteração na sequência de DNA por meio de substituição, deleção ou inserção (BROOKES, 1999; MCINNES; WILLARD; NUSSBAUM, 2016; WANG; MOULT, 2001).

Alterações em alelos presentes em mais que 1 % da população são denominadas de polimorfismos genéticos (LODISH et al., 2005; MCINNES; WILLARD; NUSSBAUM, 2016; WANG; MOULT, 2001). Os SNPs são os mais frequentes e ocorrem nos éxons, íntrons e em regiões funcionais do gene, podendo alterar ou não a sequência de aminoácidos codificadoras das proteínas, modificar o códon de parada ou alterar o sítio de *splicing* (LODISH et al., 2005; MCINNES; WILLARD; NUSSBAUM, 2016).

A partir da análise de genotipagem do ZnT8 pôde-se observar que a presença de alelos de risco aumenta a chance em 1,18 e 1,53 vezes de desenvolvimento de DM2 em indivíduos heterozigotos e homozigotos, respectivamente (DAVIDSON; WENZLAU; O'BRIEN, 2014; DORIA; PATTI; KAHN, 2008; MOCCHEGIANI; GIACCONI; MALAVOLTA, 2008). No gene do ZnT8 já foram identificados SNPs que podem causar trocas do aminoácido arginina

para o triptofano ou glutamina no códon 325 (DAVIDSON; WENZLAU; O'BRIEN, 2014; SLADEK et al., 2007) e também na região 3'UTR, os quais estão associados ao risco de DM2 (DAVIDSON; WENZLAU; O'BRIEN, 2014).

Indivíduos com alelos de risco no gene do ZnT8 podem exibir atividade reduzida do transportador acarretando na diminuição da secreção de insulina e/ou produção de pró-insulina (NICOLSON et al., 2009). Estudos realizados em populações europeias corroboraram o exposto, sendo observadas hiperglicemia e reduzida secreção de insulina nos participantes com alelos de risco (LEFEBVRE et al., 2012; PRASAD et al., 2013; SHAN et al., 2014).

Dentre os SNPs identificados na região 3'UTR do gene do ZnT8 encontra-se o SNP rs11558471 caracterizado pela substituição do alelo A (selvagem) pelo alelo G (variante). A maior frequência alélica observada é para o alelo A (Tabela 1), o qual confere risco de desenvolvimento de DM2 (LIN et al., 2010; REES et al., 2011a; SEMAN et al., 2015; XU; WANG; CHEN, 2012).

Tabela 1 - Frequência do alelo de risco (A) no gene do ZnT8 (rs11558471) em diferentes grupos populacionais.

Autor, ano	População	Presença de DM2	n	Frequência do alelo de risco (%)
Lin et al., 2010	Han Chineses	Sim	1529	58
		Não	1439	52
Yang et al., 2010	Branços não-hispânicos	Não	1225	69
	Negros não-hispânicos	Não	897	88,7
	Mexicanos-americanos	Não	902	72,9
Rees et al., 2011	Asiáticos	Não	417	71
	Paquistaneses	Não	1167	74
Xu, Wang e Chen, 2012	Chineses	Sim	1508	69
		Não	1500	50
Seman et al., 2015	Malaios	Sim	509	62
		Não	441	55,2

DM2: diabetes *mellitus* tipo 2; n: número de indivíduos avaliados.

O alelo A do SNP rs11558471 tem sido associado com os valores alterados de glicose em jejum (REES et al., 2011b; XU; WANG; CHEN, 2012; YANG et al., 2010). Além disso, apresenta associação com o aumento dos valores de pró-insulina, porém, com redução da secreção de insulina, demonstrando o comprometimento da função das células β pancreáticas e reafirmando o papel desse alelo na progressão da diabetes (STRAWBRIDGE et al., 2011).

Ainda, é possível observar associação da ingestão de alguns nutrientes ao alelo A desse SNP. Em um estudo de meta-análise realizado por Kanoni et al. (2011) foi observado que o efeito do alelo de risco A nos valores de glicose em jejum foi atenuado à medida que aumentava o consumo de zinco ($\beta = -0,0017 \pm 0,0006$ mmol/L de glicose a cada 1 mg/dia). Também foi encontrada forte associação inversa entre a concentração de glicose e a ingestão de zinco nos indivíduos homozigotos de referência (AA). Em outro estudo foi observada associação do magnésio ao SNP rs11558471, na qual foi demonstrada redução dos valores de glicose em jejum com o aumento do consumo desse mineral em indivíduos com o alelo A ($\beta = -0,0045$ a cada 50 mg/dia) (HRUBY et al., 2013).

Haplótipos do SNP rs11558471 podem apresentar forte associação entre si, como visto com o SNP Arg325Trp (KANONI et al., 2011; MARUTHUR et al., 2014). O alelo C deste SNP confere risco de desenvolvimento de DM2 (CAUCHI et al., 2010; SHAN et al., 2014; SLADEK et al., 2007; XIANG et al., 2008), sendo possível observar em alguns estudos o decréscimo da secreção de insulina em indivíduos com a presença desse alelo (BOESGAARD et al., 2008; STAIGER et al., 2007).

Portanto, estudos envolvendo SNPs no ZnT8 mostram-se oportunos e atuais. A avaliação da relação entre a presença do SNP rs11558471 em indivíduos com DM2 residentes no Brasil com o estado nutricional relativo ao zinco, contribuirá para o entendimento dessa relação no controle glicêmico, o que pode auxiliar no desenvolvimento de novas abordagens de redução do risco e tratamento da DM2.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a relação do SNP rs11558471 (A/G) no gene do ZnT8 com o estado nutricional relativo ao zinco e com o controle glicêmico em indivíduos com DM2.

3.2 Específicos

- ✓ Verificar a presença do rs11558471 e sua relação com as variáveis avaliadas;
- ✓ Avaliar o estado nutricional relativo ao zinco por meio das concentrações no plasma e eritrócitos;
- ✓ Avaliar os marcadores glicêmicos, insulinêmicos e lipídicos;
- ✓ Avaliar a ingestão dietética de micro (zinco, cálcio, magnésio e potássio) e macronutrientes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostragem

Para o presente estudo o tamanho da amostra foi determinado de acordo com a estimativa da proporção de indivíduos negros não-hispânicos com alelo G observada na literatura (11 %) (YANG et al., 2010), sendo considerados grau de confiança de 95 % e erro amostral de 5 %. Desse modo, foi estimado o total de 148 indivíduos com DM2. No entanto, os resultados apresentados contemplam uma amostra de 110 voluntários com DM2, ambos os sexos, com idade entre 19 e 59 anos, residentes no estado de Sergipe, assistidos pela rede pública de saúde.

Foram adotados os seguintes critérios de exclusão: o uso de fumo e de bebida alcoólica de forma regular; utilização de suplementos vitamínico-mineral; presença das seguintes doenças crônicas não transmissíveis: artrite reumatoide, câncer, insuficiência renal crônica e disfunções da tireoide; presença de processo infeccioso e inflamatório agudo autorreferido, tais como gripes e infecção urinária. Os critérios de exclusão foram escolhidos devido a capacidade desses de alterar as concentrações séricas de zinco.

A fim de obter informações socioeconômicas, histórico familiar para doenças crônicas não transmissíveis, uso de medicamentos e presença de doenças, um questionário foi aplicado (Apêndice A).

4.2 Aspectos éticos

Os participantes foram instruídos acerca dos procedimentos aos quais foram submetidos, o destino do material biológico coletado e a demanda de tempo necessária para a realização do estudo, tal como sobre o direito de desligar-se da pesquisa em qualquer momento, sem constrangimentos.

Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice B), que descreve as informações sobre o projeto, de acordo com a Resolução CNS nº 466/2012, itens III, IV e V que tratam da proteção dos participantes e orienta procedimentos referentes às pesquisas que necessitam de experiências com humanos.

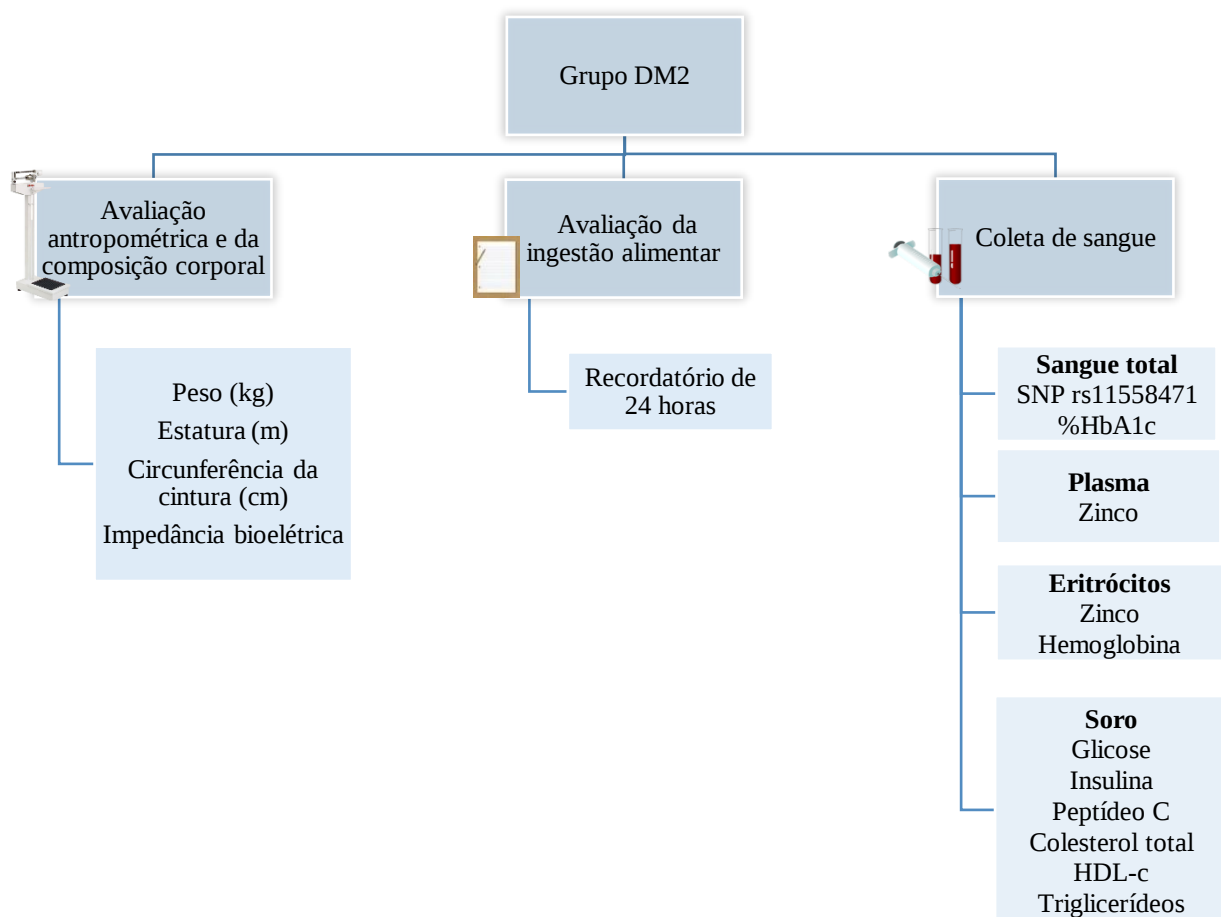
Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Sergipe – UFS com número do parecer 1.370.831 (Anexo A).

4.3 Protocolo experimental

Estudo do tipo transversal e observacional, no qual os participantes foram submetidos a uma coleta de sangue, avaliação antropométrica (peso, estatura, circunferência da cintura e impedância bioelétrica) e da ingestão alimentar de macro e micronutrientes (Figura 3). A coleta de sangue foi realizada por um profissional especializado em enfermagem.

O material biológico foi analisado para caracterizar os indivíduos com DM2 quanto à presença do polimorfismo estudado, estado nutricional relativo ao zinco e marcadores glicêmicos, insulinêmicos e lipídicos.

Figura 3 – Fluxograma das atividades realizadas na pesquisa.



4.4 Avaliação antropométrica

4.4.1 Peso

A aferição do peso foi realizada utilizando balança (Welmy® modelo W 200/5, São Paulo, Brasil) com precisão de 0,05 gramas. Os participantes foram posicionados no centro da balança, sem calçados, usando a menor quantidade de roupa possível, em posição ereta e com os braços estendidos ao longo do corpo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

4.4.2 Estatura

A estatura dos participantes foi mensurada utilizando estadiômetro portátil (Altuxata®, Minas Gerais, Brasil), estando os participantes descalços, na posição ortostática, pernas e pés paralelos, braços estendidos ao longo do corpo e cabeça posicionada no plano de Frankfurt (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

4.4.3 Índice de massa corpórea (IMC)

O IMC foi calculado dividindo-se o peso atual pela estatura ao quadrado, sendo o peso aferido em quilogramas e a altura em metros. O resultado foi analisado de acordo com a classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000), sendo considerados com excesso de peso os indivíduos com $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$.

4.4.4 Circunferência da cintura

A circunferência da cintura foi mensurada com o indivíduo em posição ortostática, com os pés juntos e braços estendidos ao longo do corpo, utilizando uma fita métrica não-extensível (Cescorf®, Porto Alegre, Brasil) posicionada no ponto médio entre a última costela flutuante e o topo da crista ilíaca. A leitura foi realizada no momento da expiração.

Foram considerados em risco para doenças cardiovasculares indivíduos com valores de circunferência da cintura a partir de 80 cm para mulheres e 94 cm para homens, de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

4.4.5 Impedância bioelétrica

A impedância bioelétrica foi realizada com os indivíduos deitados, em decúbito dorsal, com as pernas e os braços afastados do corpo, com aparelho da Biodynamics® (modelo 310, São Paulo, Brasil). Após a limpeza da pele, dois eletrodos (um distal e outro proximal) foram colocados no pé direito: o eletrodo distal na base do dedo médio e o eletrodo proximal um pouco acima da linha da articulação do tornozelo, entre os maléolos medial e lateral da tíbia; e dois na mão direita: o eletrodo distal na base do dedo médio e o eletrodo proximal um pouco acima da linha da articulação do punho, coincidindo com o processo estilóide.

Os participantes foram orientados a, no dia anterior ao exame, não ingerir bebidas alcoólicas, não realizar exercícios físicos intensos e não consumir refrigerantes, café, chás, chocolates. Mulheres em período menstrual não realizaram o exame.

4.5 Coleta de material biológico, análises bioquímicas e genotipagem

4.5.1 Controle de contaminação

Todo o material utilizado (vidrarias, plásticos, ponteiras, tubos, etc.) para análises de zinco foram desmineralizados em banho de ácido nítrico a 20 %, por no mínimo 12 horas, e enxaguados 10 vezes com água deionizada. O material utilizado nas demais determinações foram esterilizados e livre de contaminações (DNase *free*).

4.5.2 Sangue

Um total de 15 mL de sangue foi coletado dos participantes (em jejum de 10 horas) com o auxílio de seringas estéreis e descartáveis. Desse total, 8 mL foram transferidos para tubos de plástico desmineralizados contendo o anticoagulante citrato de sódio a 30 % para análises de zinco; 2 mL foram colocados em tubos contendo EDTA para análise do SNP rs11558471 no gene do ZnT8 e do %HbA1c; e 5 mL foram coletados em tubos sem anticoagulantes para obtenção do soro utilizado nas análises de glicose em jejum, peptídeo C, insulina em jejum, colesterol total, HDL-c e triglicerídeos.

O plasma e soro foram separados do sangue total por centrifugação a 3000 rpm, durante 15 minutos, a uma temperatura de 4 °C. A massa eritrocitária foi obtida após a lavagem com adição de 5 mL de solução de NaCl a 0,9 % e subsequente centrifugação a 10.000 rpm, por 10

minutos a 4 °C, sendo esse procedimento repetido por 3 vezes. As amostras utilizadas para a determinação de zinco foram acondicionadas a -20 °C e as demais a -80 °C até o momento das análises.

4.5.3 Determinação do SNP rs11558471 no gene do ZnT8

A extração de DNA foi realizada com o kit PureLink® – Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação da concentração de DNA ocorreu por meio de leitura em espectrofotômetro (Nanodrop®) nos comprimentos de onda (λ) 260 nm (RNA) e 280 nm (proteína). O DNA foi considerado íntegro e de boa qualidade quando a razão das absorbâncias foi superior a 1,8 e inferior a 2,0 (SAMBROOK; GETTING, 1989). Os resultados foram obtidos em ng/ μ L.

A genotipagem dos participantes em relação ao SNP rs11558471 no gene do ZnT8 foi realizada pelo sistema *TaqMan SNP Genotyping Assays*® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), conforme as instruções do fabricante. Este sistema é baseado na análise *end-point* da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) com *primers* e sondas específicas para o SNP. Esta análise foi realizada em uniplicata, em placas específicas de 48 poços no equipamento *StepOne Real-Time PCR System*® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

As placas foram preparadas com um volume final de 25 μ L em cada poço, sendo 13,75 μ L de mistura de reação e 11,25 μ L de amostra de DNA diluída em água nanopura autoclavada ([] final de DNAg igual a 20 ng/ μ L). Os ensaios foram realizados de acordo com as seguintes etapas: 1) ativação enzimática a 95 °C por 10 minutos; 2) PCR em 40 ciclos, que consiste no processo de desnaturação do DNA a uma temperatura de 92 °C por 15 segundos e anelamento do *primer* à sequência de DNA a ser amplificada; 3) reação de extensão realizada a 60 °C por 1 minuto.

Os indivíduos foram classificados em três grupos de acordo com o genótipo apresentado: 1) homozigotos com alelos de referência (AA), 2) heterozigotos com alelo polimórfico (AG), 3) homozigotos com alelos polimórficos (GG).

4.5.4 Determinação da concentração de zinco no plasma e eritrócitos

A determinação da concentração de zinco foi realizada por meio do método espectrometria de absorção atômica de chama (FAAS). As amostras foram digeridas a 150 °C

em bloco digestor, conforme proposto por Lu et al. (2015), por duas horas, sendo utilizados 0,5 mL de amostra, 2 mL de ácido nítrico puro e 3 mL de água nanopura. Após a digestão, as amostras foram diluídas em água nanopura para um volume final de 15 mL. Ainda, foram preparados brancos das amostras para cada digestão sob as mesmas condições de análises citadas.

Como padrão para análise de zinco foi utilizado o SpecSol® (Quimlab®, São Paulo, Brasil), utilizando uma curva padrão nas seguintes concentrações: 0,0; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,5 µg/mL, diluídas em solução de ácido nítrico a 5 %. O controle da metodologia foi avaliado pelo material de referência certificado SERONORM® (*Whole blood*), o qual foi preparado conforme os mesmos procedimentos de preparo e diluição das amostras. A leitura da concentração de zinco foi realizada em um Espectrofotometro de Absorção Atômica de Chama (Varian AA240FS®, Califórnia, EUA) nas seguintes condições: lampada de cátodo oco específica (5 mA), λ : 213,9 nm, fenda de 1 nm; tempo de leitura de 5 segundos e chama alimentada com ar/acetileno (fluxo de 13,5 L/min e 2 L/min, respectivamente). A análise foi realizada em duplicata, sendo obtidas três leituras de cada duplicata.

Somado às análises anteriores, foi determinada a concentração de hemoglobina nos eritrócitos para a correção dos valores de zinco nessas células. A análise seguiu a metodologia de cianeto de hemoglobina (HiCN) (Labtest®, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil) e foi realizada em analisador bioquímico semiautomático (BIO-2000, Bioplus®, São Paulo, Brasil).

Os resultados foram expressos em µg/dL para as concentrações de zinco no plasma e em µgZn/g Hb para zinco nos eritrócitos. Foram consideradas adequadas as concentrações plasmáticas de zinco de 70 a 110 µg/dL (GIBSON, 2005) e para as concentrações de zinco nos eritrócitos de 40 a 44 µgZn/g Hb (GUTHRIE; PICCIANO, 1994).

4.5.5 Determinação das variáveis glicêmicas e lipídicas

As determinações das concentrações séricas de glicose em jejum, colesterol total (CT), HDL-c e triglicérides (TG) foram realizadas por meio de método colorimétrico utilizando kits comerciais (Labtest®, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil) em um analisador bioquímico automático (CMD 800i, Wiener Lab Group®, Rosario, Argentina). O %HbA1c foi determinado no mesmo aparelho utilizando o método de inibição imunoturbidimétrica (Wiener Lab Group®, Rosario, Argentina).

Quanto a análise dos valores séricos de insulina, foi empregado o método de quimioluminescência (Abbott®, Illinois, EUA) e a quantificação realizada em um analisador de

imunoensaio (Architect i1000_{SR}, Illinois, EUA). As concentrações de peptídeo C foram mensuradas por quimioluminescência.

O valor da fração de LDL-c foi obtida por meio da seguinte fórmula matemática: $LDL-c = (CT - HDL-c) - (TG/5)$ (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972). Os pontos de corte adotados no presente estudo encontram-se no Quadro 2.

Quadro 2 – Pontos de corte adotados para avaliação dos indivíduos incluídos no presente estudo.

Variáveis	Valores desejáveis	Referência
Glicose em jejum*	< 154 mg/dL	American Diabetes Association (2018c)
%HbA1c*	< 7 %	
Colesterol total	< 190 mg/dL	Sociedade Brasileira de Cardiologia (2017)
Triglicerídeos	< 150 mg/dL	
HDL-c	Homens > 40 mg/dL Mulheres > 50 mg/dL	
LDL-c	< 150 mg/dL	

* Alvo terapêutico para o controle da DM2. Não foram adotados pontos de corte para insulina sérica e peptídeo C visto esses valores terem sido utilizados para comparação entre grupos.

4.5.6 Índice de resistência à insulina (homeostasis model assessment – HOMA)

O HOMA foi mensurado a partir dos valores de glicose em jejum e peptídeo C por meio da calculadora de HOMA[®] (versão 2.2.3), disponibilizada pela *Diabetes Trials Unit University of Oxford*. A calculadora é baseada no modelo de HOMA atualizado (HOMA2), publicado por Levy et al. (1998), que consiste em um modelo computacional que permite a dedução da função das células β (% β) e da sensibilidade a insulina (%S). Não foram adotados pontos de corte para essa variável.

4.6 Avaliação da ingestão alimentar

Para avaliação da ingestão alimentar foi utilizado o método do recordatório alimentar de 24 horas (R24h) aplicados em três dias não consecutivos, sendo dois dias referentes a semana e um dia do final de semana. Os recordatórios foram aplicados presencialmente e por ligação telefônica baseando-se no *Multiple Pass Method* (GUENTHER et al., 1995).

A análise dos alimentos consumidos foi realizada no *software* NutWin, do Departamento de Informática da Escola Paulista de Medicina/UNIFESP, no qual consta a Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos (TACO), a Tabela de Composição Nutricional dos Alimentos Consumidos no Brasil 2011, a tabela da USDA e dados fornecidos por rótulos de fabricantes.

A prevalência de inadequação do grupo na ingestão alimentar de micronutrientes (zinco, cálcio e magnésio) foi avaliada de acordo com os valores de EAR (*Estimated Average Requirement*) propostos pelo *Dietary Reference Intakes*, sendo considerados o sexo e a faixa etária dos indivíduos (INSTITUTE OF MEDICINE, 2006, 2011). Para isso, foi calculado o *Z-score* do grupo a partir da diferença entre o valor de EAR correspondente a cada nutriente e a média de ingestão do grupo, sendo o resultado dividido pelo desvio padrão da ingestão (FISBERG et al., 2005). Com relação ao potássio, devido a inexistência de valor de EAR estabelecido, foi observado o percentual de indivíduos que apresentaram ingestão habitual abaixo do valor de AI (*Adequate Intake*) (INSTITUTE OF MEDICINE, 2006).

4.7 Avaliação estatística

A homogeneidade de todos os dados foi avaliada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. A análise descritiva foi realizada de acordo com a distribuição dos dados sendo calculadas medidas de tendência central (médias), de dispersão (desvio padrão), frequências absoluta e relativa. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado por meio do teste qui-quadrado para avaliar a distribuição genotípica dos indivíduos.

Os dados foram distribuídos pelo genótipos (SNP rs11558471 no gene do ZnT8) e as variáveis contínuas homogêneas estudadas foram analisadas pelo teste de variância unidirecional (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey. No entanto, para os dados não homogêneos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Mann-Whitney. Para os dados categóricos foi aplicado o teste do Qui-Quadrado.

Além disso, também foi aplicado o teste de correlação de Pearson entre as variáveis estudadas. A partir desses resultados, considerando as variáveis com $p \leq 0,20$ foram criados modelos de regressão linear múltipla e regressão logística binária, por meio do método *enter*, utilizando como variáveis de ajuste sexo, idade e tempo de diagnóstico da DM2. No modelo de regressão logística binária, as variáveis dicotômicas foram classificadas em risco de acordo com os critérios apresentados a seguir: %HbA1c > 7 % (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018c), genótipo AA, concentração de zinco nos eritrócitos < 40 µgZn/g Hb (GUTHRIE; PICCIANO, 1994), concentrações de zinco no plasma < 70 µg/dL (GIBSON, 2005) e ingestão de zinco < EAR (INSTITUTE OF MEDICINE, 2006).

A identificação dos participantes com relato impreciso da ingestão energética foi realizada utilizando a metodologia proposta por McCrory et al. (2002) a partir da razão entre a

ingestão energética relatada e o gasto energético total predito utilizando a equação de Vinken et al. (1999), considerando o ponto de corte de ± 1 desvio padrão.

A ingestão dietética habitual foi calculada pelo *Multiple Source Method* (MSM), utilizando a plataforma online (DIfE, 2012). O MSM consiste em um processo de três etapas, nas quais, é estimada a probabilidade de ingestão individual de cada nutriente, seguido do cálculo da ingestão habitual individual de cada nutriente nos dias de consumo e, por fim, multiplicado os valores obtidos nos passos anteriores para obter a ingestão diária habitual individual. Indivíduos com dados de ingestão alimentar incompletos (apenas um R24h) foram excluídos dessa análise. Os valores de ingestão de micronutrientes foram ajustados pela energia, segundo o método residual proposto por Willett et al. (1997).

Os indivíduos foram agrupados de acordo com as similaridades dos valores da ingestão dietética habitual de quatro micronutrientes com ação no metabolismo glicêmico (zinco, potássio, cálcio e magnésio). Para isso, foi utilizada a análise hierárquica de dados, empregando o método de Ward a partir da distância Euclidiana quadrada. A diferença entre os dois *clusters* (grupos) formados foi avaliada pelo teste t de Student para amostras independentes ou teste de Mann-Whitney, de acordo com a distribuição dos dados.

Um modelo de regressão logística binária foi utilizado a fim de avaliar a probabilidade de descontrole glicêmico frente a ingestão conjunta dos quatro micronutrientes acima selecionados. Desse modo, o *cluster* com menor ingestão foi considerado de risco para alterações no %HbA1c, sendo valores percentuais de hemoglobina glicada acima de sete considerados descontrole glicêmico, de acordo com a *American Diabetes Association* (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018c). Para avaliar o efeito da ingestão individual de zinco, potássio, cálcio e magnésio sob o %HbA1c, modelos de regressão linear foram testados utilizando o %HbA1c como variável dependente. Ambos os modelos de regressão seguiram o método enter, precedidas do teste de correlação de Pearson para a escolha das variáveis a serem incluídas ($p < 0,20$). Foram utilizadas como variáveis de ajuste o sexo, a idade e o tempo de diagnóstico da DM2.

Foram adotados níveis de significância menor que 5 % para valores estatisticamente significativos e de 5 a 10 % para valores marginalmente significativos (GRANATO; CALADO; JARVIS, 2014). Para todas as análises foi utilizado o *software* SPSS (Versão 17.0).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da população estudada e a relação do SNP rs11558471 com as demais variáveis analisadas

Um total de 110 indivíduos com DM2 foi avaliado, com média de idade de $48,3 \pm 8,2$ anos, sendo 67,3 % do sexo feminino. A maior parte dos indivíduos encontrava-se com excesso de peso (80,9 %), sendo a média de IMC e percentual de gordura corporal de $30,4 \pm 6,9 \text{ kg/m}^2$ e $35,0 \pm 7,8 \%$, respectivamente. Além disso, 84,5 % dos indivíduos encontravam-se em risco aumentado para doenças metabólicas associadas à obesidade de acordo com a medida da circunferência da cintura.

Os indivíduos avaliados apresentaram controle glicêmico deficiente, observado pelos valores médios de glicose em jejum e %HbA1c superiores aos pontos de corte para controle da doença (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018c). Além disso, a concentração de glicose em jejum correlacionou-se com insulina ($r = -0,316$; $p = 0,001$), %HbA1c ($r = 0,769$; $p < 0,001$), HOMA2-IR ($r = 0,614$; $p < 0,001$), HOMA2-%B ($r = -0,747$; $p < 0,001$) e HOMA2-%S ($r = -0,527$; $p < 0,001$).

Quanto às variáveis do perfil lipídico, 85,5 % dos indivíduos apresentaram dislipidemias. As características clínicas dos indivíduos com DM2 incluídos no estudo estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Variáveis clínicas e bioquímicas dos indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2).
(Continua)

Variáveis	DM2 (n = 110)
Idade, anos	$48,3 \pm 8,2$
Sexo	
Homens, n (%)	36 (32,7)
Mulheres, n (%)	74 (67,3)
Tempo de diagnóstico ¹ , anos	$6,9 \pm 6,0$
Uso de medicamentos ²	
Biguanidas, n (%)	68 (63)
Sulfoniluréias, n (%)	34 (31,5)
Outros hipoglicemiantes, n (%)	9 (8,3)
Anti-hipertensivos, n (%)	54 (50)
Uso de insulina, n (%)	23 (20,9)
Peso, kg	$79,6 \pm 20,4$
IMC, kg/m^2	$30,4 \pm 6,9$
Massa gorda ² , %	$35,0 \pm 7,8$

Tabela 2 - Variáveis clínicas e bioquímicas dos indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2).
(Conclusão)

Variáveis	DM2 (n = 110)
Circunferência da cintura, cm	100,0 ± 15,8
Homens, n (%)	
< 94 cm	9 (25)
≥ 94 cm	27 (75)
Mulheres, n (%)	
< 80 cm	8 (10,8)
≥ 80 cm	66 (89,2)
Glicose em jejum, mg/dL	178,2 ± 85,0
Hb1Ac (%)	8,1 ± 2,3
Insulina, µU/mL	13,4 ± 12,7
Peptideo C, ng/mL	2,7 ± 0,9
HOMA2-%B	78,3 ± 57,2
HOMA2-%S	43,3 ± 21,1
HOMA2-IR	3,3 ± 2,9
Colesterol total, mg/dL	192,9 ± 46,9
HDL-c, mg/dL	41,4 ± 10,5
LDL-c, mg/dL	117,1 ± 40,2
Triglicerídeos, mg/dL	172,3 ± 117,1
Zinco plasmático ³ , µg/dL	63,3 ± 29,0
Zinco eritrocitário ³ , µgZn/g Hb	34,7 ± 8,4
Zinco dietético ⁴ , mg/dia	5,2 ± 1,5

Resultados apresentados em média ± desvio padrão, frequências absoluta e relativa; ¹ n = 106; ² n = 108; ³ n = 105; ⁴ n = 95. Alvo terapêutico para o controle da DM2: %HbA1c < 7 % e Glicose em jejum < 154 mg/dL (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018c); Valor de referência: Colesterol total < 190 mg/dL, HDL-c > 40 mg/dL para homens e > 50 mg/dL para mulheres, LDL-c < 150 mg/dL e Triglicerídeos < 150 mg/dL (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2017); concentração de zinco no plasma: 70 a 110 µg/dL (GIBSON, 2005); concentração de zinco nos eritrócitos: 40 a 44 µgZn/g Hb (GUTHRIE; PICCIANO, 1994); EAR: 9,4 mg/dia (homens) e 6,8 mg/dia (mulheres) (IOM, 2006).

Observou-se que os indivíduos avaliados apresentaram elevada prevalência de deficiência de zinco, conforme verificado pelas concentrações plasmáticas (68,3 %) e eritrocitárias (72,4 %) abaixo dos valores de referência adotados (GIBSON, 2005; GUTHRIE; PICCIANO, 1994). Ao correlacionar as concentrações de zinco plasmáticas e eritrocitárias com as variáveis do metabolismo glicêmico, insulinêmico e lipídico não foram observadas diferenças estatísticas (dados não apresentados).

A partir do ensaio de genotipagem do SNP rs11558471 no gene do ZnT8 foram identificados 65,5 % de indivíduos homozigotos selvagem (AA), 22,7 % heterozigotos com alelo variante (AG) e 11,8 % homozigotos variantes (GG). A população avaliada não se apresentou em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 3).

Tabela 3 – Frequência genotípica observada e frequência esperada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg para o SNP rs11558471 no gene do ZnT8 dos indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2.

Genótipos	Observado		Esperado	
	n	%	n	%
AA	72	65,5	65	59,0
AG	25	22,7	39	35,5
GG	13	11,8	6	5,5
Total	110	100	110	100

Teste qui-quadrado = 14,4; Graus de liberdade = 3,84; *P* valor = 0,003.

Ao avaliar os indivíduos de acordo com o genótipo apresentado, foram observadas diferenças marginalmente significativas nos valores de HOMA2-%B entre os indivíduos com genótipo selvagem (AA) e os indivíduos com a presença do alelo polimórfico (AG e GG) (Tabela 4). Com relação as demais variáveis clínicas, bioquímicas e do estado nutricional relativo ao zinco, não foram observadas diferenças entre os grupos.

Tabela 4 - Variáveis clínicas, bioquímicas e do estado nutricional relativo ao zinco dos indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) distribuídos conforme o genótipo do SNP rs11558471 no gene do ZnT8.

(Continua)

Variáveis	AA (n = 72)	AG (n = 25)	GG (n = 13)	P valor
Idade, anos	48,0 ± 8,4	49,0 ± 7,5	49,0 ± 9,1	0,740 [¥]
Sexo				
Homens, n (%)	24 (33,3)	7 (28)	5 (38,5)	0,795 [€]
Mulheres, n (%)	48 (66,7)	18 (72)	8 (61,5)	
Tempo de diagnóstico ¹ , anos	6,4 ± 5,6	8,2 ± 7,3	7,5 ± 5,4	0,333 [¥]
IMC, kg/m ²	30,9 ± 7,2	29,9 ± 7,3	28,8 ± 4,1	0,557
Circunferência da cintura, cm	100,3 ± 16,4	99,6 ± 16,6	99,1 ± 10,6	0,958
Massa gorda ² , %	35,3 ± 8,0	34,3 ± 7,7	34,2 ± 7,8	0,809
Colesterol total, mg/dL	193,8 ± 46,2	188,7 ± 42,6	196,2 ± 60,3	0,868
HDL-c, mg/dL	41,9 ± 9,2	39,4 ± 10,1	42,2 ± 17,1	0,579
LDL-c, mg/dL	117,3 ± 39,7	117,0 ± 34,8	115,9 ± 54,0	0,993
Triglicerídeos, mg/dL	172,8 ± 128,5	161,4 ± 94,0	190,8 ± 92,7	0,766
%Hb1Ac	8,0 ± 2,4	8,2 ± 2,0	8,7 ± 1,7	0,537
Peptídeo C, ng/mL	2,8 ± 0,9	2,5 ± 0,8	2,7 ± 0,8	0,394
Glicose em jejum, mg/dL	168,1 ± 79,8	192,3 ± 86,3	206,6 ± 105,6	0,285 [¥]
Insulina, µU/mL	14,5 ± 14,8	12,1 ± 7,4	9,7 ± 5,7	0,483 [¥]

Tabela 4 - Variáveis clínicas, bioquímicas e do estado nutricional relativo ao zinco dos indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) distribuídos conforme o genótipo do SNP rs11558471 no gene do ZnT8.

(Conclusão)

Variáveis	AA (n = 72)	AG (n = 25)	GG (n = 13)	P valor
HOMA2-%B	87,8 ± 60,9 ^a	59,2 ± 40,6 ^b	62,0 ± 54,0 ^b	0,058 [¥]
HOMA2-%S	42,7 ± 20,1	46,2 ± 23,7	41,5 ± 22,3	0,733
HOMA2-IR	3,3 ± 2,8	3,0 ± 2,5	3,7 ± 4,2	0,890 [¥]
Zinco plasmático ³ , µg/dL	64,4 ± 33,5	65,2 ± 19,1	52,4 ± 12,8	0,391
Zinco eritrocitário ³ , µgZn/g Hb	34,6 ± 8,7	36,2 ± 7,7	32,3 ± 8,6	0,419
Zinco dietético ⁴ , mg/dia	5,2 ± 1,6	5,3 ± 1,6	5,0 ± 0,1	0,862

Resultados apresentados em média ± desvio padrão, frequências absoluta e relativa; ¹ AA (n = 69), AG (n = 24); ² AA (n = 71), AG (n = 24); ³ AA (n = 68), GG (n = 12); ⁴ AA (n = 62), AG (n = 21), GG (n = 12). *P* valor < 0,05 foi considerado significativo; *P* valor entre 0,05 e 0,1 foi considerado marginalmente significativo; Comparação entre os grupos realizada por análise de variância univariada (ANOVA), seguido de teste de Tukey e [¥] Teste de Kruskal-wallis, seguido por teste de Mann-whitney para dados contínuos, e [€] Teste do Qui-Quadrado para os dados categóricos; Letras diferentes em uma mesma linha representa diferença entre os grupos; Hb: hemoglobina; Alvo terapêutico para o controle da DM2: %HbA1c < 7 % e Glicose em jejum < 154 mg/dL (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018c); Valor de referência: Colesterol total < 190 mg/dL, HDL-c > 40 mg/dL para homens e > 50 mg/dL para mulheres, LDL-c < 150 mg/dL e Triglicerídeos < 150 mg/dL (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2017); concentração de zinco no plasma: 70 a 110 µg/dL (GIBSON, 2005); concentração de zinco nos eritrócitos: 40 a 44 µgZn/g Hb (GUTHRIE; PICCIANO, 1994).

A redução no percentual de função de células β (HOMA2-%B) foi associada com as variações do SNP rs11558471, sendo dependentes do sexo e da concentração de peptídeo C e independentes da idade e do tempo de diagnóstico na população estudada, conforme observada pelo modelo de regressão linear múltipla (Tabela 5).

Tabela 5 - Modelo de regressão linear múltipla entre HOMA-B% (variável dependente) e as variáveis da concentração de peptídeo C e o genótipo do ZnT8 em indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2).

Variáveis independentes		β (IC 95%)	P valor	r ² ajustado
HOMA-%B	Idade (anos)	-0,020 (-1,229;1,507)	0,841	0,163
	Sexo [§]	-0,191 (-45,287;-0,881)	0,042	
	Tempo de diagnóstico (anos)	-0,123 (-2,975;0,631)	0,200	
	Peptídeo C (ng/mL)	0,243 (3,710;29,035)	0,012	
	SNP rs11558471 [§]	-0,185 (-29,850;-0,136)	0,048	

P valor < 0,05 foi considerado significativo; *P* valor do modelo: 0,003; Variáveis incluídas no modelo no formato contínuo e no [§] formato dicotômico; Modelo ajustado por sexo, idade e tempo de diagnóstico.

A presença do genótipo AA (alelo de risco) e o tempo de diagnóstico de DM2 mostraram-se preditores de alterações do %HbA1c, aumentando a chance em três vezes e uma vez a alteração dessa variável, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6 - Modelo de regressão logística binária do percentual de hemoglobina glicada (%HbA1c), variáveis do estado nutricional relativo ao zinco e SNP rs11558471 no gene do ZnT8 em indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2).

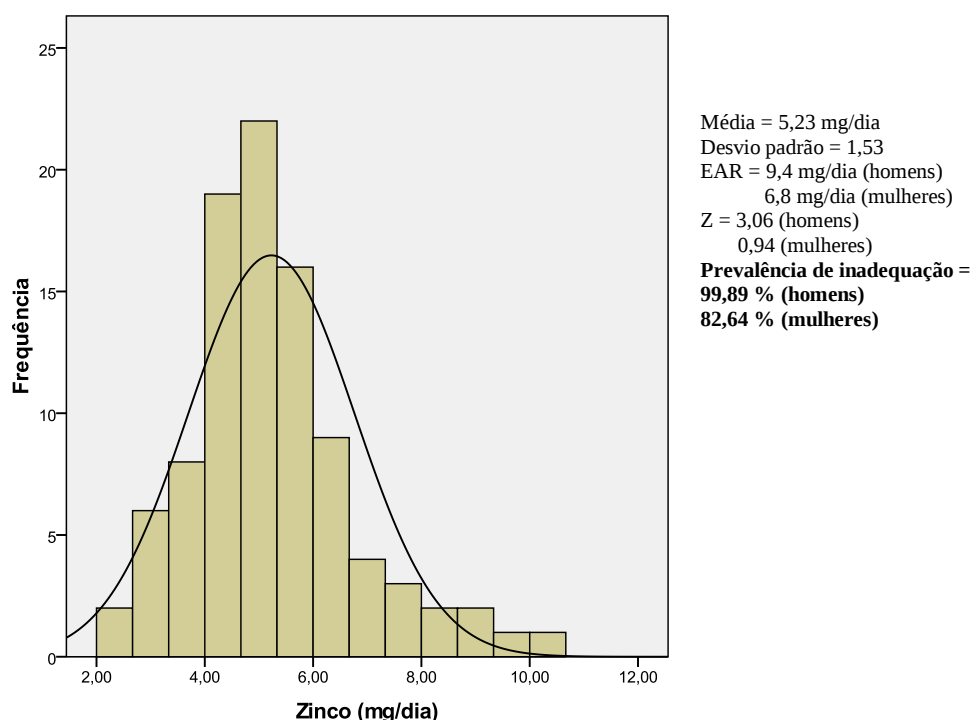
Variável dependente	Co-variáveis	OR (IC 95%)	P valor
%Hb1Ac	Idade (anos) [§]	0,987 (0,929;1,049)	0,672
	Sexo	0,564 (0,197;1,620)	0,288
	Tempo de diagnóstico (anos) [§]	1,134 (1,026;1,254)	0,014
	SNP rs11558471	3,263 (1,154;9,229)	0,026
	Zinco eritrócitos	1,890 (0,737;4,848)	0,185
	Zinco plasma	0,908 (0,346;2,382)	0,844
	Zinco dietético	1,252 (0,223;7,037)	0,798

P valor < 0,05 foi considerado significativo; *P* valor do modelo: 0,013 e r^2 : 0,240; [§]Variáveis incluídas no modelo no formato contínuo; Demais variáveis incluídas no modelo no formato dicotômico; Modelo ajustado por sexo, idade e tempo de diagnóstico; Classificação de risco utilizada: %HbA1c > 7 % (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018c), genótipo AA, concentração de zinco nos eritrócitos < 40 µgZn/g Hb (GUTHRIE; PICCIANO, 1994), concentração de zinco no plasma < 70 µg/dL (GIBSON, 2005), ingestão dietética de zinco < EAR (INSTITUTE OF MEDICINE, 2006); OR: Odds ratio.

5.2 Ingestão alimentar habitual de micronutrientes e sua relação com o controle glicêmico

Para a análise da ingestão alimentar habitual de micronutrientes foram considerados 102 indivíduos com DM2. Após a exclusão dos indivíduos com dados de ingestão alimentar incompletos, foram incluídos na análise 95 indivíduos. A prevalência de sub-relatores da ingestão energética foi de 84,2 %. Foi observada prevalência de inadequação na ingestão alimentar de zinco de 99,89 % no sexo masculino e 82,64 % no sexo feminino (Figura 4).

Figura 4 – Histograma da ingestão ajustada de zinco e prevalência de inadequação da ingestão para o grupo de indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2 (n = 95).



A prevalência de inadequação no consumo de magnésio para o sexo masculino e feminino foi de 96,41 % e 74,86 %, respectivamente (Figura 5). Ao avaliar a ingestão alimentar de cálcio, observou-se continuidade na alta prevalência de inadequação, tendo o grupo apresentado o percentual de inadequação de 95,45 % (Figura 6).

Figura 5 - Histograma da ingestão ajustada de magnésio e prevalência de inadequação da ingestão para o grupo de indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2 (n = 95).

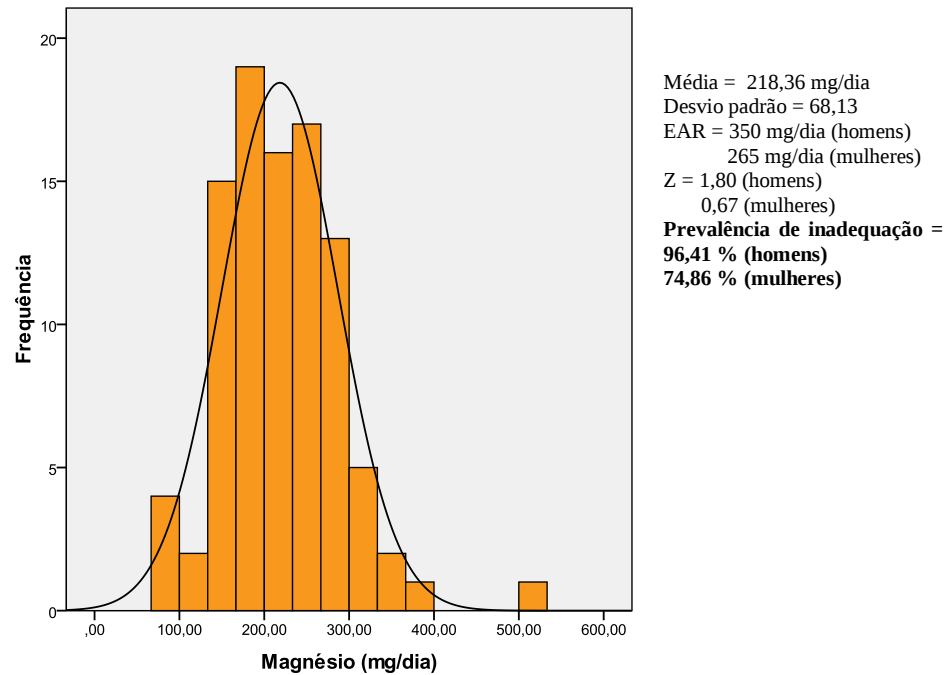
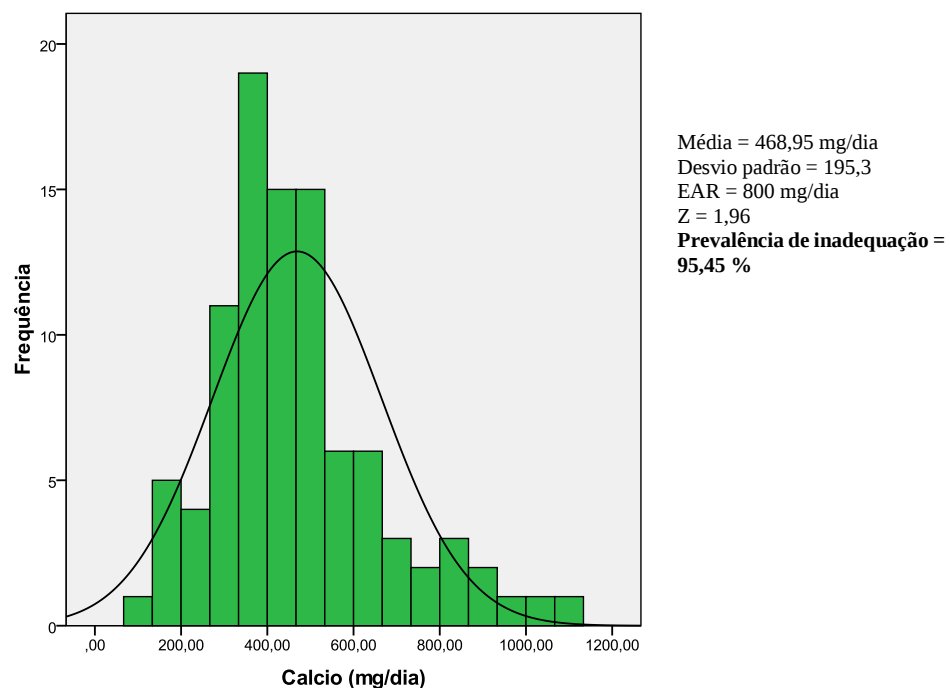
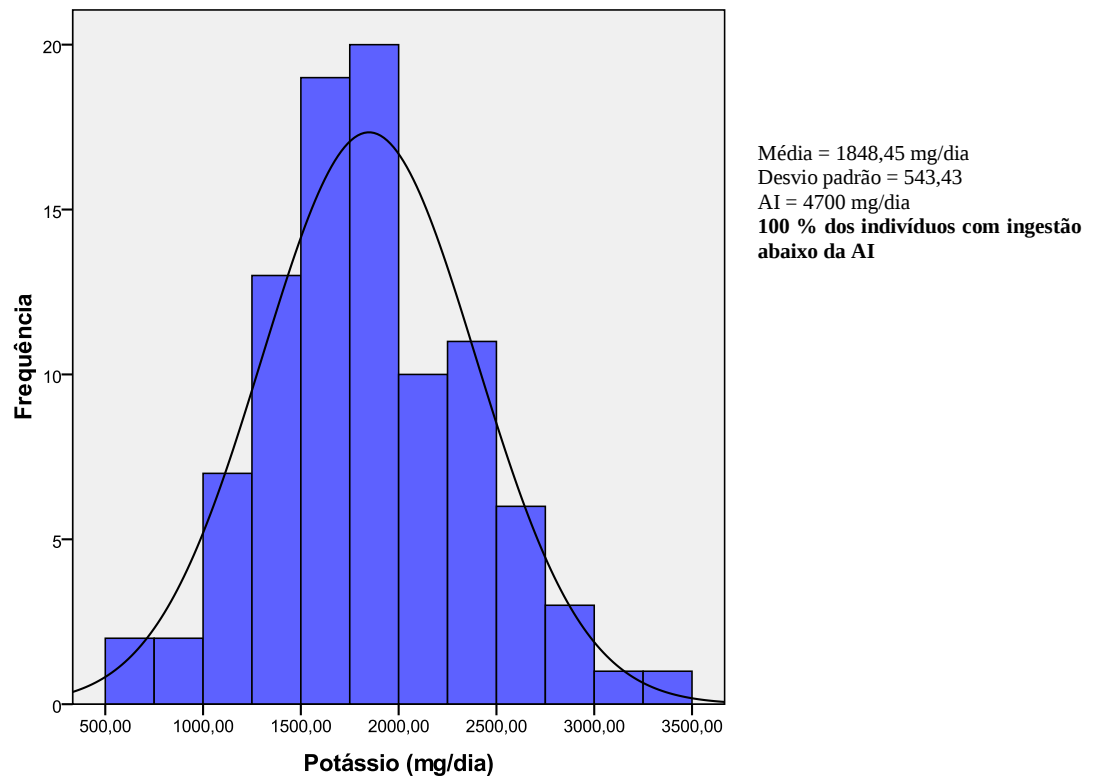


Figura 6- Histograma da ingestão ajustada de cálcio e prevalência de inadequação da ingestão para o grupo de indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2 (n = 95).



Com relação ao potássio, 100 % dos indivíduos avaliados apresentaram ingestão abaixo do valor adotado como AI (Figura 7).

Figura 7 - Histograma da ingestão ajustada de potássio para o grupo de indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2 (n = 95).



Ao avaliar os indivíduos pelas similaridades na ingestão dietética habitual dos minerais com ação no metabolismo glicêmico (zinco, potássio, cálcio e magnésio), observou-se que o grupo com os menores valores de ingestão (*Cluster 1*) apresentou maior %HbA1c quando comparado ao grupo com maior ingestão (*Cluster 2*) desses nutrientes ($p = 0,006$). Em adição, o *Cluster 1* também apresentou maior concentração sérica de triglicerídeos ($p = 0,010$). As demais variáveis não apresentaram diferenças entre os grupos (Tabela 7).

Tabela 7 - Variáveis clínicas, bioquímicas e de ingestão de nutrientes dos indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) de acordo como os *clusters* definidos a partir da ingestão dos micronutrientes (zinco, potássio, cálcio e magnésio).

Variáveis	Cluster 1 (n=65)	Cluster 2 (n=30)	P valor
Idade, anos	48,6 ± 8,6	48,9 ± 7,9	0,866 [¥]
Tempo de diagnóstico, anos	7,2 ± 6,4	7,4 ± 6,0	0,909
IMC, kg/m ²	30,4 ± 6,9	29,9 ± 6,7	0,762 [¥]
Circunferência da cintura, cm	100,8 ± 13,7	97,7 ± 15,5	0,332
Massa gorda, %	34,6 ± 8,0	35,8 ± 7,8	0,483
Colesterol total, mg/dL	198,8 ± 49,7	181,5 ± 40,0	0,097
HDL-c, mg/dL	41,9 ± 10,5	39,2 ± 10,3	0,247
LDL-c, mg/dL	117,9 ± 42,2	116,4 ± 34,5	0,867
Triglicerídeos, mg/dL	194,9 ± 131,1	129,6 ± 58,5	0,010
%Hb1Ac	8,3 ± 2,1	7,2 ± 1,7	0,006
Peptídeo C, ng/mL	2,7 ± 0,9	2,7 ± 0,7	0,963
Glicose em jejum, mg/dL	190,3 ± 88,2	158,1 ± 70,7	0,082 [¥]
Insulina, µU/mL	13,2 ± 11,7	15,1 ± 16,8	0,525 [¥]
HOMA2-%B	73,7 ± 59,4	84,0 ± 48,8	0,407 [¥]
Ingestão de energia, kcal/d	1452,3 ± 471,4	1506,3 ± 499,7	0,611
Ingestão de lipídeos, g/d	37,4 ± 15,1	36,5 ± 16,8	0,796
Ingestão de proteína, g/d	80,2 ± 19,7	79,4 ± 21,4	0,856
Ingestão de carboidrato, g/d	203,6 ± 74,1	224,2 ± 71,7	0,207
Ingestão de zinco, mg/d	4,8 ± 1,4	6,1 ± 1,5	<0,001
Ingestão de potássio, mg/d	1556,5 ± 344,3	2480,9 ± 301,4	<0,001
Ingestão de cálcio, mg/d	400,6 ± 136,4	616,9 ± 222,4	<0,001
Ingestão de magnésio, mg/d	191,5 ± 54,2	276,6 ± 58,5	<0,001

Resultados apresentados em média ± desvio padrão; *P* valor < 0,05 foi considerado significativo; Teste t de Student para amostras independentes e [¥] teste de Mann-whitney; Alvo terapêutico para o controle da DM2: %HbA1c < 7 % e Glicose em jejum < 154 mg/dL (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018c); Valor de referência: Colesterol total < 190 mg/dL, HDL-c > 40 mg/dL para homens e > 50 mg/dL para mulheres, LDL-c < 150 mg/dL e Triglicerídeos < 150 mg/dL (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2017).

Considerando a diferença no %HbA1c entre os *Clusters*, um modelo de regressão logística binária foi testado a fim de verificar a probabilidade do %HbA1c encontrar-se acima de 7 % conforme a ingestão dos minerais avaliados (Tabela 8). Neste modelo, o aumento no tempo de diagnóstico (anos) e a menor ingestão dos minerais (*Cluster 1*) apresentam a chance de aumentar em uma vez e três vezes o risco para o aumento do %HbA1c, respectivamente.

Tabela 8 - Modelo de regressão logística binária do percentual de hemoglobina glicada (%HbA1c) e dos *clusters* formados a partir da ingestão de minerais pelos indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2).

Variável dependente	Co-variáveis	OR (IC 95%)	P valor
%Hb1Ac [§]	Idade (anos) [¶]	0,987 (0,931;1,046)	0,661
	Sexo [§]	1,598 (0,580;4,405)	0,365
	Tempo de diagnóstico (anos) [¶]	1,155 (1,043;1,278)	0,005
	Clusters [§]	3,041 (1,131;8,175)	0,028

P valor < 0,05 foi considerado significativo; *P* valor do modelo: 0,003 e r^2 : 0,221; Teste de Hosmer e Lemeshow: 0,591; [§]Variáveis incluídas no modelo no formato dicotômico; [¶]Variáveis incluídas no modelo no formato contínuo; Modelo ajustado por sexo, idade e tempo de diagnóstico; Classificação de risco utilizada: %HbA1c > 7 % (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018c) e *Cluster* com menor ingestão conjunta de zinco, potássio, cálcio e magnésio; OR: *Odds ratio*.

Ao avaliar a predição de cada nutriente em alterar o %HbA1c, observou-se que a ingestão de 1 g de potássio e 100 mg de magnésio por dia reduz em 1 e 0,7 % o %HbA1c, respectivamente. Esses resultados foram dependentes do sexo e do tempo de diagnóstico, conforme apresentado na Tabela 9.

Tabela 9 - Modelos de regressão linear múltipla do percentual de hemoglobina glicada (%HbA1c) (variável dependente) e a ingestão de minerais por indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2).

Variáveis independentes		β (IC 95%)	P valor	r^2 ajustado
Modelo 1 ¹	Idade (anos)	-0,032 (-0,082;0,019)	0,216	0,143
	Sexo [§]	1,069 (0,209;1,930)	0,015	
	Tempo de diagnóstico (anos)	0,117 (0,051;0,183)	0,001	
	Zinco (mg/dia)	-0,017 (-0,283;0,250)	0,902	
Modelo 2 ²	Idade (anos)	-0,028 (-0,077;0,021)	0,259	0,198
	Sexo [§]	0,925 (0,086;1,765)	0,031	
	Tempo de diagnóstico (anos)	1,118 (0,054;0,182)	<0,001	
	Potássio (mg/dia)	-0,001 (-0,002;0,000)	0,017	
Modelo 3 ²	Idade (anos)	-0,029 (-0,079;0,021)	0,253	0,151
	Sexo [§]	1,025 (0,163;1,887)	0,020	
	Tempo de diagnóstico (anos)	0,119 (0,053;0,184)	0,001	
	Cálcio (mg/dia)	-0,001 (-0,003;0,001)	0,377	
Modelo 4 ²	Idade (anos)	-0,031 (0,080;0,017)	0,206	0,201
	Sexo [§]	1,009 (0,177;1,840)	0,018	
	Tempo de diagnóstico (anos)	0,117 (0,053;0,181)	<0,001	
	Magnésio (mg/dia)	-0,007 (-0,012; -0,001)	0,015	

¹ *P* valor do modelo: 0,002; ² *P* valor do modelo: <0,001; Variáveis incluídas nos modelos no formato contínuo e no [§] formato dicotômico; Modelo ajustado por sexo, idade e tempo de diagnóstico.

6 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo realizado com uma amostra da população brasileira com DM2 a determinar a presença do SNP rs11558471 no gene do ZnT8 e associar com marcadores bioquímicos do estado nutricional relativo ao zinco e do metabolismo glicêmico e lipídico. Sabe-se que a presença do genótipo AA no gene dessa proteína aumenta o risco para o desenvolvimento de DM2, no entanto, são escassos os estudos em uma população com a doença já instalada, com vistas ao entendimento da relação com o controle glicêmico.

Visto o ZnT8 ser uma proteína importante para a disponibilidade de zinco nos grânulos secretórios de insulina, a presença de alterações genéticas nesse transportador pode trazer repercussões para a síntese e secreção da insulina (LEFEBVRE et al., 2012; NICOLSON et al., 2009). Estudos realizados em ratos mostraram que a ausência do ZnT8 acarretou redução da tolerância à glicose, devido ao decréscimo da concentração de insulina periférica (FUKUNAKA; FUJITANI, 2018; TAMAKI et al., 2013).

A distribuição genotípica observada no presente estudo para o SNP rs11558471 no gene do ZnT8 foi similar a encontrada em outras populações, como malaaios, chineses e brancos não-hispânicos (SEMAN et al., 2015; XU; WANG; CHEN, 2012; YANG et al., 2010). A frequência do alelo de risco para o desenvolvimento de DM2 desse SNP pode variar conforme a raça, sendo mais prevalente em indivíduos negros (YANG et al., 2010). Populações mestiças de brancos de origem hispânica e índios, como os mexicanos, também estão entre as que apresentam elevada frequência de alelo de risco (YANG et al., 2010).

Na população com DM2 tem sido observada maior frequência do genótipo AA quando comparada a população sem a doença (LIN et al., 2010; SEMAN et al., 2015). Ressalta-se que a frequência dos genótipos encontrados na população estudada não se encontrou em equilíbrio de Hardy-Weinberg, o que pode ser atribuído a diversos fatores como seleção natural, acasalamento não aleatório, deriva genética, fluxo gênico, tamanho da amostra, erro de genotipagem e associação com a doença (ATTIA et al., 2010; GRAFFELMAN; MORENO, 2013; HOLSINGER, 2001).

A abordagem da relação desse SNP com alterações no metabolismo glicêmico é escassa e encontrada apenas na população sem a doença instalada. Dentre essas alterações, a glicose em jejum aumentada foi associada a presença do alelo A (REES et al., 2011b; XU; WANG; CHEN, 2012; YANG et al., 2010). Ao avaliar as variáveis glicêmicas, lipídicas, *status* de zinco e a ingestão dietética desse mineral não foram observadas diferenças entre os genótipos, com exceção do HOMA-%B, que foi maior nos indivíduos homozigotos de

referência do que naqueles com alelo variante, sendo essa diferença marginalmente significativa. Além disso, em modelo de regressão linear, o HOMA-%B associou-se com as variações do SNP rs11558471 na população estudada.

Em um estudo de meta-análise realizado a partir de dados de indivíduos sem DM2, o alelo A foi associado com a redução da função das células β pancreáticas e da secreção de insulina estimadas pelo HOMA-%B e índice insulinogênico, respectivamente (STRAWBRIDGE et al., 2011). Por outro lado, um estudo que avaliou o SNP Arg325Trp no gene do ZnT8, que é haplótipo do SNP rs11558471 e também apresenta o alelo A de risco, não mostrou relação entre os genótipos com as concentrações de glicose em jejum, insulina, HOMA-IR e HOMA-%B em indivíduos com DM2 (XIANG et al., 2008).

O controle metabólico da doença tem sido associado ao tempo de diagnóstico, conforme corroborado pelos resultados desse estudo. A perda progressiva da função das células β pancreáticas são mecanismos inerentes a fisiopatologia da DM2 (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014; SONG et al., 2007), a qual contribui para o inadequado controle glicêmico nessa população. Entre os diversos marcadores para avaliar a função das células β pancreáticas, da sensibilidade e resistência à ação de insulina, o HOMA configura-se como alternativa de baixo custo para o entendimento dessa relação com o controle glicêmico. Isto tem sido evidenciado em estudos ao longo dos anos pela associação entre elevados valores de HOMA-IR e reduzido percentual de HOMA-%B com o desenvolvimento de DM2 (RUIJGROK et al., 2018; SONG et al., 2006). Em um estudo realizado com indivíduos com DM2, observou-se correlação do %HbA1c com o HOMA-IR e HOMA-%B (AL-HAKEIM; ABDULZAHRA, 2015).

Neste estudo, observou-se ainda que indivíduos com genótipo AA apresentaram três vezes mais chances de alterações no %HbA1c (superior a 7 %). Esse resultado não foi associado aos marcadores do estado nutricional relativo ao zinco, mesmo quando avaliada a ingestão isolada de zinco. Kanoni et al. (2011) ao associarem a presença do alelo de risco A com valores de glicose em jejum por meio de meta-análise com indivíduos sem DM2, observaram que a medida que aumentava o consumo de zinco atenuava a concentração de glicose ($\beta = -0,0017 \pm 0,0006$ mmol/L de glicose a cada 1 mg/dia). Além de evidenciar forte associação inversa entre a concentração de glicose e a ingestão de zinco nos indivíduos homozigotos de referência (AA).

Outro mineral que relaciona-se com a homeostase de insulina é o magnésio, o qual foi evidenciado em um estudo de meta-análise publicado por Hruby et al. (2013) que o aumento na ingestão desse mineral também pode atenuar o efeito do alelo de risco (A) do SNP rs11558471 sobre as variações de glicose ($\beta = -0,0045$ a cada 50 mg/dia) em indivíduos

sem DM2. Essas relações entre o estado nutricional de minerais, a presença de SNPs no ZnT8 e os marcadores do metabolismo da glicose ainda são pouco exploradas na literatura.

A DM2 é uma doença crônica em ascensão cuja fisiopatologia está interligada aos fatores genéticos e de estilo de vida (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018b; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017), sendo os aspectos genéticos responsáveis por explicar cerca de 10 % do risco de desenvolvimento de DM2 (SEMAN et al., 2015). O gatilho para o desenvolvimento e falta de controle do DM2 tem sido associado aos fatores ambientais, o que ressalta a importância da adoção de hábitos de vida considerados saudáveis.

Sabe-se que o controle do peso corporal é um dos pilares para o manejo da DM2, visto que a adiposidade, em especial na região abdominal, é responsável pelo agravamento do quadro de resistência à insulina (ESSER et al., 2014; KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006). Diante disso, pode-se perceber elevada prevalência de sub-relato da ingestão energética nesse estudo, o que corrobora o estado nutricional de sobrepeso e obesidade observado na maioria dos indivíduos avaliados, fatores que podem influenciar diretamente no estado de descontrole glicêmico observado (CALLE; FERNANDEZ, 2012; LONTCHI-YIMAGOU et al., 2013).

Associado a esses aspectos ambientais, indivíduos com DM2 apresentam-se, com elevada frequência, deficientes em zinco, fato observado por meio das reduzidas concentrações séricas (BANDEIRA et al., 2017; BASAKI et al., 2012; CARVALHO et al., 2017) e da baixa ingestão desse mineral (PEREZ et al., 2018). Em virtude da alta concentração de zinco nas células β pancreáticas e de sua relação com o controle glicêmico (MIAO et al., 2013), a manutenção da homeostase corporal desse mineral é de fundamental importância nessa população.

Diante disso, os resultados deste trabalho reafirmam o estado de deficiência de zinco em indivíduos com DM2 a partir da avaliação da ingestão habitual desse mineral e de suas concentrações no plasma e nos eritrócitos. Os teores de zinco determinados nesses compartimentos apresentaram-se em concordância com valores observados por outros autores (AL-MAROOF; AL-SHARBATTI, 2006; NSONWU et al., 2006). Estudos prévios constataram que menores concentrações plasmáticas e eritrocitárias de zinco estão associadas ao pior controle glicêmico em indivíduos com DM2 (BANDEIRA et al., 2017; SAHARIA; GOSWAMI, 2013). Apesar disso, não foi observada correlação entre o estado nutricional relativo ao zinco e as demais variáveis avaliadas nesse estudo.

A avaliação da ingestão alimentar de minerais no controle glicêmico mostrou que a reduzida ingestão concomitante de zinco, potássio, cálcio e magnésio associou-se com maior

%HbA1c em indivíduos com DM2 aumentando em três vezes o risco dessa alteração. Além disso, a ingestão de potássio e o magnésio foram preditores para a redução do %HbA1c. Ressalta-se que a maior parte dos indivíduos avaliados apresentou elevada prevalência de inadequação na ingestão desses minerais.

A associação entre a ingestão desses micronutrientes com o controle glicêmico tem sido estudada de maneira isolada, sendo amplamente observada a ingestão deficiente em indivíduos com DM2 (PEREZ et al., 2018; SALES et al., 2011; SAMPAIO et al., 2014; SHAH et al., 2018). No entanto, estudos que avaliaram a ingestão desses minerais de forma conjunta no controle glicêmico de indivíduos com essa doença são escassos.

Em estudos epidemiológicos tem sido mostrada a associação negativa entre a ingestão diária de zinco e o risco de desenvolvimento de DM2 (DRAKE et al., 2017; ESHAK et al., 2018; SUN et al., 2009), podendo este risco ser reduzido em 20 % com a ingestão diária superior a 13 mg desse mineral (VASHUM et al., 2013). Kanoni et al. (2011) observaram associação significativa entre a ingestão de zinco com valores de glicose em jejum, sendo que a ingestão diária de 1 mg de zinco foi capaz de reduzir 0,02 mg/dL a concentração de glicose. Esse resultado que associa a participação do zinco dietético no controle glicêmico de indivíduos com DM2 também foi discutido em uma revisão sistemática, a qual mostrou que a concentração sérica desse mineral tem sido negativamente correlacionada com o %HbA1c e valores de glicose em jejum nessa população (CARVALHO et al., 2017).

Esses resultados podem ser explicados pela função exercida pelo zinco no funcionamento e manutenção da massa das células β pancreáticas, participação na biossíntese de insulina e maturação dos grânulos secretórios (SUN et al., 2009; WIJESEKARA; CHIMIENTI; WHEELER, 2009). Em adição, o zinco inibe proteínas tirosina fosfatases, estimulando a auto fosforilação dos receptores de insulina (CARVALHO et al., 2017; CHIMIENTI; RUTTER; WHEELER, 2011). Ainda, participa da defesa antioxidante do organismo como cofator da enzima superóxido dismutase, combatendo assim o estresse oxidativo gerado pela hiperglicemia (CHIMIENTI; RUTTER; WHEELER, 2011; SUN et al., 2009).

A participação do magnésio no controle glicêmico também tem sido mostrada em estudos experimentais em ratos com DM2 induzida, nos quais a suplementação melhorou a secreção e sensibilidade à insulina, perfil lipídico e estado inflamatório (IGE; AJAYI; ADEWOYE, 2018; MORAKINYO; SAMUEL; ADEKUNBI, 2018). Morakinyo, Samuel e Adekunbi (2018) mostraram também que ratos suplementados com magnésio melhoraram a translocação do GLUT4 e, em consequência, o controle metabólico.

Evidências prévias apontam ainda para a associação inversa entre a ingestão de magnésio e o risco de DM2 (DONG et al., 2011; HRUBY et al., 2014). Em indivíduos com a doença já instalada é prevalente a reduzida ingestão de magnésio e hipomagnesemia, em especial, naqueles com controle glicêmico deficiente (BARBAGALLO; DOMINGUEZ, 2015; SALES et al., 2011; SAMPAIO et al., 2014). Somada a baixa ingestão, a reduzida concentração plasmática de magnésio pode acarretar alterações no controle glicêmico, visto a distribuição corporal do mineral alterar a secreção e ação da insulina (SALES et al., 2011).

Apesar disso, estudos de suplementação de magnésio ainda são controversos quanto ao efeito dessa intervenção no controle glicêmico. Alguns estudos mostraram efeitos positivos da suplementação de magnésio na redução da glicemia, do %HbA1c e aumento da sensibilidade à insulina (PAOLISSO et al., 1989, 1994; RODRÍGUEZ-MORÁN; GUERRERO-ROMERO, 2003; SOLATI et al., 2014). No entanto, outros estudos não observaram tais efeitos, o que pode ser devido ao fato dos indivíduos apresentarem normomagnesemia, bem como o tempo de suplementação e o reduzido número de participantes avaliados (EIBL et al., 1995; GULLESTAD; JACOBSEN; DOLVA, 1994; LIMA et al., 1998; NAVARRETE-CORTES et al., 2014; PURVIS et al., 1994; VALK et al., 1998). Estudos de meta-análise foram capazes de mostrar o efeito da suplementação de magnésio na redução da glicose em jejum (SONG et al., 2006; VERONESE et al., 2016).

A participação do magnésio no controle glicêmico se dá pela sua ação como cofator em diversas enzimas no metabolismo da glicose, pois o magnésio se liga a molécula de ATP, formando o complexo Mg-ATP para atuar nas reações de transferência de fosfato (DONG et al., 2011; SALES et al., 2011; VERONESE et al., 2016). Desse modo, o magnésio participa da auto fosforilação da subunidade β dos receptores de insulina, proliferação e manutenção das células β pancreáticas, atividade das enzimas tirosinas quinases, além da estimulação de proteínas e substratos da cascata de sinalização da insulina (HRUBY et al., 2014; SALES et al., 2011).

A maior ingestão de cálcio e potássio também está associada com a redução do risco de desenvolvimento de DM2 (CHATTERJEE et al., 2015; VILLEGAS et al., 2009), em virtude da ação conjunta desses minerais no processo de liberação da insulina (FU; GILBERT; LIU, 2013). No interior das células β pancreáticas, o fechamento dos canais de potássio sensíveis ao ATP acarretam a despolarização da membrana plasmática e consequente abertura dos canais de Ca^{2+} , permitindo influxo de cálcio para dentro das células e a liberação de insulina (BONFANTI et al., 2015; FU; GILBERT; LIU, 2013).

Em modelos animais é possível observar ainda o papel fundamental do cálcio no controle de peso corporal e, conseqüentemente, na manutenção da sensibilidade à insulina no

tecido adiposo. O cálcio dietético induz a supressão de calcitriol, resultando na redução da lipogênese e aumento da lipólise. Além disso, aumenta a expressão da proteína desacopladora de adipócitos 2 (UCP2), responsável pelo transporte e oxidação do ácido graxo mitocondrial, reduzindo assim o armazenamento lipídico e a adiposidade (SHALILEH et al., 2010).

Poucos estudos exploram o efeito da ingestão de cálcio no controle glicêmico. Em um estudo conduzido por oito semanas, a suplementação de 1500 mg por dia de cálcio melhorou a sensibilidade à insulina em indivíduos com DM2 (PIKILIDOU et al., 2009). No entanto, a suplementação de 1000 mg de cálcio por dia em indivíduos obesos sem diabetes não apresentou efeitos sobre a sensibilidade à insulina após 24 semanas de intervenção (SHALILEH et al., 2010).

Além disso, a ingestão de magnésio parece exercer efeito sobre a associação da ingestão de cálcio e o controle glicêmico, apresentando-se como fator de confusão, com alta correlação com o cálcio (DONG; QIN, 2012; VAN DAM et al., 2006). Nota-se ainda a relação entre a ingestão de cálcio e vitamina D, sendo observada interação conjunta desses nutrientes na redução dos valores de glicose de jejum, insulina e %HbA1c (SANTOS et al., 2018).

A relação entre a ingestão de potássio e as variáveis de controle glicêmico em indivíduos com DM2 não é amplamente abordada na literatura. A menor ingestão de potássio apresenta associação significativa com redução da sensibilidade à insulina e aumento compensatório na sua secreção, da mesma forma que a reduzida concentração sérica de potássio (CHATTERJEE et al., 2015), tal como, com o risco de desenvolvimento de DM2 (CHATTERJEE et al., 2010, 2012).

Em geral, é possível observar a carência de estudos que avaliem a ingestão concomitante de nutrientes e as variáveis do metabolismo glicêmico em indivíduos com DM2, em especial, quanto aos minerais zinco, potássio, cálcio e magnésio, tornando importantes os resultados desse estudo para avaliação global da ingestão alimentar nessa população. Ainda, é importante salientar que a avaliação dessa relação é simples e de baixo custo, pois o %HbA1c é rotineiramente avaliado em indivíduos com DM2, além de ser considerado o padrão ouro de avaliação do controle glicêmico.

A análise da ingestão alimentar por meio de recordatórios alimentares de 24 horas pode apresentar algumas limitações, visto que o método é dependente da capacidade do indivíduo em relatar com precisão os alimentos consumidos e suas respectivas porções (MCCRORY; HAJDUK; ROBERTS, 2002). Além disso, o sub-relato é uma prática comumente observada em indivíduos com obesidade, que pode afetar a estimativa da ingestão de nutrientes e, em decorrência, prejudicar a avaliação da relação nutriente e doença (BECKER; WELTEN, 2001;

MIRMIRAN; ESMAILLZADEH; AZIZI, 2006). Essas limitações, no entanto, foram amenizadas por meio do cálculo da variabilidade intra e interindividual, em conjunto com o ajuste da ingestão dos micronutrientes pela energia.

Ademais, a avaliação alimentar está sujeita aos dados de tabelas de composição de alimentos, nas quais a composição nutricional dos alimentos pode diferir a depender da localidade de produção. Portanto, análogo ao presente trabalho, a utilização de tabelas de composição de alimentos específicas a região ou país do estudo podem amenizar essa limitação.

Além disso, o não alcance do número amostral calculado apresenta-se como limitação da casuística desse estudo. Ressalta-se que esses dados serão complementados com novas coletas para obtenção do número de participantes estimado pelo cálculo amostral.

Diante disso, estudos dessa natureza que visam o entendimento das interações entre os genes de proteínas envolvidas na biodisponibilidade de minerais importantes na homeostase da glicose são imprescindíveis para o desenvolvimento de estratégias de tratamento que minimizem as complicações associadas ao DM2, favorecendo a melhora na qualidade de vida dessa população.

7 CONCLUSÃO

O SNP rs11558471 no gene do ZnT8 não se relacionou com o estado nutricional relativo ao zinco e com as variáveis de controle glicêmico em indivíduos com DM2. No entanto, a função das células β pancreáticas foi associada com as variações do SNP estudado. Ainda, o genótipo AA (alelo de risco) mostrou-se preditor de alterações no %HbA1c.

Além disso, a inadequada ingestão concomitante de zinco, potássio, cálcio e magnésio relacionou-se com o controle glicêmico deficiente em indivíduos com DM2, sendo a ingestão dos minerais magnésio e potássio preditora da redução do %HbA1c.

REFERÊNCIAS

- AFMAN, L.; MÜLLER, M. Nutrigenomics: From Molecular Nutrition to Prevention of Disease. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 106, n. 4, p. 569–576, 2006.
- AL-HAKEIM, H. K.; ABDULZAHRA, M. S. Correlation between glycated hemoglobin and homa indices in type 2 diabetes mellitus: prediction of beta-cell function from glycated hemoglobin. **J Med Biochem**, v. 34, n. 2, p. 191–199, 2015.
- AL-MAROOF, R. a; AL-SHARBATTI, S. S. Serum zinc levels in diabetic patients and effect of Zinc supplementation on glycemic control of type 2 diabetics. **Saudi Medical Journal**, v. 27, n. 12114, p. 344–350, 2006.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 37, n. 1, p. 81–90, 2014.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2018. **Diabetes Care**, v. 41, p. S13–S27, 2018. a.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Lifestyle Management: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. **Diabetes Care**, v. 41, p. S38–S50, 2018. b.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Glycemic Targets: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. **Diabetes Care**, v. 41, p. S55–S64, 2018. c.
- ANDRALI, S. S. et al. Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic β -cells. **Biochemical Journal**, v. 415, n. 1, p. 1–10, 2008.
- ANDREE, K. B. et al. Investigation of Lymphocyte Gene Expression for Use as Biomarkers for Zinc Status in Humans. **The Journal of Nutrition**, v. 134, p. 1716–1723, 2004.
- ATTIA, J. et al. Detecting genotyping error using measures of degree of hardy-weinberg disequilibrium. **Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology**, v. 9, n. 1, 2010.
- BANDEIRA, V. da S. et al. Association of reduced zinc status with poor glycemic control in individuals with type 2 diabetes mellitus. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 44, n. June, p. 132–136, 2017.
- BANTING, F.; BEST, C. The internal secretion of the pancreas. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 7, n. 5, p. 251–66, 1922.
- BARBAGALLO, M.; DOMINGUEZ, L. J. Magnesium and type 2 diabetes. **World Journal of Diabetes**, v. 6, n. 10, p. 1152–1157, 2015.
- BASAKI, M. et al. Zinc, copper, iron, and chromium concentrations in young patients with type 2 diabetes mellitus. **Biological Trace Element Research**, v. 148, n. 2, p. 161–164, 2012.
- BECKER, W.; WELTEN, D. Under-reporting in dietary surveys--implications for development of food-based dietary guidelines. **Public health nutrition**, v. 4, n. 2B, p. 683–687, 2001.

BERNÁ, G. et al. Nutrigenetics and Nutrigenomics Insights into Diabetes Etiopathogenesis. **Nutrients**, v. 6, n. 11, p. 5338–5369, 2014.

BHANOT, S.; THOMPSON, K. H.; MCNEILL, J. H. Essential trace elements of potential importance in nutritional management of diabetes mellitus. **Nutrition Research**, v. 14, n. 4, p. 593–604, 1994.

BOESGAARD, T. W. et al. The common SLC30A8 Arg325Trp variant is associated with reduced first-phase insulin release in 846 non-diabetic offspring of type 2 diabetes patients—the EUGENE2 study. **Diabetologia**, v. 51, n. 5, p. 816–820, 2008.

BONFANTI, D. H. et al. ATP-dependent potassium channels and type 2 diabetes mellitus. **Clinical Biochemistry**, v. 48, n. 7–8, p. 476–482, 2015.

BRASIL. Vigitel Brasil 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. **Ministério da Saúde**, p. 160, 2017.

BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, v. 234, n. 2, p. 177–186, 1999.

BROWN, K. H. Effect of infections on plasma zinc concentration and implications for zinc status assessment in low-income countries. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, n. 2, p. 425S–429S, 1998.

BROWN, K. H.; WUEHLER, S. E.; PEERSON, J. M. The importance of zinc in human nutrition and estimation of the global prevalence of zinc deficiency. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 22, n. 2, p. 113–125, 2001.

CALLE, M. C.; FERNANDEZ, M. L. Inflammation and type 2 diabetes. **Diabetes and Metabolism**, v. 38, n. 3, p. 183–191, 2012.

CARVALHO, G. B. et al. Zinc's role in the glycemic control of patients with type 2 diabetes: a systematic review. **BioMetals**, v. 30, n. 2, p. 151–162, 2017.

CAUCHI, S. et al. Meta-analysis and functional effects of the SLC30A8 rs13266634 polymorphism on isolated human pancreatic islets. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 100, n. 1, p. 77–82, 2010.

CESAR, T. B.; WADA, S. R.; BORGES, R. G. Zinco plasmático e estado nutricional em idosos. **Revista de Nutricao**, v. 18, n. 3, p. 357–365, 2005.

CHANG, L.; CHIANG, S.-H.; SALTIEL, A. R. Insulin Signaling and the Regulation of Glucose Transport. **Molecular Medicine**, v. 10, n. 7–12, p. 65–71, 2005.

CHANG, S.-C.; YANG, W.-C. V. Hyperglycemia, tumorigenesis, and chronic inflammation. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 108, p. 146–153, 2016.

CHATTERJEE, R. et al. Serum and dietary potassium and risk of incident type 2 diabetes mellitus: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. **Archives of Internal Medicine**, v. 170, n. 19, p. 1745–1751, 2010.

CHATTERJEE, R. et al. Potassium intake and risk of incident type 2 diabetes mellitus: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. **Diabetologia**, v. 55, n. 5, p. 1295–1303, 2012.

CHATTERJEE, R. et al. Potassium and Glucose Measures in Older Adults: The Cardiovascular Health Study. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 70, n. 2, p. 255–261, 2015.

CHENG, Z.; TSENG, Y.; WHITE, M. F. Insulin signaling meets mitochondria in metabolism Insulin signaling and insulin receptor substrates. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 21, n. 10, p. 589–598, 2010.

CHIMIENTI, F. et al. Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. **Diabetes**, v. 53, n. 9, p. 2330–2337, 2004.

CHIMIENTI, F.; RUTTER, G. A.; WHEELER, M. B. Zinc and Diabetes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, p. 493–513, 2011.

COULSTON, L.; DANDONA, P. Insulin-like Effect of Zinc on Adipocytes. **Diabetes**, v. 29, p. 665–667, 1980.

COUSINS, R. J.; LIUZZI, J. P.; LICHTEN, L. A. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 34, p. 24085–9, 2006.

DAI, W. et al. Amino Acids Attenuate Insulin Action on Gluconeogenesis and Promote Fatty Acid Biosynthesis via mTORC1 Signaling Pathway in trout Hepatocytes. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 36, p. 1084–1100, 2015.

DAVIDSON, H. W.; WENZLAU, J. M.; O'BRIEN, R. M. Zinc transporter 8 (ZnT8) and β cell function. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 25, n. 8, p. 415–424, 2014.

DEVIRGILIIS, C. et al. Zinc fluxes and zinc transporter genes in chronic diseases. **Mutation Research**, v. 622, n. 1–2, p. 84–93, 2007.

DONG, J.-Y. et al. Magnesium Intake and Risk of Type 2 Diabetes: Meta-analysis of prospective cohort studies. **Diabetes Care**, v. 34, n. 9, p. 2116–2122, 2011.

DONG, J.-Y.; QIN, L.-Q. Dietary calcium intake and risk of type 2 diabetes: possible confounding by magnesium. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, n. 3, p. 408–410, 2012.

DORIA, A.; PATTI, M.-E.; KAHN, C. R. The emerging genetic architecture of type 2 diabetes. **Cell metabolism**, v. 8, n. 3, p. 186–200, 2008.

DRAKE, I. et al. A prospective study of dietary and supplemental zinc intake and risk of type 2 diabetes depending on genetic variation in SLC30A8. **Genes & nutrition**, v. 12, p. 30, 2017.

DU, Y.; WEI, T. Inputs and outputs of insulin receptor. **Protein & cell**, v. 5, n. 3, p. 203–13, 2014.

EGEFJORD, L. et al. Zinc transporter gene expression is regulated by pro-inflammatory cytokines: a potential role for zinc transporters in beta-cell apoptosis? **BMC endocrine disorders**, v. 9, p. 7, 2009.

EIBL, N. L. et al. Hypomagnesemia in Type II Diabetes : Effect of a 3-month replacement therapy. **Diabetes care**, v. 18, p. 188–192, 1995.

ESHAK, E. S. et al. Associations between dietary intakes of iron, copper and zinc with risk of type 2 diabetes mellitus: A large population-based prospective cohort study. **Clinical Nutrition**, v. 37, n. 2, p. 667–674, 2018.

ESSER, N. et al. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 105, n. 2, p. 141–150, 2014.

FERGUSON, L. R. et al. Nutrigenomics and gut health. **Mutation Research**, v. 622, n. 1–2, p. 1–6, 2007.

FISBERG, R. M. et al. **Inquéritos Alimentares - Métodos e Bases Científicos**. 1. ed. São Paulo: Manole, 2005.

FLOR, L. S. et al. Diabetes burden in Brazil: fraction attributable to overweight, obesity, and excess weight. **Revista de saúde pública**, v. 49, p. 29, 2015.

FOLLI, F. et al. The Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus Micro- and Macrovascular Complications: Avenues for a Mechanistic-Based Therapeutic Approach. **Current Diabetes Reviews**, v. 7, n. 4, p. 313–324, 2011.

FRANKLIN, I. et al. Beta-cell secretory products activate alpha-cell ATP-dependent potassium channels to inhibit glucagon release. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1808–15, 2005.

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. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 6, 1972.

FU, Y. et al. Down-regulation of ZnT8 expression in INS-1 rat pancreatic beta cells reduces insulin content and glucose-inducible insulin secretion. **Plos One**, v. 4, n. 5, 2009.

FU, Z.; GILBERT, E. R.; LIU, D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. **Current Diabetes Reviews**, v. 9, n. 1, p. 25–53, 2013.

FUKUNAKA, A.; FUJITANI, Y. Molecular Sciences Role of Zinc Homeostasis in the Pathogenesis of Diabetes and Obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, p. 476, 2018.

GERMAN INSTITUTE OF HUMAN NUTRITION POTSDAM-REHBRÜCKE (DIFE). **MSM program**, Department of Epidemiology, 2012. Disponível em: <<https://msm.dife.de/>>

GIBSON, R. S. **Principles of Nutritional Assessment**. 2. ed. New York: OXFORD USA II, 2005.

GOODISON, S.; KENNA, S.; ASHCROFT, S. J. Control of insulin gene expression by glucose. **The Biochemical Journal**, v. 285, p. 563–568, 1992.

GRAFFELMAN, J.; MORENO, V. The mid p-value in exact tests for Hardy-Weinberg equilibrium. **Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology**, v. 12, n. 4, p. 433–448, 2013.

GRANATO, D.; CALADO, V. M. de A.; JARVIS, B. Observations on the use of statistical methods in Food Science and Technology. **Food Research International**, v. 55, p. 137–149, 2014.

GUENTHER, P. et al. **The multiple-pass approach for the 24 hour recall in the Continuing Survey of food intakes by individuals (CSFII) 1994-1996** International Conference on Dietary Assessment Methods. Boston.

GULLESTAD, L.; JACOBSEN, T.; DOLVA, L. Effect of Magnesium Treatment on Glycemic Control and Metabolic Parameters in NIDDM Patients. **Diabetes care**, v. 1, n. 5, p. 460–461, 1994.

GUTHRIE, H. A.; PICCIANO, M. F. Micronutrient minerals. In: **Human nutrition**. 1. ed. New York: Mosby, 1994. p. 351–357.

HAMBIDGE, M. Human Zinc Deficiency. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 5, p. 1344S–1349S, 2000.

HOLSINGER, K. Hardy-Weinberg Law. **Encyclopedia of Genetics**, p. 912–914, 2001.

HRUBY, A. et al. Higher Magnesium Intake Is Associated with Lower Fasting Glucose and Insulin, with No Evidence of Interaction with Select Genetic Loci, in a Meta-Analysis of 15 CHARGE Consortium Studies. **Journal of Nutrition**, v. 143, n. 3, p. 345–353, 2013.

HRUBY, A. et al. Higher magnesium intake reduces risk of impaired glucose and insulin metabolism and progression from prediabetes to diabetes in middle-aged americans. **Diabetes care**, v. 37, n. 2, p. 419–27, 2014.

HUANG, Q. et al. Association analysis of SLC30A8 rs13266634 and rs16889462 polymorphisms with type 2 diabetes mellitus and repaglinide response in Chinese patients. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 66, n. 12, p. 1207–1215, 2010.

HUTTON, J. C. Insulin secretory granule biogenesis and the proinsulin-processing endopeptidases. **Diabetologia**, v. 37, p. 48–56, 1994.

IGE, A. O.; AJAYI, O. A.; ADEWOYE, E. O. Anti-inflammatory and insulin secretory activity in experimental type-2 diabetic rats treated orally with magnesium. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, 2018.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary Reference Intakes: the essential guide to nutrient requirements**. Washington: National Academy of Sciences, 2006.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D**.

Washington: National Academy of Sciences, 2011.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Idf Diabetes Atlas: Eighth edition 2017**. 8. ed.

ISER, B. P. M. et al. Prevalência de diabetes autorreferido no Brasil: resultados da Pesquisa Nacional de Saúde 2013. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, n. 2, p. 305–314, 2015.

KAHN, S. E. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 46, p. 3–19, 2003.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 840–846, 2006.

KAMBE, T.; HASHIMOTO, A.; FUJIMOTO, S. Current understanding of ZIP and ZnT zinc transporters in human health and diseases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 17, p. 3281–3295, 2014.

KANONI, S. et al. Total Zinc Intake May Modify the Glucose-Raising Effect of a Zinc Transporter (SLC30A8) Variant: A 14-Cohort Meta-analysis. **Diabetes**, v. 60, n. 9, p. 2407–2416, 2011.

KHAN, F. A. et al. Comparative Study of Serum Copper, Iron, Magnesium, and Zinc in Type 2 Diabetes-Associated Proteinuria. **Biological Trace Element Research**, v. 168, n. 2, p. 321–329, 2015.

KREBS, N. F. Overview of Zinc Absorption and Excretion in the Human Gastrointestinal Tract. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 5, p. 1374S–1377S, 2000.

LEFEBVRE, B. et al. Regulation and functional effects of ZNT8 in human pancreatic islets. **The Journal of Endocrinology**, v. 214, n. 2, p. 225–32, 2012.

LEVY, J. C.; MATTHEWS, D. R.; HERMANS, M. P. Correct Homeostasis Model assessment (HOMA) evaluation used the computer program. **Diabetes Care**, v. 21, n. 12, p. 2191–2192, 1998.

LEY, S. H. et al. Prevention and Management of Type 2 Diabetes: Dietary Components and Nutritional Strategies. **Lancet**, v. 383, n. 9933, p. 1999–2007, 2014.

LIMA, M. de L. et al. The Effect of Magnesium Supplementation in Increasing Doses on the Control of Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 21, n. 5, p. 682–686, 1998.

LIN, Y. et al. Association study of genetic variants in eight genes/loci with type 2 diabetes in a Han Chinese population. **BMC Medical Genetics**, v. 11, n. 97, 2010.

LIU, M. et al. Proinsulin entry and transit through the endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells. In: **Vitamins and Hormones**. Elsevier, 2014. v. 95, p. 35–62.

LODISH, H. et al. **Biologia Celular e Molecular**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

LONTCHI-YIMAGOU, E. et al. Diabetes mellitus and inflammation. **Current Diabetes**

Reports, v. 13, n. 3, p. 435–444, 2013.

LU, Y. et al. Alkali dilution of blood samples for high throughput ICP-MS analysis — comparison with acid digestion. **Clinical Biochemistry**, v. 48, n. 3, p. 140–147, 2015.

LUO, Y.-Y. et al. Relationship Between Serum Zinc Level and Microvascular Complications in Patients with Type 2 Diabetes. **Chinese Medical Journal**, v. 128, n. 24, p. 3276, 2015.

MANNING, B. D.; CANTLEY, L. C. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. **Cell**, v. 129, n. 4, p. 1261–1274, 2007.

MARUTHUR, N. M. et al. Effect of zinc supplementation on insulin secretion: interaction between zinc and SLC30A8 genotype in Old Order Amish. **Diabetologia**, v. 58, n. 2, p. 295–303, 2014.

MASOOD, N.; BALOCH, G.; GHORI, R. Serum zinc and magnesium in type-2 diabetic patients. **Journal of the College of Physicians and Surgeons**, v. 19, n. 8, p. 483–486, 2009.

MCCRORY, M. A.; HAJDUK, C. L.; ROBERTS, S. B. Procedures for screening out inaccurate reports of dietary energy intake. **Public Health Nutrition**, v. 5, n. 6a, p. 873–882, 2002.

MCINNES, R. R.; WILLARD, H. F.; NUSSBAUM, R. Diversidade Genética Humana: Mutação e Polimorfismo. In: **Thompson & Thompson Genética Médica**. 8. ed. Elsevier, 2016. p. 43–54.

MIAO, X. et al. Zinc homeostasis in the metabolic syndrome and diabetes. **Frontiers of Medicine in China**, v. 7, n. 1, p. 31–52, 2013.

MINISTÉRIO DA SAUDE. **Orientações para a coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde : Norma Técnica do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional - SISVAN**. 1. ed. Brasília: Série G. Estatística e Informação em Saúde, 2011.

MIRMIRAN, P.; ESMAILLZADEH, A.; AZIZI, F. Under-reporting of energy intake affects estimates of nutrient intakes. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 15, n. 4, p. 459–464, 2006.

MOCCHIGIANI, E.; GIACCONI, R.; MALAVOLTA, M. Zinc signalling and subcellular distribution: emerging targets in type 2 diabetes. **Trends in Molecular Medicine**, v. 14, n. 10, p. 419–428, 2008.

MORAKINYO, A. O.; SAMUEL, T. A.; ADEKUNBI, D. A. Magnesium upregulates insulin receptor and glucose transporter-4 in streptozotocin-nicotinamide-induced type-2 diabetic rats. **Endocrine regulations**, v. 52, n. 1, p. 6–16, 2018.

MORINO, K.; PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Molecular Mechanisms of Insulin Resistance in Humans and Their Potential Links. **Diabetes**, v. 55, p. S9–S15, 2006.

MULUKUTLA, B. C. et al. Regulation of Glucose Metabolism – A Perspective From Cell Bioprocessing. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 638–651, 2016.

NAVARRETE-CORTES, A. et al. No effect of magnesium supplementation on metabolic control and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients with normomagnesemia. **Magnesium Research**, v. 27, n. 2, p. 48–56, 2014.

NCBI. **SLC30A8 solute carrier family 30 member 8 [Homo sapiens (human)]**. 2018. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/169026>.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NICOLSON, T. et al. Insulin Storage and Glucose Homeostasis in Mice Null for the Granule Zinc Transporter ZnT8 and Studies of the Type 2 Diabetes–Associated Variants. **Diabetes**, v. 58, p. 2070–2083, 2009.

NSONWU, A. C. et al. Influence of Age , Gender and Duration of Diabetes on Serum and Urine Levels of Zinc , Magnesium , Selenium and Chromium in Type 2 Diabetics in Calabar , Nigeria. **Turkish Journal of Biochemistry**, v. 31, n. 3, p. 107–114, 2006.

OH, H.-M.; YOON, J.-S. Glycemic control of type 2 diabetic patients after short-term zinc supplementation. **Nutrition Research and Practice**, v. 2, n. 4, p. 283, 2008.

PAOLISSO, G. et al. Improved insulin response and action by chronic magnesium administration in aged NIDDM subjects. **Diabetes Care**, v. 12, n. 4, p. 265–269, 1989.

PAOLISSO, G. et al. Changes in glucose turnover parameters and improvement of glucose oxidation after 4-week magnesium administration in elderly noninsulin-dependent (type II) diabetic patients. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 78, n. 6, p. 1510–1514, 1994.

PEREZ, A. et al. Association between zinc nutritional status and glycemic control in individuals with well-controlled type-2 diabetes. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 2018.

PIKILIDOU, M. I. et al. Insulin sensitivity increase after calcium supplementation and change in intraplatelet calcium and sodium-hydrogen exchange in hypertensive patients with Type 2 diabetes. **Diabetic Medicine**, v. 26, n. 3, p. 211–219, 2009.

PRASAD, A. S. Discovery of Human Zinc Deficiency : Its Impact on Human Health and Disease. **Advances in Nutrition**, [s. l.], v. 4, p. 176–190, 2013.

PURVIS, J. R. et al. Effect of oral magnesium supplementation on selected cardiovascular risk factors in non-insulin-dependent diabetics. **Archives of family medicine**, v. 3, n. 6, p. 503–8, 1994.

REES, S. D. et al. Replication of 13 genome-wide association (GWA)-validated risk variants for type 2 diabetes in Pakistani populations. **Diabetologia**, v. 54, p. 1368–1374, 2011. a.
REES, S. D. et al. Effects of 16 genetic variants on fasting glucose and type 2 diabetes in South Asians: ADCY5 and GLIS3 variants may predispose to type 2 diabetes. **Plos One**, v. 6, n. 9, p. 1–7, 2011. b.

RICHARDS-WILLIAMS, C. et al. Extracellular ATP and zinc are co-secreted with insulin and activate multiple P2X purinergic receptor channels expressed by islet beta-cells to potentiate insulin secretion. **Purinergic Signalling**, v. 4, p. 393–405, 2008.

RODRÍGUEZ-MORÁN, M.; GUERRERO-ROMERO, F. Oral magnesium supplementation improves insulin sensitivity and metabolic control in type 2 diabetic subjects: a randomized double-blind controlled trial. **Diabetes care**, v. 26, n. 4, p. 1147–52, 2003.

ROOHANI, N. et al. Zinc and its importance for human health: An integrative review. **Journal of Research in Medical Sciences**, v. 18, n. 2, p. 144–57, 2013.

RUIJGROK, C. et al. Size and shape of the associations of glucose, HbA1c, insulin and HOMA-IR with incident type 2 diabetes: the Hoorn Study. **Diabetologia**, v. 61, n. 1, p. 93–100, 2018.

SAHARIA, G. K.; GOSWAMI, R. K. Evaluation of serum zinc status and glycated hemoglobin of type 2 diabetes mellitus patients in a tertiary care hospital of assam. **Journal of laboratory physicians**, v. 5, n. 1, p. 30–3, 2013.

SALES, C. H. et al. Influence of magnesium status and magnesium intake on the blood glucose control in patients with type 2 diabetes. **Clinical Nutrition**, v. 30, p. 359–364, 2011.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799–806, 2001.

SAMBROOK, J.; GETHING, M.-J. Protein structure. Chaperones, paperones. **Nature**, v. 342, n. 6247, p. 224–5, 1989.

SAMPAIO, F. A. et al. Influence of magnesium on biochemical parameters of iron and oxidative stress in patients with type 2 diabetes. **Nutrición Hospitalaria**, v. 30, n. 3, p. 570–576, 2014.

SANTOS, R. K. F. et al. Vitamin D ratio and glycaemic control in individuals with type 2 diabetes mellitus: A systematic review. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 34, n. 3, p. 1–11, 2018.

SEMAN, N. et al. Increased DNA methylation of the SLC30A8 gene promoter is associated with type 2 diabetes in a Malay population. **Clinical Epigenetics**, v. 7, n. 1, p. 30, 2015.

SHAH, M. et al. Comparison of nutrient intakes in South Asians with type 2 diabetes mellitus and controls living in the United States. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 138, p. 47–56, 2018.

SHALILEH, M. et al. The influence of calcium supplement on body composition, weight loss and insulin resistance in obese adults receiving low calorie diet. **Journal of research in medical sciences**, v. 15, n. 4, p. 191–201, 2010.

SHAN, Z. et al. Interactions between zinc transporter-8 gene (SLC30A8) and plasma zinc concentrations for impaired glucose regulation and type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 63, n. 5, p.

1796–1803, 2014.

SLADEK, R. et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. **Nature**, v. 445, p. 881–885, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, n. 1, p. 1–76, 2017.

SOLATI, M. et al. Oral magnesium supplementation in type II diabetic patients. **Medical Journal of the Islamic Republic of Iran**, v. 28, n. 1, 2014.

SONG, Y. et al. Effects of oral magnesium supplementation on glycaemic control in Type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized double-blind controlled trials. **Diabetic Medicine**, v. 23, n. 10, p. 1050–1056, 2006.

SONG, Y. et al. Insulin sensitivity and insulin secretion determined by homeostasis model assessment and risk of diabetes in a multiethnic cohort of women: the Women's Health Initiative Observational Study. **Diabetes care**, v. 30, n. 7, p. 1747–52, 2007.

STAIGER, H. et al. Polymorphisms within Novel Risk Loci for Type 2 Diabetes Determine β -Cell Function. **PLoS ONE**, v. 2, n. 9, p. e832, 2007.

STRAWBRIDGE, R. J. et al. Genome-wide association identifies nine common variants associated with fasting proinsulin levels and provides new insights into the pathophysiology of type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 60, n. 10, p. 2624–2634, 2011.

SUN, Q. et al. Prospective Study of Zinc Intake and Risk of Type 2 Diabetes in Women. **Diabetes Care**, v. 32, n. 4, p. 629–634, 2009.

TAMAKI, M. et al. The diabetes-susceptible gene SLC30A8/ZnT8 regulates hepatic insulin clearance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 10, p. 4513–4524, 2013.

TANGVARASITTICHA, S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. **World Journal of Diabetes**, v. 6, n. 3, p. 456, 2015.

TOKARZ, V. L.; MACDONALD, P. E.; KLIP, A. The cell biology of systemic insulin function. **The Journal of cell biology**, 2018.

VALK, H. W. De et al. Oral magnesium supplementation in insulin-requiring Type 2 diabetic patients. **Diabetic medicine**, v. 15, n. 6, p. 503–7, 1998.

VAN DAM, R. M. et al. Dietary Calcium and Magnesium, Major Food Sources, and Risk of Type 2 Diabetes in U.S. Black Women. **Diabetes Care**, v. 29, n. 10, p. 2238–2243, 2006.

VASHUM, K. P. et al. Is dietary zinc protective for type 2 diabetes? Results from the Australian longitudinal study on women's health. **BMC endocrine disorders**, v. 13, p. 40, 2013.

VERONESE, N. et al. Effect of magnesium supplementation on glucose metabolism in people

with or at risk of diabetes: A systematic review and meta-analysis of double-blind randomized controlled trials. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 12, p. 1354–1359, 2016.

VILLEGAS, R. et al. Dietary calcium and magnesium intakes and the risk of type 2 diabetes: The Shanghai Women's Health Study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, n. 13, p. 1059–1067, 2009.

VINKEN, A. G. et al. Equations for predicting the energy requirements of healthy adults aged 18–81 y 1–3. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, p. 920–926, 1999.

WANG, Z.; MOULT, J. SNPs, protein structure, and disease. **Human Mutation**, v. 17, n. 4, p. 263–270, 2001.

WEISS, M.; STEINER, D. F.; PHILIPSON, L. H. **Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships**. MDText.com, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25905258>>. Acesso em: 9 jun. 2018.

WIJESEKARA, N. et al. Beta cell-specific Znt8 deletion in mice causes marked defects in insulin processing, crystallisation and secretion. **Diabetologia**, v. 53, n. 8, p. 1656–1668, 2010.

WIJESEKARA, N.; CHIMIENTI, F.; WHEELER, M. B. Zinc, a regulator of islet function and glucose homeostasis. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, [s. l.], v. 11, p. 202–214, 2009.

WILCOX, G. Insulin and insulin resistance. **Clinical Biochemist Reviews**, v. 26, n. 2, p. 19–39, 2005.

WILLETT, W. C.; HOWE, G. R.; KUSHI, L. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, p. 1220S–1228S, 1997.

WOOD, R. J. Assessment of Marginal Zinc Status in Humans. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 5, p. 1350S–1354S, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. **WHO Technical Report Series**, p. 253, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Waist Circumference and Waist-Hip Ratio: Report of a WHO Expert Consultation** World Health Organization. Geneva.

XIANG, J. et al. Zinc transporter-8 gene (SLC30A8) is associated with type 2 diabetes in Chinese. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 93, n. 10, p. 4107–4112, 2008.

XU, J. et al. Analysis of serum and urinal copper and zinc in chinese northeast population with the prediabetes or diabetes with and without complications. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2013.

XU, J.; WANG, J.; CHEN, B. SLC30A8 (ZnT8) variations and type 2 diabetes in the Chinese

Han population. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 2, p. 1592–1598, 2012.

XU, K. et al. Association between rs13266634 C/T polymorphisms of solute carrier family 30 member 8 (SLC30A8) and type 2 diabetes, impaired glucose tolerance, type 1 diabetes-A meta-analysis. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 91, n. 2, p. 195–202, 2011.

YANG, Q. et al. Racial / Ethnic Differences in Association of Fasting Glucose – Associated Genomic Loci With Fasting Glucose , HOMA-B , and Impaired Fasting Glucose in the U . S . Adult. **Diabetes Care**, v. 33, n. 11, p. 2370–2377, 2010.

YECIES, J. L. et al. Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways. **Cell Metabolism**, v. 14, n. 1, p. 21–32, 2011.

ZHOU, H. et al. Zinc, Not Insulin, Regulates the Rat β -Cell Response to Hypoglycemia In Vivo. **Diabetes**, v. 56, n. 4, p. 1107–1112, 2007.

APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO SOCIOECONÔMICO E DE ANAMNESE NUTRICIONAL

Data de aplicação: ____/____/____

1. DADOS PESSOAIS

Nome: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Naturalidade: _____

Estado civil: _____ Profissão: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

Telefone residencial: () _____ Celular: () _____

E-mail: _____

2. DADOS SOCIOECONÔMICOS

Escolaridade: _____

Renda familiar (salário mínimo): () 1 a 3 () 4 a 7 () 8 a 9 () > 10

Total de moradores na residência: _____

3. ANAMNESE CLÍNICA

Diagnóstico médico: _____ Tempo de diagnóstico: _____

Faz uso de insulina: () sim () não. Tempo? _____

Qual tipo: _____ Posologia: _____

Glicemia: _____

Tratamentos adotados

☐ Dieta ☐ Dieta + Insulina ☐ Dieta + Hipoglicemiante oral

☐ Outros: _____

Sintomas recorrentes

() Náuseas () Vômito () Polifagia () Poliúria () Polidipsia () Constipação

() Diarreia () Flatulência () Azia

Pressão Arterial: _____X_____ mmHg

Faz uso de medicamentos: () sim () não. Tempo? _____

Quais? _____

Faz uso de suplementos alimentares: () sim () não.

Quais? _____

Presença de doenças: () sim () não. Quais?

() Diabetes () Hipertensão () Obesidade () Doença cardiovascular () Problemas circulatórios () Hipercolesterolemia () Gastrite () Câncer () Disfunções tireoidianas () Artrite reumatoide () Doença renal crônica () Processo infeccioso () Processo inflamatório agudo

Outras: _____

Histórico Familiar:

() Diabetes () Hipertensão () Obesidade () Doença cardiovascular () Gastrite () Problemas circulatórios () Hipercolesterolemia () Refluxo () Úlcera () Câncer () Doença tireoidiana () Depressão

Outras: _____

Informações adicionais: _____

4. ESTILO DE VIDA

Fumante: () sim () não. Há quanto tempo? _____

Ex fumante: () sim () não. Há quanto tempo parou? _____

Alcoolismo: () sim () não. Quanto? _____ Frequência: _____

Atividade física: () sim () não. Frequência: _____ Tipo: _____

Duração: _____

5. ANTROPOMETRIA

Peso (kg): _____ Estatura (m): _____ IMC (kg/m²): _____

CC (cm): _____ %G: _____

Peso de Gordura (kg): _____ Peso de Massa Magra (kg): _____

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE (CCBS)
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO (DNUT)

(Via do Voluntário)

Nome: _____
Documento de Identidade Nº _____ Data de Nascimento: _____ / _____ / _____
Endereço _____
Bairro: _____ Cidade: _____ UF: _____ CEP: _____
Contatos: _____

O Senhor (a) está convidado a participar da pesquisa “Influência de variações genéticas em genes de enzimas antioxidantes e do transportador de zinco-8 no estado nutricional relativo ao zinco e selênio e nos marcadores metabólicos em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2”, cujo objetivo principal é esclarecer a participação de minerais (zinco e selênio) na proteção do seu corpo, caso exista alguma alteração no seu DNA. Esta pesquisa está sendo coordenada pela Profa. Dra. Liliane Viana Pires, do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Sergipe.

Caso aceite, a sua participação se dará da seguinte forma: o Sr.(a) passará por uma avaliação do peso, altura, medida da circunferência da cintura e da quantidade de gordura corporal em relação ao seu peso. Além disso, será solicitado que o Sr.(a) faça uma coleta de urina de 24 horas para avaliarmos as quantidades dos minerais (zinco e selênio) que o Sr. (a) está eliminando pela urina. Também solicitaremos que o Sr. (a) compareça em jejum de 10 horas no dia marcado para que seja colhido 15 mL do seu sangue. Ressaltamos que serão utilizadas seringas e agulhas estéreis e descartáveis, e que o risco é considerado mínimo, pelo desconforto da dor local e do jejum. Para contornar este risco, providenciaremos um profissional competente e lanche para logo após a coleta do sangue. Avaliaremos o seu DNA para saber se existem alterações que possam influenciar nas quantidades dos minerais zinco e selênio no seu corpo, do hormônio insulina, de açúcar e de gorduras presentes no seu sangue. O material obtido do seu sangue será utilizado somente para os fins do objetivo desta pesquisa. Também avaliaremos a sua ingestão de alimentos por meio de recordatórios alimentares de 24 horas, que consistem em perguntar o que o Sr.(a) comeu no dia anterior a entrevista. Estas perguntas sobre sua alimentação serão feitas também em outros dois dias

por telefone, caso o Sr.(a) aceite.

Tanto o Sr. (a) quanto os demais voluntários receberão todas as orientações necessárias para a realização da pesquisa. Além disso, é seu direito saber informações sobre o andamento da pesquisa, procedimentos utilizados, riscos e benefícios relacionados a esta pesquisa, em qualquer fase do estudo, a fim de esclarecer eventuais dúvidas. O Sr.(a) também receberá os resultados das análises realizadas.

Os resultados desta pesquisa poderão trazer benefícios direto para a população com diabetes mellitus tipo 2, pois existem estudos que mostram que os minerais zinco e selênio ajudam na manutenção de algumas funções do organismo. O Sr.(a) receberá orientações nutricionais, visando a melhoria na ingestão alimentar de zinco e selênio, pois esses nutrientes contribuem para o bom funcionamento do seu corpo. Além disso, conhecer se existe ou não alterações no DNA, ajudará a elaborar formas para que sua alimentação promova maior proteção ao seu organismo. A participação tanto dos voluntários com diabetes mellitus tipo 2 quanto dos voluntários sem a doença será de grande importância para o maior conhecimento da doença e do seu tratamento nutricional.

A sua decisão de participar é livre, não haverá despesa financeira para o Senhor (a) e também não haverá pagamento para participar da pesquisa. Deve ser ressaltado que a sua participação na pesquisa poderá ser desfeita em qualquer momento que achar conveniente, não haverá prejuízo para o Senhor (a), mesmo depois de aceite e assinado o termo. Ressaltamos que todos os seus direitos serão preservados.

Ao fazer as análises dos resultados, os nomes dos participantes serão substituídos por números, ou seja, não haverá divulgação dos nomes e o sigilo será mantido.

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, o senhor (a) poderá entrar em contato com as pesquisadoras Paula Nascimento Brandão Lima no email: paulanblima@gmail.com ou telefone: (79) 99126-5535; Gabrielli Barbosa de Carvalho no email: gabicarvalho_31@hotmail.com ou telefone: (79) 99198-8652; e com a coordenadora da pesquisa: Liliane Viana Pires no email: lvianapires@gmail.com ou telefone: (79) 99155-1300. Também no endereço a seguir: Departamento de Nutrição - Universidade Federal de Sergipe - Cidade Universitária “Prof. José Aloísio de Campos”: Av. Marechal Rondon, s/n Jardim Rosa Elze - CEP 49100-000 - São Cristóvão/SE.

Caso seja observado qualquer risco ou danos significativos aos participantes da pesquisa, este estudo será imediatamente suspenso.

CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

_____ (SE), _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa ou
responsável legal

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos dessa pesquisa, favor entrar em contato com: Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Sergipe – Rua Cláudio Batista s/nº – Bairro: Sanatório – Aracaju/SE – CEP: 49.060-110/ Telefone: (79)2105-1805/e-mail: cephu@ufs.br.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE (CCBS)
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO (DNUT)

(Via do Pesquisador)

Nome: _____
Documento de Identidade Nº _____ Data de Nascimento: _____ / _____ / _____
Endereço _____
Bairro: _____ Cidade: _____ UF: _____ CEP: _____
Contatos: _____

O Senhor (a) está convidado a participar da pesquisa “Influência de variações genéticas em genes de enzimas antioxidantes e do transportador de zinco-8 no estado nutricional relativo ao zinco e selênio e nos marcadores metabólicos em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2”, cujo objetivo principal é esclarecer a participação de minerais (zinco e selênio) na proteção do seu corpo, caso exista alguma alteração no seu DNA. Esta pesquisa está sendo coordenada pela Profa. Dra. Liliane Viana Pires, do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Sergipe.

Caso aceite, a sua participação se dará da seguinte forma: o Sr.(a) passará por uma avaliação do peso, altura, medida da circunferência da cintura e da quantidade de gordura corporal em relação ao seu peso. Além disso, será solicitado que o Sr.(a) faça uma coleta de urina de 24 horas para avaliarmos as quantidades dos minerais (zinco e selênio) que o Sr. (a) está eliminando pela urina. Também solicitaremos que o Sr. (a) compareça em jejum de 10 horas no dia marcado para que seja colhido 15 mL do seu sangue. Ressaltamos que serão utilizadas seringas e agulhas estéreis e descartáveis, e que o risco é considerado mínimo, pelo desconforto da dor local e do jejum. Para contornar este risco, providenciaremos um profissional competente e lanche para logo após a coleta do sangue. Avaliaremos o seu DNA para saber se existem alterações que possam influenciar nas quantidades dos minerais zinco e selênio no seu corpo, do hormônio insulina, de açúcar e de gorduras presentes no seu sangue. O material obtido do seu sangue será utilizado somente para os fins do objetivo desta pesquisa. Também avaliaremos a sua ingestão de alimentos por meio de recordatórios alimentares de 24 horas, que consistem em perguntar o que o Sr.(a) comeu no dia anterior a entrevista. Estas perguntas sobre sua alimentação serão feitas também em outros dois dias por telefone, caso o Sr.(a) aceite.

Tanto o Sr. (a) quanto os demais voluntários receberão todas as orientações necessárias para a realização da pesquisa. Além disso, é seu direito saber informações sobre o andamento da pesquisa, procedimentos utilizados, riscos e benefícios relacionados a esta pesquisa, em

qualquer fase do estudo, a fim de esclarecer eventuais dúvidas. O Sr.(a) também receberá os resultados das análises realizadas.

Os resultados desta pesquisa poderão trazer benefícios direto para a população com diabetes mellitus tipo 2, pois existem estudos que mostram que os minerais zinco e selênio ajudam na manutenção de algumas funções do organismo. O Sr.(a) receberá orientações nutricionais, visando a melhoria na ingestão alimentar de zinco e selênio, pois esses nutrientes contribuem para o bom funcionamento do seu corpo. Além disso, conhecer se existe ou não alterações no DNA, ajudará a elaborar formas para que sua alimentação promova maior proteção ao seu organismo. A participação tanto dos voluntários com diabetes mellitus tipo 2 quanto dos voluntários sem a doença será de grande importância para o maior conhecimento da doença e do seu tratamento nutricional.

A sua decisão de participar é livre, não haverá despesa financeira para o Senhor (a) e também não haverá pagamento para participar da pesquisa. Deve ser ressaltado que a sua participação na pesquisa poderá ser desfeita em qualquer momento que achar conveniente, não haverá prejuízo para o Senhor (a), mesmo depois de aceito e assinado o termo. Ressaltamos que todos os seus direitos serão preservados.

Ao fazer as análises dos resultados, os nomes dos participantes serão substituídos por números, ou seja, não haverá divulgação dos nomes e o sigilo será mantido.

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, o senhor (a) poderá entrar em contato com as pesquisadoras Paula Nascimento Brandão Lima no email: paulanblima@gmail.com ou telefone: (79) 99126-5535; Gabrielli Barbosa de Carvalho no email: gabicarvalho_31@hotmail.com ou telefone: (79) 99198-8652; e com a coordenadora da pesquisa: Liliane Viana Pires no email: lvianapires@gmail.com ou telefone: (79) 99155-1300. Também no endereço a seguir: Departamento de Nutrição - Universidade Federal de Sergipe - Cidade Universitária “Prof. José Aloísio de Campos”: Av. Marechal Rondon, s/n Jardim Rosa Elze - CEP 49100-000 - São Cristóvão/SE.

Caso seja observado qualquer risco ou danos significativos aos participantes da pesquisa, este estudo será imediatamente suspenso.

CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

_____ (SE), _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa ou
responsável legal

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos dessa pesquisa, favor entrar em contato com: Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Sergipe – Rua Cláudio Batista s/nº – Bairro: Sanatório – Aracaju/SE – CEP: 49.060-110/ Telefone: (79)2105-1805/e-mail: cephu@ufs.br.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE
ARACAJÚ/ UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SERGIPE/ HU-



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência de variações genéticas em genes de enzimas antioxidantes e do transportador de zinco-8 no estado nutricional relativo ao zinco e selênio e nos marcadores metabólicos em pacientes com diabetes mellitus tipo 2

Pesquisador: LILIANE VIANA PIRES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 51413715.8.0000.5546

Instituição Proponente: FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Patrocinador Principal: CNPQ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.370.831

Apresentação do Projeto:

O projeto pertence ao programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da UFS, e pretende compreender a atividade biológica do zinco e selênio em humanos portadores de doenças crônicas não transmissíveis, como a diabetes mellitus. Esta doença tem relação com o estresse oxidativo, gerado pela hiperglicemia. Enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (dependente de zinco), e a glutathione peroxidase (dependente de selênio), estão implicadas na redução do estresse oxidativo. tendo em vista que, alterações no transporte de zinco (ZnT8) para as células do pâncreas podem comprometer o controle glicêmico de indivíduos com diabetes, por deficiência na síntese, secreção e armazenamento de insulina, serão estudados os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), em genes que codificam as proteínas citadas.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a influência dos SNPs rs2234694 no gene da SOD1 e rs11558471, no gene do transportador de zinco (ZnT8); e rs1050450 no gene da GPx1 sobre o estado nutricional relativo ao zinco e selênio, respectivamente, na atividade de enzimas antioxidantes (SOD e GPx) e nos marcadores metabólicos em pacientes com diabetes mellitus tipo 2.

Endereço: Rua Cláudio Batista s/n°

Bairro: Sanatório

UF: SE

Município: ARACAJU

CEP: 49.060-110

Telefone: (79)2105-1805

E-mail: cephu@ufs.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE
ARACAJÚ/ UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SERGIPE/ HU-



Continuação do Parecer: 1.370.831

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O risco é considerado mínimo, pela desconforto da dor local, e do jejum, para contornar este risco, providenciaremos um profissional competente, e lanche para logo após a coleta do sangue.

Benefícios:

O benefício direto para a população com diabetes tipo 2, será a melhoria das funções orgânicas por meio da orientação alimentar, priorizando a ação dos minerais que exercem um efeito protetor sobre o organismo, equilibrando e contribuindo para o bom funcionamento do mesmo. E o benefício indireto será um melhor controle da doença, pelo conhecimento da presença de polimorfismos, em genes responsáveis para manutenção do sistema de defesa antioxidante.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

É uma Pesquisa relevante, com estudo transversal envolvendo 100 participantes com Diabetes e 100 controles, que serão submetidos a uma coleta de sangue e de urina de 24h, além da avaliação antropométrica e do consumo alimentar de zinco, selênio e macronutrientes. A avaliação antropométrica contará com determinação da composição corporal, e das aferições de peso, estatura, circunferência da cintura e bioimpedância. As informações sobre o consumo alimentar serão obtidas por meio de recordatório alimentar de 3 dias, destes, um dia referente ao final de semana. Também será realizada a coleta do material biológico para caracterizar os pacientes com diabetes mellitus tipo 2, quanto à presença dos polimorfismos: rs2234694; rs1050450; rs11558471. O estado nutricional relativo ao zinco e selênio, as enzimas antioxidantes (SOD e GPX), a concentração de insulina, os marcadores glicêmicos e do perfil lipídico serão estudados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos adequados.

Recomendações:

Não se aplicam.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplicam.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

CEP: 49.060-110

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)2105-1805

E-mail: cephu@ufs.br

**HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE
ARACAJÚ/ UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SERGIPE/ HU-**



Continuação do Parecer: 1.370.831

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_416641.pdf	10/12/2015 17:20:59		Aceito
Outros	Carta_ao_CEP_Dezembro_2015.pdf	10/12/2015 17:20:39	LILIANE VIANA PIRES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Instrumento_Projeto_Universal_2015_Reestruturado.pdf	10/12/2015 17:19:14	LILIANE VIANA PIRES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DETALHADO_CEP_UNIVERSAL_2015.pdf	27/11/2015 17:26:40	LILIANE VIANA PIRES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Instrumento_Projeto_Universal_2015.pdf	27/11/2015 13:41:46	LILIANE VIANA PIRES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_de_colaboracao_Paula_2015.pdf	25/11/2015 13:50:45	LILIANE VIANA PIRES	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Projeto_Universal_2015_Lilliane.pdf	24/11/2015 09:28:23	LILIANE VIANA PIRES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_de_colaboracao_Lorena_2015.pdf	24/11/2015 09:20:14	LILIANE VIANA PIRES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_de_colaboracao_Gabi_2015.pdf	24/11/2015 09:20:00	LILIANE VIANA PIRES	Aceito
Declaração do Patrocinador	TermosDeConcessao_UNIVERSAL_2015.pdf	23/11/2015 15:59:40	LILIANE VIANA PIRES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARACAJU, 16 de Dezembro de 2015

Assinado por:
Anita Hermínia Oliveira Souza
(Coordenador)

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

CEP: 49.080-110

UF: SE **Município:** ARACAJU

Telefone: (79)2105-1805

E-mail: cephu@ufs.br

ANEXO B – ARTIGO PUBLICADO (PRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO)

Biometals
DOI 10.1007/s10534-017-9996-y



Zinc's role in the glycemic control of patients with type 2 diabetes: a systematic review

Gabrielli Barbosa de Carvalho · Paula Nascimento Brandão-Lima · Carla Soraya Costa Maia ·
Kiriaque Barra Ferreira Barbosa · Liliane Viana Pires

Received: 26 December 2016 / Accepted: 22 January 2017
© Springer Science+Business Media New York 2017