UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

LIVIA FERNANDES DE LIMA

**Participação do manganês, zinco, selênio e cobre no perfil
metabólico e controle glicêmico de pacientes com e sem uso de
insulina**

Ribeirão Preto
2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

LIVIA FERNANDES DE LIMA

**Participação do manganês, zinco, selênio e cobre no perfil
metabólico e controle glicêmico de pacientes com e sem uso de
insulina**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Investigação Biomédica
Orientador: Prof. Dr. Anderson Marliere Navarro

Ribeirão Preto
2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Lima, Livia Fernandes

Participação do manganês, zinco, selênio e cobre no perfil metabólico e controle glicêmico de pacientes com e sem uso de insulina/ Livia Fernandes de Lima; orientador Anderson Marliere Navarro – Ribeirão Preto, 2020.
81f. : il.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (USP)
Área de Concentração: Investigação Biomédica

1. Diabetes Mellitus. 2. Minerais. 3. Estresse oxidativo. 4. Perfil inflamatório.

Nome: LIMA, Livia Fernandes

Participação do manganês, zinco, selênio e cobre no perfil metabólico e controle glicêmico de pacientes com e sem uso de insulina

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Investigação Biomédica.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

A Deus por sempre me iluminar na busca do melhor caminho. Aos meus pais Maria Isabel e José Edson, por sempre estar do meu lado e incentivar-me a cada passo, principalmente minha mãe que nunca deixou de priorizar-me em sua vida. Ao meu marido, João Rafael, por me confortar e auxiliar nos momentos bons e ruins. A minha avó Santa, que sempre rezou por mim. *In memoriam* aos meus avós, Luis e Luiza e Nininho, os quais, embora não estejam mais comigo, continuam olhando por mim como fizeram a vida toda.

Agradecimientos

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) pela oportunidade de realização do Doutorado.

Ao Prof. Dr. Anderson Marliere Navarro pelo tempo de convivência, orientação e exemplo de profissionalismo que muito contribuiu para meu crescimento científico e profissional.

Aos voluntários pela participação e pela compreensão o que o tornou este estudo possível.

Aos funcionários da Unidade de Pesquisa Clínica (UPC) pelo trabalho realizado durante o período de coleta.

A professora Dra. Maria Cristinas Foss que nos permitiu trabalhar em seu ambulatórios de Diabetes.

Ao Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior por colocar à disposição o laboratório de Nutrição e Metabolismo.

À técnica Paula Payão Ovidio do laboratório de Nutrição e Metabolismo pela ajuda e trabalho realizados no período de análise do estudo.

Ao Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior por colocar à disposição o laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP- USP).

À técnica Vanessa Cristina de Oliveira Souza do laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais pela ajuda e trabalho realizados no período de análise do estudo.

À professora Vivian Suen pelo auxílio nas dosagens de vitaminas.

Ao Emerson Quirino de Oliveira, secretário da Pós Graduação, por toda orientação e compreensão durante os processos necessários desde a inscrição até defesa da tese.

À minha amiga Ligia que foi essencial para coleta das amostras e tornou essa etapa mais feliz e agradável.

Aos amigos, Amanda, Ligia, Rebeca, Mariana e Letícia, pelo apoio e carinho essenciais à vida.

À minha família, principalmente minha mãe, Maria Isabel Mataqueiro, que tanto me incentivou na busca do crescimento pessoal e profissional.

Ao meu marido, João Rafael Medeiros Garcia, pela compreensão da minha ausência em vários momentos e colaboração durante todo processo do estudo.

A todos que de alguma forma contribuíram no desenvolvimento deste trabalho.

À Deus por sempre iluminar meus caminhos.

RESUMO

LIMA, L. F. **Participação do manganês, zinco, selênio e cobre no perfil metabólico e controle glicêmico de pacientes com e sem uso de insulina.** 2020. 81 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Diabetes Mellitus (DM) é uma patologia caracterizada pela constante hiperglicemia e pode apresentar complicações como processo inflamatório e desenvolvimento do estresse oxidativo, o qual é controlado por alguns minerais como zinco, manganês, ferro, cobre e selênio. O desequilíbrio desses micronutrientes pode aumentar o estresse oxidativo e contribuir para aumento da resistência à insulina e desenvolvimento das complicações diabéticas. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito dos micronutrientes manganês, zinco, selênio e cobre no perfil metabólico e consequentemente controle glicêmico em pacientes com DM tipo 2 com e sem uso de insulina. Para isso foram selecionados 67 pacientes no ambulatório de DM do HCRP, os quais foram separados em dois grupos: com uso de insulina (GCI; n=34) e sem uso de insulina (GSI; n=33). Dos voluntários foram analisados dados antropométricos, registros alimentares de três dias, exames bioquímicos referentes ao perfil clínico, inflamatório e estresse oxidativo e concentrações séricas e eritrocitárias de minerais pelo método de ICP-MS. Para análise dos dados, as variáveis independentes tiveram o teste T-Student aplicado ou Mann-Whitney e para as variáveis categóricas utilizou-se o Teste exato do X^2 . Na avaliação das correlações entre as variáveis utilizou-se o cálculo do coeficiente de correlação de Spearman. As diferenças significativas foram obtidas com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Dos 67 pacientes analisados com DM2 a maioria (90%) encontrava-se sobrepeso ou obesidade. Estes pacientes em média apresentavam elevadas concentrações séricas de glicemia, hemoglobina glicada e triglicerídeos e deficiência sérica de selênio (88,27 $\mu\text{g/L}$) e cálcio (7,61mg/dL). Na análise das enzimas envolvidas no estresse oxidativo verificou-se um aumento no nível sérico do MDA (malonaldeído) e diminuição da atividade da GPX (glutathione peroxidase). Na comparação entre os grupos verifica-se que o GCI apresenta percentual do sexo feminino significativamente maior ($X^2=4,35$; $p=0,04$), idades superiores, maiores concentrações séricas de glicemia e hemoglobina glicada. Em relação aos minerais, GCI apresenta maiores concentrações de zinco (14,71 $\mu\text{g/L}$; $p=0,001$), manganês (23,34 $\mu\text{g/L}$; $p=0,01$) e ferro eritrocitário (727,6 mg/L; $p=0,008$) e menores concentrações de cobre eritrocitário (0,012 $\mu\text{g/dL}$; $p=0,012$) do que o GSI. Além disso, o GCI apresenta níveis significativamente maiores de MDA (7,46nmol/mL; $p < 0,0001$), GSSG (30,97nmol/mL; $p=0,004$), GPX (33,63U/mL; $p < 0,0001$) e menores de FRAP (0,97nmol/mL; $p=0,03$) e peptídeo C (1776,22pg/mL; $p=0,0001$) do que o GSI. Pacientes com DM2 apresentam um maior poder oxidativo e menor poder antioxidante, entretanto, os pacientes com uso de insulina demonstraram uma melhor defesa antioxidante do que os pacientes sem insulina. A via de ativação do estresse oxidativo parece depender do perfil de micronutrientes que são cofatores de enzimas antioxidantes e portanto, o perfil metabólico do paciente diabético parece ser influenciado pelo controle glicêmico, o qual dependerá do estilo de vida do paciente associado ao tipo de tratamento e também pelo perfil de micronutrientes, principalmente o zinco e manganês.

Palavras chave: *Diabetes Mellitus*, minerais, estresse oxidativo, perfil inflamatório

Abstract

ABSTRACT

LIMA, L. F. Manganese, zinc, selenium and copper involvement in the metabolic profile and glycemic control of patients with and without use of insulin. 2020. 81p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Diabetes Mellitus (DM) is a pathology characterized by constant hyperglycemia and can present complications such as inflammation and the development of oxidative stress, which is controlled by some minerals such as zinc, manganese, iron, copper and selenium. The imbalance of these micronutrients can increase oxidative stress and contribute to increased insulin resistance and the development of diabetic complications. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of micronutrients manganese, zinc, selenium and copper on the metabolic profile and consequently glycemic control in patients with type 2 DM with and without use of insulin. For this, 67 patients were selected at the DM outpatient clinic of the HCRP, who were separated into two groups: using insulin (GCI; n = 34) and without using insulin (GSI; n = 33). Anthropometric data, three-day dietary records, biochemical tests related to the clinical, inflammatory and oxidative stress profiles, and serum and erythrocyte concentrations of minerals were analyzed by the volunteers using the ICP-MS method. For data analysis, the independent variables had the T-Student test applied or Mann-Whitney and for the categorical variables the exact X2 test was used. In assessing the correlations between the variables, Spearman's correlation coefficient was used. Significant differences were obtained with a significance level of 5% ($p < 0.05$). Of the 67 patients analyzed with DM2, the majority (90%) were overweight or obese. These patients on average had high serum concentrations of glycemia, glycated hemoglobin and triglycerides and serum selenium deficiency ($88.27 \mu\text{g} / \text{L}$) and calcium ($7.61\text{mg} / \text{dL}$). In the analysis of the enzymes involved in oxidative stress, there was an increase in the serum level of MDA (malonaldehyde) and a decrease in the activity of GPX (glutathione peroxidase). When comparing the groups, it can be seen that the GCI presents a significantly higher percentage of females ($X^2 = 4.35$; $p = 0.04$), older ages, higher serum concentrations of glycemia and glycated hemoglobin. Regarding minerals, GCI has higher concentrations of zinc ($14.71\mu\text{g} / \text{L}$; $p = 0.001$), manganese ($23.34\mu\text{g} / \text{L}$; $p = 0.01$) and erythrocyte iron ($727.6 \text{ mg} / \text{L}$; $p = 0.008$) and lower concentrations of erythrocyte copper ($0.012 \mu\text{g} / \text{dL}$; $p = 0.012$) than GSI. In addition, GCI has significantly higher levels of MDA ($7.46 \text{ nmol} / \text{mL}$; $p < 0.0001$), GSSG ($30.97 \text{ nmol} / \text{mL}$; $p = 0.004$), GPX ($33.63\text{U} / \text{mL}$; $p < 0, 0001$) and smaller than FRAP ($0.97 \text{ nmol} / \text{mL}$; $p = 0.03$) and C-peptide ($1776.22\text{pg} / \text{mL}$; $p = 0.0001$) than GSI. Patients with DM2 have a higher oxidative power and less antioxidant power, however, patients with insulin use demonstrated a better antioxidant defense than patients without insulin. The oxidative stress activation pathway seems to depend on the profile of micronutrients that are cofactors of antioxidant enzymes and therefore, the metabolic profile of the diabetic patient appears to be influenced by glycemic control, which will depend on the patient's lifestyle associated with the type of treatment and also due to the micronutrient profile, mainly zinc and manganese.

Keywords: Diabetes Mellitus, minerals, oxidative stress, inflammatory profile

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1: Relação dos 10 países com maior número de pessoas com diabetes (entre 20 e 79 anos) e respectivo intervalo de confiança de 95%, em 2017, com projeções para 2045)

-----31

Tabela 2: Dados bioquímicos de 67 pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2 em seguimento ambulatorial na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto -----54

Tabela 3: Avaliação de estresse oxidativo e perfil inflamatório de 67 pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2 em seguimento ambulatorial na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.-----55

Tabela 4: Concentrações séricas e eritrocitárias dos minerais selênio, zinco, cobre, magnésio, cálcio e ferro de 67 pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2 em seguimento ambulatorial na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. -----56

Tabela 5: Características referentes à ingestão alimentar de 67 pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2 em seguimento ambulatorial na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto obtidas por meio de 3 registros alimentares. -----57

Tabela 6: Comparação de características gerais e exames bioquímicos entre pacientes com DM2 com uso de antidiabético oral como tratamento (GSI) e aqueles que utilizam hormônio da insulina como tratamento (GSI). -----58

Tabela 7: Comparação do perfil de estresse oxidativo e inflamatório entre pacientes com DM2 com uso de antidiabético oral como tratamento (GSI) e aqueles que utilizam hormônio da insulina como tratamento (GSI). -----59

Tabela 8: Comparação dos níveis de minerais séricos e eritrocitários entre pacientes com DM2 com uso de antidiabético oral como tratamento (GSI) e aqueles que utilizam hormônio da insulina como tratamento (GSI).-----60

Tabela 9: Comparação da ingestão alimentar obtido por meio de 3 registros alimentares entre pacientes com DM2 com uso de antidiabético oral como tratamento (GSI) e aqueles que utilizam hormônio da insulina como tratamento (GSI). -----61

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1: Mecanismo simplificado da arteriosclerose acelerada em pacientes com diabetes -----33

Figura 2: Ação do peróxido de hidrogênio na regulação da ação da insulina-----38

Gráfico 1: Classificação do IMC de pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2 em seguimento ambulatorial na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-----54

Gráfico 2: Classificação do IMC de pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2 sem uso de insulina em seguimento ambulatorial na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-----57

Gráfico 3: Classificação do IMC de pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2 com uso de insulina em seguimento ambulatorial na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-----57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGE – Produtos finais de glicação avançada

Ca – Cálcio

CAOT – Capacidade antioxidante total

CAT – Enzima catalase

Cu – Cobre

DIP – Doença pulmonar intersticial

DM – *Diabetes Mellitus*

DM1 – Diabetes tipo 1

DM2 – Diabetes tipo 2

DMG – Diabetes Gestacional

DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crônica

Fe – Ferro

FRAP – Ferric reducing antioxidante power

GCI – Grupo com insulina

GLUT – 4 – Transportador de glicose regulados por insulina 4

GPX – Glutathione peroxidase

GSH – Glutathione

GSI – Grupo sem insulina

GSIS -Secreção da insulina estimulada pela glicose

GSSG – Glutathione oxidada

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HCFMRP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

HCM - Hemoglobina corpuscular média

HDL – lipoproteína de alta densidade

ICP – MS – espectrometria de fonte de plasma indutivamente acoplado

IL - 1B – Interleucina 1B

IL -6 – Interleucina 6

IMC – Índice de massa corporal

LDL – lipoproteína de baixa densidade

MDA – malondialdeído

Mg – Magnésio

Mn – Manganês

MODY – Maturity onset diabets of the Young

NO – Óxido nítrico

O_2^- - Superóxido

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – Proteína C reativa

PTEN – Fosfatidilinositol – 3,4,5 – trifosfato – 3 – fosfatase

PTP-1B- Proteína tirosina fosfatase

Redox – Redução e oxidação

ROS – Espécie reativa de oxigênio

Se- Selênio

SOD – Superóxido dismutase

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

TNF- α – Fator de necrose tumoral

TOTG – Teste oral de tolerância a glicose

USP – Universidade de São Paulo

VCM – Volume corpuscular médio

Zn – Zinco

Sumário

Dedicatória.....	5
Agradecimentos.....	7
Resumo.....	10
Abstract.....	12
Listas.....	14
Sumário.....	19
1. INTRODUÇÃO.....	22
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	26
2.1 Diabetes Mellitus (DM).....	28
2.1.1 Definição	28
2.1.2 Etiologia	28
2.1.3 Classificação	29
2.1.4 Epidemiologia	30
2.1.5 Consequências clínicas e metabólicas.....	31
2.2 Perfil inflamatório e DM.....	34
2.3 Estresse oxidativo e DM.....	35
2.4 Micronutrientes e DM.....	38
2.5 Justificativa.....	40
3. HIPÓTESE	41
4. OBJETIVO	43
4.1 Objetivo geral.....	44
4.2 Objetivos específicos	44
5. METODOLOGIA	45

5.1 Considerações Éticas.....	46
5.2 População do estudo.....	46
5.2.1 Critérios de inclusão:.....	46
5.2.2 Critérios de exclusão:.....	47
5.3 Cálculo amostral.....	47
5.4 Grupo de estudo	47
5.5 Delineamento do estudo.....	48
5.5.1 Coleta do material.....	48
5.6 Avaliação antropométrica	49
5.7 Avaliação da ingestão alimentar	49
5.8 Análise bioquímica	50
5.9 Análise do estresse oxidativo	50
5.10 Análise do perfil inflamatório	50
5.11 Análise dos micronutrientes	51
5.12 Análise estatística	51
6. RESULTADOS.....	53
6.1 Características gerais.....	53
6.2 Comparação entre grupos de acordo com o tratamento	56
7. DISCUSSÃO	61
8. CONCLUSÃO	72
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXOS	81

1 INTRODUÇÃO

Diabetes Mellitus (DM) é constituída por um conjunto de distúrbios metabólicos devido à constante hiperglicemia ocasionada pela deficiente produção e/ou ação do hormônio insulina, os quais em longo prazo geram complicações no organismo (SBD, 2019). Essa patologia é classificada de acordo com a etiologia e pode ser dividida em 4 classes clínicas: DM tipo 1, DM tipo 2, DM gestacional e outros tipos específicos de DM (ADA, 2009).

O aumento da expectativa de vida associado ao crescimento da prevalência de obesidade e sedentarismo da população, intensa urbanização, transição epidemiológica e nutricional contribuem para o aumento do número de indivíduos diabéticos (SBD, 2019). Alguns estudos consideram a DM como uma condição inflamatória que pode ser caracterizada por concentrações elevadas de reagentes de fase aguda no plasma, como a proteína C reativa (PCR), interleucina 6 (IL-6), interleucina 1B (IL-1B) e fator de necrose tumoral (TNF- α) (DONATH; SHOELSON, 2011; LIU et al., 2016). Além disso, essa condição apresenta implicações em termos de patogenia e complicações da doença (ALZAMIL, 2020).

Uma das complicações da DM é o aumento no estresse oxidativo. Há cada vez mais evidências, que em certos estágios patológicos o aumento na produção e/ ou eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) podem desempenhar um papel crucial na determinação da lesão tecidual (IGHODARO, 2018).

A hiperglicemia em paciente com DM tem sido associada à elevação de ROS (KORNHAUSER et al., 2008), que é principalmente gerado na mitocôndria no processo de formação de energia e posteriormente controlado pelas enzimas antioxidantes, as quais tanto em excesso quanto em deficiência podem afetar a glicemia (ZHOU; HUANG; LEI, 2013).

O nível de produtos de redução imediata do metabolismo de oxigênio é controlado por vários mecanismos de defesa antioxidante classificados em enzimáticos, como por exemplo a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) e glutathione oxidada (GSSG) e não enzimáticos, como a vitamina E e a proteína glutathione (GSH). O desequilíbrio desses componentes pode aumentar o estresse oxidativo e contribuir para aumento da resistência à insulina e desenvolvimento das complicações diabéticas (FORTE et al., 2013).

O estresse oxidativo pode comprometer tanto a secreção da insulina como a ação deste hormônio, ou seja, mecanismos envolvidos na patologia do DM (IGHODARO, 2018). De acordo com Rendra et al. (2019), o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) é reconhecido por contribuir significativamente com aumento de resposta inflamatória, resistência insulínica e DM2.

A principal fonte de geração de ROS ocorre na mitocôndria no processo de formação de energia. A transferência de elétrons para o oxigênio molecular resulta na formação do superóxido (O_2^-), o qual é sintetizado pela NADPH oxidase (REHMAN; AKASH, 2017). Este produto é transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela SOD e posteriormente controlado pelas enzimas antioxidantes, os quais tanto em excesso quanto em deficiência podem afetar a glicemia (ZHOU; HUANG; LEI, 2013).

Segundo Steinbrenner (2013), o H_2O_2 em baixas concentrações controla a fosforilação do receptor de insulina, estimula o aumento da concentração de cálcio (Ca) intracelular e a secreção de insulina além de agir na inativação das fosfatases contra-reguladoras de insulina, proteína tirosina fosfatase (PTP-1B) e fosfatidilinositol-3,4,5 – trifosfato- 3- fosfatase (PTEN), participando como mensageiro secundário na ação e produção deste hormônio.

O controle na produção de H_2O_2 nas células pancreáticas ocorre pela ação da GPX, a qual é ativada pela presença do mesmo (ZHOU; HUANG; LEI, 2013). O excesso deste antioxidante poderia diminuir a concentração de H_2O_2 e consequentemente atenuar a sinalização de insulina, ao mesmo tempo em que a falta deste, aumentaria muito o H_2O_2 e diminuiria a secreção de insulina estimulada pela glicose (GSIS). Dessa forma, é necessário um balanço entre ROS e antioxidantes (STEINBRENNER, 2013).

Alguns antioxidantes são influenciados por microelementos como selênio (Se), zinco (Zn), magnésio (Mg) e cobre (Cu) (AYDIN et al, 2001; KORNHAUSER et al., 2008; REHMAN; AKASH, 2017). Indivíduos portadores de DM podem apresentar deficiência de vitaminas e minerais devido ao aumento na excreção urinária destes nutrientes, diminuição da capacidade intestinal de absorção e ingestão alimentar alterada, muitas vezes abaixo do necessário, o que pode influenciar no controle oxidativo (SBD 2019).

O Mg além de possuir relação com a modulação da síntese, secreção e ação de da insulina, é um cofator de muitas enzimas relacionadas a integração metabólica (RODRIGUES; MELO; DOMINGUETI, 2020). O Ca tem sido associado com o mal

funcionamento das células β , redução da sensibilidade à insulina e inflamação sistêmica. Este nutriente age como um mensageiro secundário e por isso apresenta importante papel na sinalização da ação da insulina em tecidos responsivos a este hormônio (SIMIĆ et al., 2017).

Cu é um componente crucial em uma variedade de metaloenzimas e apresenta um importante papel na reação de oxidação-redução. Ele é necessário para ação catalítica da SOD, envolvida no estresse oxidativo (ZHANG et al., 2017). De acordo com Forte et al. (2013) a deficiência desse nutriente pode contribuir com intolerância à glicose em pacientes com DM.

O Zn é um cofator de enzimas implicadas no metabolismo da glicose e possui vários alvos potenciais para modular atividade da insulina no momento da síntese, estocagem e secreção (FAURE, 2003). Além disso, ele também pode participar como um componente integral de várias enzimas antioxidantes, principalmente a SOD, que estão envolvidos na patologia da DM (FORTE et al., 2013).

Assim como o cobre e o zinco, o manganês (Mn) também participa do processo de estresse oxidativo porque ele é um nutriente essencial para formação da Mn-SOD, envolvida no estresse oxidativo mitocondrial (LI; YANG, 2018). Além disso, esse mineral está envolvido na regulação do metabolismo de glicose e lipídio em humanos (FORTE et al., 2013).

Já o Se possui várias funções no organismo humano, sendo a mais conhecida o efeito antioxidante. Tanto as formas orgânicas (selenocisteína e selenometionina), quanto as inorgânicas (selenito e selenato) contribuem para a síntese de selenoproteínas, como por exemplo a GPX, que catalisa a redução de H_2O_2 em água e oxigênio, bem como catalisa a redução de radicais de peróxido em álcoois e oxigênio (NAVARRO-ALARCON; LOPEZ-MARTÍNEZ, 2000). Alguns trabalhos experimentais, demonstraram que a forma orgânica do Se, interferem na síntese de insulina e posterior concentração da glicemia através do controle da produção de H_2O_2 e processo de ativação e/ou inibição de algumas proteínas chaves para controle do metabolismo de carboidrato (ZHOU et al., 2013; STEINBRENNER, 2013).

Embora alguns mecanismos de controle da síntese de insulina em relação aos micronutrientes tenham sido demonstrados, esses estudos, além de não terem suas teorias totalmente elucidadas, foram realizados em animais e há poucos trabalhos em humanos relacionando estes micronutrientes, principalmente selênio, zinco, manganês, ferro e cobre e perfil antiinflamatório, estresse oxidativo e controle glicêmico.

Além disso, sabe-se que pacientes com DM quando tratados com insulina melhoram seu controle glicêmico e alteram o seu perfil de estresse oxidativo (RADERMECKER et al., 2009). Porém, poucos estudos mostram a relação da aplicação da insulina no metabolismo de nutrientes e perfil inflamatório e estresse oxidativo e controle da glicemia.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *DIABETES MELLITUS*

2.1.1 Definição

Diabetes Mellitus (DM) é definida por um conjunto de distúrbios metabólicos caracterizados pela persistente hiperglicemia devido à deficiente produção e/ou ação do hormônio insulina, os quais em longo prazo geram complicações no organismo (SBD, 2019).

A hiperglicemia é caracterizada pelo aumento da concentração da glicose sanguínea. De acordo com a American Diabetes Association – ADA (2019) os critérios para diagnóstico de DM são glicemia de jejum acima de 126 mg/dL, sendo o exame realizado após jejum calórico de pelo menos 8 horas; no Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) glicemia maior ou igual a 200 mg/dL duas horas após sobrecarga de 75g de glicose; valores de hemoglobina glicada igual ou superior a 6,5%.

Quando os valores analisados estão acima dos valores de referência, porém abaixo dos valores de diagnóstico de DM, denomina-se pré-diabetes. Nestes casos há uma resistência à insulina, a qual pode evoluir para DM na ausência de medidas profiláticas aos fatores de riscos modificáveis (SBD, 2019).

2.1.2 Etiologia

A etiologia do DM ainda não é bem elucidada, mas acredita-se que as principais causas dos diferentes tipos dessa patologia são genéticas, biológicas e ambientais. (ADA, 2019). Os fatores de risco mais comuns nas diferentes classificações do DM são idade, história familiar, raça, etnia, história de doença cardiovascular e hipertensão arterial, alterações no lipidograma, síndrome do ovário policístico, sedentarismo, hábitos dietéticos, sobrepeso e obesidade, endocrinopatias, medicamentos e alguns tipos de infecções (SBD, 2019).

2.1.3 Classificação

A classificação do DM é determinada de acordo com as causas e pode ser categorizada em quatro tipos: DM tipo 1, DM tipo 2, DM gestacional (DMG) e outras (ADA, 2019).

O DM tipo 1 ocorre principalmente devido à destruição de células autoimunológicas, em que na maior parte das vezes leva a uma deficiência de insulina. Trata-se de uma doença autoimune, poligênica que ocorre devido à destruição das células β pancreáticas. Além da predisposição genética, este tipo de DM pode ser desencadeado por fatores ambientes como infecções virais, componentes dietéticos e determinadas composições da microbiota intestinal (ADA, 2019; SBD, 2019).

O DM tipo 2 apresenta uma etiologia multifatorial e complexa ainda não completamente elucidada, que abrange fatores genéticos e ambientais. Esta patologia apresenta características poligênicas, com forte herança familiar e contribuições do meio ambiente, principalmente em relação a hábitos dietéticos e inatividade física, as quais relacionam-se com a obesidade. Esta patologia ocorre devido a uma perda progressiva da secreção do hormônio insulina pelas células β pancreática relacionada à resistência à insulina (ADA, 2019; SBD, 2019).

Outro tipo de DM é a gestacional (DMG), a qual é diagnosticada no segundo ou terceiro trimestre da gestação que claramente não era DM evidente antes da gravidez. Durante a gestação a placenta produz hormônios hiperglicemiantes e enzimas que degradam a insulina, o que aumenta a resistência à insulina e pode evoluir para uma disfunção das células β (ADA, 2019; SBD, 2019).

Por fim, outros tipos de DM envolvem outras causas menos comuns que apresentam uma grande variação na apresentação clínica e dependem da alteração de base que ocasionou o distúrbio glicêmico. Alguns exemplos são o Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY), ocasionado por síndromes monogênica do DM; doenças do pâncreas exócrino, como fibrose cística e pancreatite; DM induzido por drogas ou produtos químicos, como o uso de glicocorticoide, tratamento de HIV/AIDS, quimioterapia ou transplantes de órgãos; endocrinopatias, como Síndrome de Cushing e acromegalia; dentre outros (ADA, 2019; SBD, 2019).

2.1.4 Epidemiologia

A proporção de pessoas que apresentam alterações em seus exames bioquímicos necessários para que sejam diagnosticados com *Diabetes Mellitus* aumentou nos últimos anos (ALI et al., 2013). A Federação Internacional de Diabetes (International Diabetes Federation IDF), em 2017, estimou que em uma população entre 20 a 79 anos 8,8% apresentava esta patologia. Se estas proporções persistirem, estima-se que em 2045 o número de pessoas com DM será superior a 628,6 milhões e localizados, principalmente, em países em desenvolvimento como demonstrado na Tabela 1 (IDF, 2017).

Tabela 1: Relação dos 10 países com maior número de pessoas com diabetes (entre 20 e 79 anos) e respectivo intervalo de confiança de 95%, em 2017, com projeções para 2045.

Posição	País	2017 Número de pessoas com DM (milhões)	Posição	País	2045 Número de pessoas com DM (milhões)
1	China	114,4,6 (104,1 a 146,3)	1	Índia	134,3 (103,4 a 165,2)
2	Índia	72,7 (55,5 a 90,2)	2	China	119,8 (86,3 a 149,7)
3	Estados Unidos	30,2 (28,8 a 31,8)	3	Estados Unidos	35,6 (33,9 a 37,9)
4	Brasil	12,5 (11,4 a 13,5)	4	México	31,8 (11 a 22,6)
5	México	12,0 (6,0 a 14,3)	5	Brasil	20,3 (18,6 a 22,1)
6	Indonésia	10,3 (8,9 a 11,1)	6	Egito	16,7 (9 a 19,1)
7	Federação Russa	8,5 (6,7 a 11)	7	Indonésia	16,7 (14,6 a 18,2)
8	Egito	8,2 (4,4 a 9,4)	8	Paquistão	16,1 (11,5 a 23,2)
9	Alemanha	7,5 (6,1 a 8,3)	9	Bangladesh	13,7 (11,3 a 18,6)
10	Paquistão	7,5 (5,3 a 10,9)	10	Turquia	11,2 (10,1 a 13,3)

Fonte: International Diabetes Federation (2017).

O aumento da prevalência desta patologia decorre de diversos fatores, sendo eles: intensa urbanização, transição epidemiológica e nutricional, aumento do estilo de vida sedentário e do excesso de peso, alteração demográfica com envelhecimento populacional e maior sobrevida dos pacientes com DM (SBD, 2019).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima-se que a hiperglicemia é o terceiro fator da causa de mortalidade prematura, em importância (WHO, 2009). Em 2015, aproximadamente 5 milhões de pessoas entre 20 e 79 anos morreram por causa da DM, o que representa 10,7% da mortalidade mundial por todas as causas (SBD, 2019).

Sendo assim, esta patologia não apresenta somente uma carga financeira para os indivíduos com DM e suas famílias, como também apresenta um alto impacto nos sistemas de saúde, principalmente por causa das complicações crônicas consequentes da doença (ADA, 2019).

Segundo Bahia et al. (2011) a projeção de gastos mundiais com diabetes em 2040 ocorre entre 802 e 1452 bilhões de dólares, sendo que o Brasil gastaria em torno de 29 bilhões de dólares. Em relação às despesas com tratamento ambulatorial em indivíduos com DM que utilizam o SUS (Sistema Único de Saúde) estima-se um gasto em torno de US\$ 2108 por indivíduo. Dessa forma, avalia-se que os gastos dos indivíduos portadores de DM sejam duas a três vezes maiores do que os indivíduos sem esta patologia.

2.1.5 Consequências clínicas e metabólicas

As consequências do DM atingem níveis macro vasculares e microvasculares, os quais resultam em patologias em locais como rim, coração, encéfalo, sistema vascular e sistema neuronal. O diabetes pode contribuir direta ou indiretamente com pioras no sistema digestório, musculoesquelético, função cognitiva e mental e também pode estar relacionado com alguns tipos de câncer (SBD, 2019).

As consequências geradas pelo diabetes não envolvem somente a alta concentração glicêmica, porém também pode ser ocasionada pelo processo inflamatório crônico, o qual pode aumentar espécies reativas de oxigênio e consequentemente

comprometer mecanismos de defesas antioxidantes gerando danos a determinados órgãos (SHARMA; GUPTA; KHANNA, 2019).

De acordo com Duwayru & Jordan Jr (2019), a exposição prolongada da hiperglicemia pode ocasionar disfunção endotelial; instabilidade de placas arterioscleróticas; alterar a hemodinâmica do músculo esquelético; aumentar o processo inflamatório e estresse oxidativo, os quais culminam para as consequências da DM, principalmente a formação de placas ateroscleróticas (Figura 1).

Figura 1: Mecanismo simplificado da arteriosclerose acelerada em pacientes com diabetes.

FONTE: Duwayri & Jordan Jr. (2019)

Legenda: Exposição prolongada da hiperglicemia acelera o processo de arteriosclerose por diferentes caminhos. 1: Disfunção endotelial, instabilidade da placa, hemodinâmica do músculo esquelético- Diminuição da produção de NO e aumento da endotelina-1 no endotélio com consequente vasoconstrição. 2: Produtos finais de glicação avançada (AGEs)- aumento da glicemia e o estresse oxidativo resultam no aumento de AGEs em circulação, que desencadeiam inflamação e apoptose no endotélio. 3: Estresse oxidativo – a hiperglicemia gera um aumento de ROS, os quais resultam na ativação da proteína kinase C, aumento da formação de AGEs, depleção de NO e aumento de angiotensina II, resultando em vasoconstrição e placa aterosclerótica.

Nota: LDL, Lipoproteína de baixa densidade; NO, óxido nítrico; NOS, óxido nítrico sintetase; ROS, espécie reativa de oxigênio.

A insulina regula a produção do peptídeo vasoconstritor endotelina-1 e do óxido nítrico vasodilatador (NO) no endotélio por vias enzimáticas paralelas que interagem com os níveis de glicose, além disso, ela também aumenta o fluxo sanguíneo para os músculos esqueléticos por meio da vasodilatação mediada por NO e do recrutamento capilar. Dessa forma, a resistência ou diminuição da insulina é pró-trombótica e pró-aterogênica, aumentando a vasoconstrição e a inflamação no nível endotelial, além de levar a diminuição gradual da perfusão do músculo esquelético do membro (DUWAYRI & JORDAN Jr., 2019).

A outra via no mecanismo molecular da disfunção vascular em diabético envolve os produtos finais da glicação avançada (AGE) e o estresse oxidativo. A hiperglicemia aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que resulta na inativação da via da proteína quinase, aumento da formação de AGE, depleção de NO e aumento da angiotensina II, que desencadeia um processo inflamatório e vasoconstrição os quais desempenham um importante papel na formação da placa aterosclerótica (DUWAYRI & JORDAN Jr., 2019).

Em condições vasculares crônicas, a incidência de eventos macro vasculares é geralmente acompanhada de impedimentos patológicos microvasculares significativos e disfunções progressivas, os quais podem ocasionar doenças cardiovasculares e acidente vascular encefálico. Embora as AGEs ou resistência persistente à insulina sejam especulados como causadores de disfunção hemodinâmica progressiva e aumento de eventos cardiovasculares em pacientes com DM, os mecanismos exatos que associam hipertensão arterial e aterosclerose no contexto desta patologia não são ainda claramente elucidados (STRAIN; PALDANIUS, 2018).

A hiperglicemia também pode diretamente causar danos no tecido pulmonar por meio da formação de AGEs, citocinas pró-inflamatórias, fibrose, perda da elasticidade de recuo e força muscular prejudicada, as quais influenciam as proteínas elásticas pulmonares que podem desenvolver uma limitação crônica do fluxo de ar. Estudos tem demonstrado espessamento dos capilares alveolares e das paredes arteriolas pulmonares em pacientes com DM, os quais aumentam o risco de doenças pulmonares como doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), doença pulmonar intersticial (DIP) e tuberculose (SHARMA; GUPTA; KHANNA, 2019).

2.2 PERFIL INFLAMATÓRIO E DM

A inflamação crônica evolui para produção anormal de citocinas e ativação de vias pró inflamatórias que são associadas com desordens metabólicas como obesidade, resistência à insulina e DM tipo 2 (ALZAMIL, 2020). Citocinas são um grupo de proteínas farmacologicamente ativas de baixo peso molecular que possuem efeitos autócrinos e parácrinos e constituem produtos e efetores conhecidos do sistema inflamatório e imunológico (ALEXANDRAKI et al., 2006).

Estudos prospectivos têm descrito níveis circulantes elevados de proteínas de fase aguda, citocinas e quimicocinas em pacientes com DM tipo 2. Outros estudos epidemiológicos têm mostrado que níveis de citocinas como proteína C reativa (PCR), interleucina 6 (IL-6), interleucina 1B (IL-1B) e fator de necrose tumoral (TNF- α) são altas em pacientes com DM2 (DONATH; SHOELSON, 2011; LIU et al., 2016).

De acordo com Donath & Shoelson (2011) níveis elevados dessa citocinas e proteínas de fase aguda na DM tipo 2 podem refletir a ativação de células da imunidade inata por aumentar a concentração de nutrientes e consequentemente estimular fatores inflamatório. Quando as citocinas são produzidas localmente nas placas inflamadas podem exercer efeitos protrombóticos nas células endoteliais, aumentar diretamente a permeabilidade capilar, causar estresse oxidativo e disfunção endotelial, agravando o processo aterosclerótico (ALEXANDRAKI, 2006).

A primeira citocina pró-inflamatória envolvida com a patogênese da resistência insulínica e DM tipo 2 é a TNF- α . É reportado que esta substância diminui expressão do transportador de glicose regulado por insulina tipo 4 (GLUT 4) que está localizado principalmente nos adipócitos e músculos esqueléticos e cardíaco e também induz a fosforilação do receptor de insulina podendo atuar como um inibidor da ação periférica deste hormônio além de estimular a síntese de IL-6 (ALZAMIL, 2020).

A IL-6 é secretada principalmente por tecido visceral adiposo e apresenta-se controversa. Em pacientes saudáveis ela regula positivamente o metabolismo de glicose, entretanto, em pacientes obesos ou com processo inflamatório ela é uma citocina que pode gerar resistência à insulina em tecidos específicos, apoptose na ilhota pancreática, juntamente com outras citocinas e pode estimular a inibição de proteínas sinalizadores de citrinas (AKASH; REHMAN; CHEN, 2013; LIU et al., 2016)

Tanto a IL-6 como o TNF- α podem regular a liberação da proteína C reativa (PCR) e aumentar sua concentração plasmática. A PCR é o marcador mais comum de processo inflamatório e é produzido primeiramente pelo fígado podendo agir em várias partes do corpo aumentando o efeito pro-inflamatório (LIU et al., 2016).

Pacientes diabéticos, particularmente quando mal controlados, ativam doenças do sistema imune inato e manifestam uma inflamação crônica de baixo grau (MIRZA et al., 2012). Mecanismos inflamatórios envolvidos na patogênese da DM tipo 2 são hipóxia, morte celular, liberação de citocinas, quimiocinas e adiponectinas (DONATH & SHOELSON, 2011).

A hipóxia pode gerar acúmulo de macrófagos provocando uma ligação patogênica entre expansão do tecido adiposo e a introdução da inflamação. Esta expansão demanda oxigênio e nutriente e também ativa liberação de citocinas como PCR, IL-6 e IL-1B, que ativam o sistema imune inato e induzem à inflamação (DONATH & SHOELSON, 2011; AKASH; REHMAN; CHEN, 2013).

Associado a isso, níveis elevados de glicemia na presença de excesso de ácidos graxos livres de uma forma crônica podem levar à disfunção de células β . Essa glicolipotoxicidade pode causar estresse no retículo endoplasmático das ilhotas pancreáticas, que é responsável pela síntese da pró-insulina. Caso o estresse perdure e não recupere a homeostase, isto pode terminar com células em apoptose (AKASH; REHMAN; CHEN, 2013).

Além da apoptose celular, as ilhotas pancreáticas iniciam a produção de IL-1 e IL-1B as quais aumentam a produção de óxido nítrico levando a diminuição da concentração de adenosina trifosfato mitocondrial que também pode causar disfunção das células β e secreção de insulina. Associado a isso, a hiperglicemia pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) induzindo ao estresse oxidativo, os quais resultam em produtos pró-inflamatórios que geram resistência à insulina e inflamação (AKASH; REHMAN; CHEN, 2013).

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO E DM

O estresse oxidativo tem sido mostrado em comprometer tanto a secreção da insulina como a ação deste hormônio, ou seja, mecanismos envolvidos na patologia do

diabetes (IGHODARO, 2018). De acordo com Rendra et al. (2019), o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) é reconhecido por contribuir significativamente com aumento de resposta inflamatória, resistência insulínica e DM tipo 2.

O estresse oxidativo ocorre quando há uma distorção do balanço de redução/oxidação (redox) da célula, o que gera como consequências danos na membrana celular e em biomoléculas vitais como DNA, proteína e lipídio (IGHODARO, 2018). Isto pode ser avaliado através de biomarcadores como proteína glicada, lipídio peroxidado através dos níveis de malondialdeído (MDA), proteína glutatona e suas enzimas, vitaminas A, C e E, enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) (REHMAN; AKASH, 2017).

O nível de produtos de redução imediata do metabolismo de oxigênio é controlado por vários mecanismos de defesa denominados antioxidantes, os quais podem ser divididos em enzimáticos como SOD, CAT, GPX (glutathione peroxidase) e não enzimáticos como a vitamina E e a proteína glutatona. Estudos mostram que a atividade das enzimas antioxidantes no pâncreas é menor do que em outros tecidos, o que pode gerar uma distorção do balanço redox (AYDIN et al., 2000).

Além disso, a hiperglicemia e a liberação de citocinas e proteínas inflamatórias podem causar aumento de ROS e diminuir a defesa antioxidante prejudicando a função das células β induzindo ao estresse oxidativo (IGHODARO, 2018). Isto tem como consequência disfunção mitocondrial, ativação de NADPH oxidase, aumento do caminho de formação de polióis e geração de produtos finais de glicação avançada (AGE), os quais podem contribuir com a resistência insulínica e DM (SOTTERO et al., 2015; IGHODARO, 2018).

Os caminhos pelos quais este processo ocorre ainda estão sendo discutidos. Alguns trabalhos mostram que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é requerido em baixas concentrações como um mensageiro secundário na cascata de sinalização intracelular e seu excesso pode causar uma disfunção, danificação e morte das células. Um desbalanço entre oxidante e antioxidante pode causar estresse metabólico (STEINBRENNER, 2013).

A principal fonte de geração de ROS ocorre na mitocôndria no processo de formação de energia. A transferência de elétrons para o oxigênio molecular resulta na formação do superóxido (O_2^-), o qual é sintetizado pela NADPH oxidase (REHMAN; AKASH, 2017). Este produto é transformado em H_2O_2 pela SOD e posteriormente

controlado pelas enzimas antioxidasantes, os quais tanto em excesso quanto em deficiência podem afetar a glicemia (ZHOU; HUANG; LEI, 2013).

Segundo Steinbrenner (2013), o peróxido de hidrogênio em baixas concentrações controla a fosforilação do receptor de insulina, estimula o aumento da concentração de cálcio intracelular e a secreção de insulina além de agir na inativação das fosfatases contra-reguladoras de insulina PTP-1B e PTEN participando como mensageiro secundário na ação e produção deste hormônio (Figura 2).

Figura 2: Ação do peróxido de hidrogênio na regulação da ação da insulina.

FONTE: Steinbrenner (2013).

O controle na produção de H_2O_2 nas células pancreáticas ocorre pela ação da GPX, a qual é ativada pela presença do mesmo (ZHOU; HUANG; LEI, 2013). O excesso deste antioxidante poderia diminuir a concentração de peróxido de hidrogênio e consequentemente atenuar a sinalização de insulina ao mesmo tempo em que a falta deste, aumentaria muito o H_2O_2 e diminuiria a secreção de insulina estimulada pela glicose (GSIS). Dessa forma, é necessário um balanço entre ROS e antioxidantes (STEINBRENNER, 2013).

2.4 MICRONUTRIENTES E DM

Indivíduos portadores de diabetes podem apresentar deficiência de vitaminas e minerais devido ao aumento na excreção urinária destes nutrientes, diminuição da capacidade intestinal de absorção e ingestão alimentar alterada, muitas vezes abaixo do necessário (SBD 2019).

O perfil destes elementos em pessoas com DM varia de acordo com os hábitos dietéticos, composição do solo, controle glicêmico, complicações clínicas, genética e idade do paciente (EKMEKCIOGLU et al., 2001). Além disso, fatores como estilo de vida, ritmo circadiano e sazonal, medicamentos, cirurgias e estresse também podem afetar o nível destes nutrientes no organismo (KRUSE-JARRES; RÜKGAUER, 2000).

O desequilíbrio precoce de metais específicos pode desempenhar um papel na perturbação normal de metabolismo de glicose e insulina, bem como a alteração nos status metabólicos desses micronutrientes podem contribuir com resistência insulínica e desenvolver complicações através do aumento do estresse oxidativo (FORTE et al., 2013).

Os trabalhos na literatura mostram que os nutrientes que mais têm relação com a DM tipo 2 são magnésio, zinco, cromo, ferro, níquel, selênio, cobre e manganês. Em um estudo realizado por Zhang et al. (2017), após uma análise de correlação foi verificado uma notável associação entre glicemia, hemoglobina glicada e níveis séricos de magnésio, cobre, cálcio, zinco e selênio.

O magnésio (Mg) é um cátion bivalente que tem sido relatado a sua relação com a modulação da síntese, secreção e ação de alguns hormônios, dentre eles a insulina. Esse íon é um cofator de muitas enzimas relacionadas a integração metabólica e a sua deficiência sugere uma menor secreção de insulina, maior metabolismo hepático e menor reserva pancreática desse hormônio, além de estar relacionado com altos níveis de TNF- α que contribui com a resistência insulínica periférica e desenvolvimento de prejuízos micro e macro vasculares (RODRIGUES; MELO; DOMINGUETI, 2020).

Cobre (Cu) é um componente crucial em uma variedade de metaloenzimas e apresenta um importante papel na reação de oxidação-redução. Ele é necessário para ação catalítica da SOD, formação de células vermelhas do sangue e mantém vasos sanguíneos, nervos, sistema imune e ossos em condições adequadas (ZHANG et al., 2017). De acordo com Forte et al. (2013) um acúmulo desse nutriente foi correlacionado com macro e

microangiopatia, hipercolesterolemia e hipertensão arterial enquanto que a deficiência pode contribuir com intolerância à glicose em pacientes com DM.

O cálcio (Ca) tem sido associado com o mal funcionamento das células β , redução da sensibilidade à insulina e inflamação sistêmica. Existem alguns estudos que indicam que deficiência de cálcio e vitamina D podem reduzir a secreção de insulina. O cálcio como um mensageiro secundário possui importante papel na sinalização da ação da insulina em tecidos responsivos a este hormônio (SIMIĆ et al., 2017).

O zinco (Zn) pode atuar de diferentes maneiras no metabolismo da glicose e consequente patologia do DM. Este mineral participa como cofator de enzimas implicadas no metabolismo deste macronutriente, possui vários alvos potenciais para modular atividade da insulina, está envolvido com síntese, estocagem e secreção deste hormônio pelo tecido pancreático e é responsável pela integridade da conformação da insulina em sua forma cristalina (FAURE, 2003). Além disso, ele também pode participar como um componente integral de várias enzimas antioxidantes, que estão envolvidos na patologia da DM (FORTE et al., 2013).

O manganês (Mn), assim como o Zn, também participa do processo de estresse oxidativo pois é um nutriente essencial para formação da Mn superóxido dismutase (SOD), principal responsável pela eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) no estresse oxidativo mitocondrial (LI; YANG, 2018). Além disso, esse micronutriente está envolvido na regulação do metabolismo de glicose e lipídio em humanos, sendo que sua concentração adequada é requerida para o balanço de síntese e secreção de insulina (FORTE et al., 2013).

O selênio (Se) não participa diretamente na regulação metabólica intra ou extracelular como os elementos anteriores, porém sua ação é principalmente antioxidante (KRUSE-JARRES; RÜKGAUER, 2000). Além disso, estudos relatam que o selênio age como mimético da insulina e sua deficiência pode prejudicar a função das ilhotas pancreáticas, diminuir a reserva de insulina, aumentar a glicose plasmática e o estresse oxidativo, visto que ele é o principal constituinte da GPX (ZHOU; HUANG; LEI, 2013).

Tanto o excesso como a deficiência destes nutrientes podem ocasionar um desequilíbrio no controle glicêmico e piorar o prognóstico do paciente. Os estudos ainda são controversos e existe a dúvida se é a patologia diabetes que influencia nos níveis destes minerais através da diminuição da absorção e aumento da excreção ou se são as concentrações destes nutrientes que influenciam na patologia DM (RODRIGUES; MELO; DOMINGUETI; 2020).

2.5 JUSTIFICATIVA

Pacientes com DM2 podem apresentar constante estresse metabólico e insuficiência de alguns microelementos essenciais para produção de insulina e consequente efeito no controle da glicemia. Ao mesmo tempo é conhecida a importância de micronutrientes como magnésio, zinco, cobre, manganês e o selênio na síntese e ação da insulina no controle metabólico de pacientes diabéticos.

Portanto, estudos que investigam e detalham o papel destes nutrientes e seus efeitos nas vias metabólicas, perfil inflamatório e estresse oxidativo envolvidas no controle de pacientes diabéticos com e sem uso de insulina são escassos na literatura atual.

3. HIPÓTESE

Os micronutrientes como manganês, zinco, selênio, cobre, ferro e magnésio interferem no controle glicêmico de paciente diabético tipo 2.

4. OBJETIVO

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito dos micronutrientes manganês, zinco, selênio e cobre no perfil metabólico e consequentemente controle glicêmico em pacientes com DM2 com e sem uso de insulina.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-
- Avaliar o perfil nutricional, inflamatório e de estresse oxidativo dos pacientes com DM2;
- Comparar o perfil metabólico dos pacientes DM2 com e sem uso de insulina;
- Avaliar a influência dos diferentes micronutrientes como magnésio, cálcio e ferro e no perfil metabólico e controle glicêmico de paciente com e sem uso de insulina;
- Avaliar a influência do perfil inflamatório e estresse oxidativo no controle glicêmico.

5 METODOLOGIA

5.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Por se tratar de uma pesquisa que envolve seres humanos, o presente trabalho submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP/USP, processo nº 14417313.6.0000.5440, parecer nº 359593 em 14/08/2013. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TLCE) também foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP/USP neste mesmo processo (Anexo 1).

5.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Este trabalho é um estudo transversal, não randomizado e centro único realizado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo no período de agosto de 2016 à março de 2017. Os pacientes foram abordados no ambulatório de *Diabetes* do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (HCFMRP – USP) e a coleta das amostras de sangue foi realizada na Unidade de Pesquisa Clínica desse mesmo Hospital.

5.2.1 Critérios de inclusão:

Participaram do estudo pacientes com diagnóstico médico de Diabetes Mellitus tipo 2 com idade entre 18 e 60 anos, ambos os gêneros, em seguimento ambulatorial, que possuíam hemoglobina glicada estável durante os 3 últimos exames e que concordaram com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

5.2.2 Critérios de exclusão:

Pacientes com retinopatia, nefropatia e hepatopatias graves, aqueles que apresentarem câncer, disfunção tireoidiana e mulheres grávidas foram excluídos.

5.3 CÁLCULO AMOSTRAL

Inicialmente foi feito um estudo piloto entre pacientes com DM2 com e sem uso de insulina. Nesses pacientes foram dosadas as concentrações do selênio eritrocitário, o qual participa diretamente na atividade da GPX e posterior controle da síntese de insulina. A média de selênio eritrocitário de cada grupo e o desvio padrão populacional foram obtidos para o cálculo amostral.

Adotando um nível de significância de 0,05 e 0,80 de poder do teste e utilizando a seguinte equação (SINGER, 2001) obteve-se um tamanho total amostral de 64 pacientes, sendo 32 de cada grupo.

$$n = \frac{2\sigma^2(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

5.4 GRUPO DE ESTUDO

Os pacientes foram alocados de acordo com o tratamento realizado para o DM2. Sendo assim, eles foram divididos em dois grupos: pacientes que utilizavam somente antidiabético oral como tratamento (Grupo sem uso de insulina - GSI; n=33) e pacientes que faziam uso de antidiabético oral e insulina como tratamento (Grupo com uso de insulina - GCI; n=34).

5.5 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O estudo do tipo transversal foi conduzido no período de agosto de 2016 a março de 2017. Toda semana foi realizado um levantamento dos possíveis pacientes portadores de *Diabetes Mellitus* tipo 2 que poderiam participar do projeto através dos critérios de inclusão e exclusão e que teriam consulta no ambulatório de Diabetes do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto no dia posterior.

No dia da consulta no ambulatório o paciente pré-selecionado foi convidado a participar do presente trabalho. Inicialmente foi explicado do que se tratava o estudo, detalhou-se o que seria coletado do paciente e quando seria essa coleta. Feito isso, o participante respondia se aceitaria ou não participar do estudo. Aqueles que aceitaram, assinaram o TCLE (Anexo 1).

Após isso, com a finalidade de avaliar o consumo alimentar, foi explicado ao paciente o método de registro alimentar, que consiste na anotação de todos os alimentos e bebidas consumidas e suas respectivas quantidades durante determinado período, em geral ao longo de um dia. Os voluntários foram orientados a realizar o registro alimentar de 3 dias da semana não consecutivo.

Conforme a aceitação por parte dos pacientes em participar do estudo foram coletadas informações presentes nos prontuários a respeito dos medicamentos e antecedentes pessoais, o peso e estatura foram aferidos para cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC), foi realizada bioimpedância para análise da composição corporal e houve a coleta de sangue por um profissional especializado para análise bioquímica.

5.5.1 Coleta do material

Após a coleta, o material foi levado ao Laboratório de Nutrição e Metabolismo do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP, onde todos os *vacuntainers* foram colocados em uma centrífuga e submetidos a 3600 rotações por minutos, por 10 minutos a 4°C. Foram retirados 1 mL de soro do *vacuntainer* e armazenou-os em eppendorfs em freezer a -80°C.

Para a obtenção das hemácias e posterior coleta, após a centrifugação, foi retirado todo o soro presente no frasco e acrescentado solução salina 0,9%, na mesma quantidade de soro retirado. Homogeneizou-se a mistura e esta foi submetida novamente a 3600 rotações por minutos, por 10 minutos a 4°C. Este processo foi repetido por três vezes. Ao final, o material foi transferido para eppendorfs que foram armazenados em freezer a -80°C.

5.6 AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

Os pacientes que concordaram participar do estudo tiveram o peso e a estatura aferidos e avaliação da composição corporal pela bioimpedância (Modelo 310e Biodynamics®). Também foram calculados os valores de Índice de Massa Corporal e as classificações foram dadas de acordo com a Organização Mundial da Saúde (1995).

5.7 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO ALIMENTAR

Com a finalidade de avaliar o consumo alimentar, o método de registro alimentar foi utilizado. Ele consiste na anotação de todos os alimentos e bebidas consumidas e suas respectivas quantidades durante determinado período, em geral ao longo de um dia. Os pacientes foram orientados a realizar o registro alimentar de 3 dias da semana não consecutivos.

Após a entrega dos registros alimentares, os valores energéticos, de macronutrientes, minerais (cálcio, ferro, zinco, selênio e magnésio) e vitaminas (A, D, C, E, B5, B6, B9 e B12) foram calculados através do programa DietWin® – Software de Nutrição. Após isso, obteve-se a média de consumo entre esses dias de cada voluntário, obtendo uma avaliação do consumo alimentar através da comparação com os valores da EAR (Estimated Average Requirement) presentes nas DRIs (Dietary Reference Intakes).

5.8 ANÁLISE BIOQUÍMICA

Exames bioquímicos que caracterizam o estado metabólico: hemograma, perfil lipídico, albumina, uréia e creatinina sérica, glicemia e hemoglobina glicada sérica foram analisados pelos métodos de citometria de fluxo (ref. 207), método colorimétrico (ref.146), verde de bromocresol (ref. 19), urease/GLDH (ref. 27), reação de Jafee (ref. 35), oxidase/peroxidase (ref. 133) e imunoturbidimetria (ref. 385), respectivamente, no Laboratório Central do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, através dos kits Labtest® (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil).

5.9 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO

Os seguintes biomarcadores de estresse oxidativo foram dosados através dos reagentes da Sigma-Aldrich Chemie GmbH® no laboratório de Nutrição e Metabolismo da FMRP: malondialdeído (MDA), glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG), capacidade antioxidante total (CAOT), Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) e glutathiona peroxidase (GPX) (VASCONCELOS et al., 2007). Os níveis de vitamina A (retinol) e vitamina E (α -tocoferol) foram determinados no Laboratório de Nutrição, Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, por HPLC usando um instrumento Shimadzu (modelo LC10A) equipado com um sistema isocrático Shimadzu modelo SPD-10AV e um detector espectrofotométrico UV-vis (GUEGUEN et al., 2003).

5.10 ANÁLISE DO PERFIL INFLAMATÓRIO

Para avaliar o perfil inflamatório destes pacientes foram dosados interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral α (TNF- α), peptídeo C através do kit HMHEMAG-34K-03 (Human Metabolic Hormone Magnetic Bead Panel) que utiliza um tipo de painel magnético pelo MILLIPLEX® Multiplex Assays Using Luminex (Merck). Esta análise foi realizada no Laboratório de Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

5.11 ANÁLISE DOS MICRONUTRIENTES

O sangue dos pacientes foi coletado para análise da concentração dos minerais selênio, magnésio, cobre, zinco, cálcio, manganês e ferro sérico e eritrocitário através do método de espectrometria de fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) equipada com uma célula de reação dinâmica (DRC) (Perkin Elmer Sciex Norwalk, CT EUA) no Laboratório de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (BATISTA et al., 2009).

5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Primeiramente foi realizada uma análise exploratória dos dados para obter uma visão global da variação desses valores, organizando e descrevendo os dados por meio de tabelas com medidas descritivas. Os dados foram apresentados como média, desvio padrão e intervalo de confiança (95%).

Após a análise da distribuição dos dados foram realizados os testes estatísticos para verificar a igualdade entre os grupos. Para análise dos dados, as variáveis independentes que seguiram a normalidade tiveram o teste T-Student aplicado, para as variáveis independentes não paramétricas usou-se o método Mann-Whitney. Na análise de variáveis categóricas utilizou-se o Teste exato do X^2 . Para avaliar as correlações entre as variáveis utilizou-se o cálculo do coeficiente de correlação de Spearman. As diferenças significativas foram obtidas com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). O software utilizado para análise desses dados foi o SPSS (version 19; SPSS, Inc., Chicago, IL).

Resultados

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS

Dos pacientes abordados 67 aceitaram participar do estudo e consentiram com o TCLE. A média de idade foi 52,7 anos, 39 participantes (58,2%) eram do sexo feminino e 28 (41,8%) do sexo masculino. O peso, estatura, IMC e porcentagem massa gorda média foram de 81,83Kg, 1,64m, 30,33Kg/m² e 35,12%, respectivamente.

Gráfico 1: Classificação do IMC de pacientes com *Diabetes Mellitus* tipo 2 em seguimento ambulatorial na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Fonte: Próprio autor.

De acordo com a análise dos exames bioquímicos (Tabela 2) nota-se que os pacientes com DM voluntários da pesquisa apresentam elevados níveis séricos de glicemia, hemoglobina glicada e triglicerídeo.

Tabela 2: Dados bioquímicos de 67 pacientes com *Diabetes Mellitus* tipo 2 em seguimento ambulatorial na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

(continua)					
Dados	Média (DP)	Mediana	Mínimo	Máximo	Referência
Ureia (g/dL)	37,65 (16,37)	35	16	80	16-40
Creatinina (g/dL)	1,04 (0,42)	0,95	0,5	2,16	0,6-1,2
Glicemia (g/dL)	161,3 (63,7)	140	52	387	70 – 99
Hemoglobina glicada (%)	8,6 (2,2)	8,1	5,9	15,5	<6,5%
Colesterol total (mg/dL)	171,7 (37,57)	168	101	309	<190
LDL (mg/dL)	94,67 (31,27)	94	44	206	<130
HDL (mg/dL)	40,42 (12,26)	38	23,2	95,5	>40

Tabela 2: Dados bioquímicos de 67 pacientes com *Diabetes Mellitus* tipo 2 em seguimento ambulatorial na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

(conclusão)					
Dados	Média (DP)	Mediana	Mínimo	Máximo	Referência
Triglicérides (mg/dL)	190,8 (112,3)	159	38	632	<150
Hemácias (milhões/m ³)	4,66 (0,51)	4,68	3,44	6,03	4-6,5
Hematócrito (%)	40,77 (4,22)	41	32	57	36-48
V.C.M (fL)	87,7 (5,88)	88	71	104	80-100
H.C.M (pg)	29,43 (2,25)	29,6	23,3	35,4	27-33
Leucócito (mil/mm ³)	8,03 (2,64)	7,5	3,5	14,4	3,6-11
Plaquetas (mil/mm ³)	282,23 (81,66)	267	119	522	150-400

Fonte: Próprio autor.

* LDL: lipoproteína de baixa densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade; V.C.M: volume corpuscular médio; H.C.M: hemoglobina corpuscular média.

Em relação ao estresse oxidativo e perfil inflamatório dos pacientes voluntários nota-se elevados níveis MDA e níveis séricos diminuídos de GPX (Tabela 3), o que demonstra uma maior atividade oxidante e menor defesa antioxidante.

Tabela 3: Avaliação de estresse oxidativo e perfil inflamatório de 67 pacientes com *Diabetes Mellitus* tipo 2 em seguimento ambulatorial na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Estresse oxidativo	Média (DP)	Mediana	Mínimo	Máximo
Oxidante				
MDA (nmol/mL)	6,2 (2,11)	6,07	1,73	11,4
Antioxidante				
GSH (nmol/mL)	2,43 (0,66)	2,54	0,03	3,67
GSSG (nmol/mL)	28,09 (8,51)	28,17	10,76	42,68
FRAP (nmol/mL)	1,03 (0,22)	1	0,37	1,65
GPX (U/L)	26,54 (13,3)	26,98	5,97	60,04
CAOT (nmol/mL)	1,92 (0,18)	1,91	1,3	2,45
Vitamina A (mg/L)	0,74 (0,28)	0,69	0,21	1,57
Vitamina E (mg/L)	7,19 (3,08)	6,9	1,56	19,39
Perfil inflamatório				
Peptídeo C (pg/mL)	2708,47 (1689,56)	2452	2,49	7395
IL-6 (pg/mL)	4,31 (9,88)	2	2	72,94
TNF - α (pg/mL)	8,19 (13,8)	6,23	1,67	118

Fonte: Próprio autor.

* MDA: malondialdeído; GSH: glutatona reduzida; GSSG: glutatona oxidada; FRAP: poder de redução do ferro; GPX: glutatona peroxidase; CAOT: capacidade antioxidante total; IL-6: interleucina 6; TNF- α : fator de necrose tumoral.

Os níveis médios de minerais apresentaram-se adequados, exceto para selênio e cálcio sérico, os quais estavam abaixo dos valores de referência (Tabela 4). Dos pacientes analisados 55,38%, 80% e 27,7% apresentam indicativo de deficiência sérica de selênio, cálcio e magnésio, respectivamente. Em relação às concentrações eritrocitárias verifica-

se que 50,77% apresentam indicativo de deficiência de selênio e 46,15% e 80,3% apresentam indicativo de excesso de zinco e manganês.

Tabela 4: Concentrações séricas e eritrocitárias dos minerais selênio, zinco, cobre, magnésio, cálcio e ferro de 67 pacientes com *Diabetes Mellitus* tipo 2 em seguimento ambulatorial na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Concentração sérica	Média (DP)	Mediana	Mínimo	Máximo	Referência
Selênio (µg/L)	88,27 (21,68)	83,3	45,97	172,91	90-125
Zinco (µg/dL)	89,92 (12,55)	89,1	63,43	124,75	75-110
Cobre (µg/dL)	134,78 (28,05)	133,4	84,13	211,46	70-155
Magnésio (mg/dL)	1,83 (0,31)	1,84	1,21	2,48	1,6-2,6
Cálcio (mg/dL)	7,61 (1,18)	7,11	5,9	10,29	8,6-10,3
Ferro (µg/dL)	129,67 (38,7,1)	124,09	60,06	267,98	65-175
Manganês (µg/L)	2,048 (0,64)	1,93	1,08	4,78	1,6-5,4
Concentração eritrocitária					
Selênio (µg/L)	93 (26,92)	89	40	185	90-190
Zinco (µg/dL)	13 (3,4)	14	5	21	10-14
Cobre (µg/dL)	74,3 (16,31)	70,5	51,4	134,9	30,5-132,2
Magnésio (mg/dL)	4,6 (9,03)	4,9	2,7	6,3	4-6,4
Manganês (µg/L)	21,5 (6,43)	21,3	6,5	37,2	4-16,5

Fonte: Próprio autor.

Após avaliação da ingestão alimentar (Tabela 5) verificou-se que em média os pacientes apresentam baixa ingestão alimentar energética, de fibra, cálcio, magnésio, vitamina A e vitamina E.

Tabela 5: Ingestão alimentar de 67 pacientes com DM tipo 2 em seguimento ambulatorial na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto obtidas por meio de 3 registros alimentares.

Nutriente	Média (DP)	Mediana	Mínimo	Máximo	Referência
Energia (kcal)	1681,22 (509,41)	1697,31	744,05	2836,13	2000
Carboidrato (g)	215,1 (66,94)	207,61	92,64	362,7	225 – 325
Proteína (g)	86,28 (31,9)	86,23	21,26	154,36	50 – 175
Lipídio (g)	65,93 (73,32)	49,14	24,15	451,11	44 – 77,7
Fibra (g)	24,06 (9,16)	23,56	8,43	41,89	25
Cálcio (mg)	538,07 (284,87)	490,37	127,56	1466,32	1000
Ferro(mg)	11,68 (5,03)	11,8	2,27	22,81	6 / 8,1
Selênio (µg)	68,62 (118,1)	38,52	7,1	677,02	45
Zinco (mg)	13,76 (8,1)	13,28	1,93	31,25	6,8 / 9,44*
Cobre (mg)	1,27 (0,59)	1,12	0,06	2,53	0,7
Magnésio (mg)	267,43 (111,82)	267,86	58,88	471,28	265 / 350*
Manganês (mg)	3,77 (2,24)	3,0	0,82	8,51	1,8/2,3*
Vitamina A (RE)	515,86 (396,46)	473,28	50,55	1775,38	500 / 625*
Vitamina E (mg)	9,64 (5,84)	9,7	0,23	21,14	12

Fonte: Próprio autor.

* Recomendação para mulher/ Recomendação para homem

6.2 COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS DE ACORDO COM O TRATAMENTO

Dos 67 voluntários que participaram deste trabalho 33 utilizavam somente antidiabético oral como tratamento (GSI) e 34 utilizavam também o hormônio insulina como tratamento (GCI). Quando se compara estes grupos em relação às características gerais e exames bioquímicos verifica-se que o GCI apresenta percentual do sexo feminino significativamente maior ($X^2=4,35$; $p= 0,04$), idades superiores, maiores concentrações séricas de glicemia e hemoglobina glicada (Tabela 6).

Gráfico 2: Classificação do IMC de pacientes com *Diabetes Mellitus* tipo 2 sem uso de insulina em seguimento ambulatorial na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Fonte: Próprio autor.

Gráfico 3: Classificação do IMC de pacientes com *Diabetes Mellitus* tipo 2 com uso de insulina em seguimento ambulatorial na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Fonte: Próprio autor.

Tabela 6: Comparação de características gerais e exames bioquímicos entre pacientes com DM2 com uso de antidiabético oral como tratamento (GSI) e aqueles que utilizam hormônio da insulina como tratamento (GSI).

Variáveis	GSI (n= 33)				GCI (n=34)				p
	Média ± DP	Mediana	Mínimo	Máximo	Média ± DP	Mediana	Mínimo	Máximo	
Dados antropométricos									
Idade (anos)	51,3±6,45	53	36	59	54,03±5,15	55	35	59	0,03*
Estatura (m) ^a	1,66±0,09	1,67	1,48	1,9	1,61±0,15	1,59	1,43	1,86	0,05*
Peso (Kg) ^a	82,91±15,59	85	54	116,4	80,88±15,92	78,9	54,5	118,7	0,61
IMC (Kg/m²) ^a	29,72±4,61	29,13	22,52	41,24	30,92±5,32	30,25	20,26	47,62	0,33
Massa gorda (%) ^a	35,18±5,03	33,88	26,5	43	35,09±7,98	35	21	50,3	0,97
Dados bioquímicos									
Uréia (mg/dL)	37,7±13,4	35,5	20	80	37,61±19,03	35	16	77	0,74
Creatinina (mg/dL)	1±0,29	1	0,53	1,61	1,07±0,5	0,92	0,5	2,16	0,56
Glicemia (mg/dL)	140,9±35,61	130	82	210	181,2±77,87	154	52	387	0,01*
Hemoglobina glicada (%)	7,42±1,05	7,2	5,9	10,2	9,8±2,2	9,3	6,4	15,5	<0,0001*
Colesterol total (mg/dL)	168,4±33,56	168	114	236	174,9±41,49	170	101	309	0,49
LDL (mg/dL)	93,32±29,98	90	46	183	96,07±33,02	95,5	44	206	0,66
HDL (mg/dL)	38,71±9,24	37,7	23,9	68,1	42,12±14,63	38,25	23,2	95,5	0,62
Triglicérides (mg/dL)	184,1±97,55	175	65	408	197,5±12,7	157,8	38	632	0,82
Hemácias (milhões/m³) ^a	4,54±0,55	4,63	3,44	5,88	4,74±0,48	4,68	3,81	6,03	0,12
Hemoglobina (g/dL) ^a	13,5±1,2	13,8	10,7	15,9	13,68±1,43	14	10,8	18,04	0,7
Hematócrito (%)	40,39±3,69	41	32	48	40,91±4,82	42	34	57	0,7
V.C.M (fL) ^a	89,36±5,44	89	79	104	86,29±6,16	87	71	99	0,035*
H.C.M (pg)	30,07±2,3	30	23,8	35,4	28,94±2,28	29,35	23,3	32,7	0,1
Leucócito (mil/mm³) ^a	7,88±2,72	7,5	3,5	14,2	8,22±2,65	7,5	4,1	14,4	0,6
Plaquetas (mil/mm³)	279,79±80,58	252	160	479	284,76±84,93	271	119	522	0,63

Fonte: Próprio autor.

^a Valores de média para o Teste t Student

IMC: índice de massa corporal; LDL: lipoproteína de baixa densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade; V.C.M: volume corpuscular médio; H.C.M: hemoglobina corpuscular média.

Na avaliação do estresse oxidativo e perfil inflamatório verifica-se que o GCI apresenta níveis significativamente maiores de MDA, GSSG, GPX e menores de FRAP e peptídeo C e em relação às concentrações de minerais, este grupo apresenta maiores concentrações de zinco, manganês e ferro eritrocitário e menores concentrações de cobre eritrocitário do que o GSI (Tabelas 7 e 8). Não houve diferença significativa entre nutrientes ingeridos entre os dois grupos (Tabela 9).

Tabela 7: Comparação do perfil de estresse oxidativo e inflamatório entre pacientes com DM2 com uso de antidiabético oral como tratamento (GSI) e aqueles que utilizam hormônio da insulina como tratamento (GSI).

Variáveis	GSI (n= 33)				GCI (n=34)				p
	Média ± DP	Mediana	Mínimo	Máximo	Média ± DP	Mediana	Mínimo	Máximo	
Estresse oxidativo									
Oxidante									
MDA (nmol/mL) ^a	5,11±1,74	5	1,73	9,27	7,26±1,91	7,46	3,6	11,4	<0,0001*
Antioxidante									
GSH (nmol/mL)	2,39±0,62	2,48	0,03	3,23	2,46±0,67	2,62	1,01	3,67	0,55
GSSG (nmol/mL)	25,13±7,61	25,68	10,76	38,63	30,97±8,43	32,64	14,11	42,68	0,004*
FRAP (nmol/mL) ^a	1,09±0,26	1,07	0,36	1,65	0,97±0,15	0,97	0,71	1,43	0,03*
GPX (U/mL)	19,24±13,37	15,68	5,97	52,49	33,63±8,68	32,41	15,05	60,04	<0,0001*
CAOT (nmol/mL) ^a	1,93±0,21	1,93	1,3	2,45	1,91±0,15	1,88	1,43	2,17	0,61
Vitamina A (mg/L) ^a	0,7±0,29	0,65	0,24	1,57	0,78±0,27	0,75	0,21	1,39	0,22
Vitamina E (mg/L)	6,87±2,98	6,29	1,58	18,1	7,42±3,16	7,05	1,56	19,39	0,19
Perfil inflamatório									
Peptídeo C (pg/mL) ^a	3320,51±2015,3	3266	782	7395	1776,22±1394,97	1814,5	225	5429	0,001*
IL-6 (pg/mL)	2,54±2,16	2,0	2,0	11,5	6,02±13,58	2,0	2,0	72,94	0,15
TNF - α (pg/mL)	6,17±2,4	5,41	2,9	13,13	10,15±19,26	6,67	1,67	118	0,18

Fonte: Próprio autor.

^a Valores de média para o Teste t Student

MDA: malondialdeído; GSH: glutathiona reduzida; GSSG: glutathiona oxidada; FRAP: poder de redução do ferro; GPX: glutathiona peroxidase; CAOT: capacidade antioxidante total; IL-6: interleucina 6; TNF- α : fator de necrose tumoral.

Tabela 8: Comparação dos níveis de minerais séricos e eritrocitários entre pacientes com DM2 com uso de antidiabético oral como tratamento (GSI) e aqueles que utilizam hormônio da insulina como tratamento (GSI).

Variáveis	Média ± DP	GSI (n= 33)			GCI (n=34)			p	
		Mediana	Mínimo	Máximo	Média ± DP	Mediana	Mínimo		Máximo
Concentração sérica									
Selênio (µg/L)	93,39±20,12	91,5	62,88	148,99	83,88±22,29	81,15	45,97	172,91	0,064
Zinco (µg/dL) ^a	90,69±12,41	89,75	75,04	117,51	89,03±12,78	89	63,42	124,75	0,53
Cobre (µg/dL) ^a	130,71±27,14	150,33	107,45	175	138,25±28,73	138,54	84,63	211,46	0,28
Magnésio (mg/dL) ^a	1,81±0,35	2,18	1,69	2,4	1,85±0,29	1,78	1,32	2,48	0,65
Cálcio (mg/dL)	7,63±1,24	7,11	5,9	10,06	7,6±1,14	7,08	6,09	10,29	0,96
Ferro (µg/dL)	137,21±41,42	130,86	79,94	267,78	123,2±35,84	115,38	60,06	254,55	0,08
Manganês (µg/L)	1,92±0,4	2,01	1,08	2,63	2,16±0,78	1,91	1,42	4,78	0,72
Concentração eritrocitária									
Selênio (µg/L)	96,96±29,43	93,77	55,74	185,14	88,96±24,39	87,71	40,25	139,3	0,35
Zinco (µg/dL)	11,6±3,84	11,73	4,78	18,73	14,71±2,15	14,53	11,26	20,6	0,001*
Cobre (µg/dL) ^a	80,08±20,55	75,6	51,4	134,8	69,36±9,3	69,8	52,6	88,1	0,012*
Magnésio (mg/dL)	4,28±1,1	4,25	2,65	5,61	4,84±0,72	4,96	2,8	6,34	0,07
Manganês (µg/L)	19,29±7,76	19,15	6,5	35,88	23,34±4,33	23,36	16,21	38,2	0,01*
Ferro (mg/L)	566,64±230,89	651,14	183,71	881,42	727,61±65,06	731,38	552,25	819,07	0,008*

Fonte: Próprio autor.

^a Valores de média para o Teste t Student

Tabela 9: Comparação da ingestão alimentar obtido por meio de 3 registros alimentares entre pacientes com DM2 com uso de antidiabético oral como tratamento (GSI) e aqueles que utilizam hormônio da insulina como tratamento (GSI).

Variáveis	GSI (n= 33)				GCI (n=34)				p
	Média ± DP	Mediana	Mínimo	Máximo	Média ± DP	Mediana	Mínimo	Máximo	
Nutriente									
Energia (kcal)*	1752,9±494,15	1643,99	1013	2601,5	1617,97±529,2	1740,92	744,05	2836,13	0,464
Carboidrato (g)*	232,81±66,11	217,13	132,5	352,7	198,48±65,37	187,87	92,64	316,84	0,157
Proteína (g)*	85,1±35,12	82,74	7	149,6	82,42±35,58	86,91	21,26	154,36	0,832
Lipídio (g)	78,59±104,6	49,4	26,99	451,11	54,74±23,66	48,89	24,15	102,84	0,925
Fibra (g)*	24,78±10,47	23,37	8,43	41,89	23,42±8,09	25,36	10,62	40	0,68
Cálcio (mg)	535,37±331,2	412,8	155,52	1466,32	540,45±247,46	541,06	127,56	624,69	0,72
Ferro(mg)*	12,19±5,1	12,7	2,27	20,02	11,22±5,07	11,72	3,5	22,81	0,595
Selênio (µg)	38,05±33,66	35,56	7,1	147,5	95,59±156,15	58,09	7,4	677	0,093
Zinco (mg)*	15,33±8,55	14,64	1,93	31,25	12,37±7,67	10,96	2,67	30,49	0,31
Cobre (mg)*	1,39±0,69	1,32	0,06	2,53	1,16±0,49	1,09	0,35	2,2	0,301
Manganês*	4,19±2,52	3,06	0,82	8,14	3,39±1,97	2,72	0,98	8,51	0,325
Magnésio (mg)*	234,25±101,88	249,67	58,88	406,08	296,7±114,89	295,06	104,86	471,28	0,116
Vitamina A (RE)	528,54±520,27	348,03	50,55	1775,38	504,68±259,64	501,92	80,01	1009,05	0,462
Vitamina E (mg)*	9,46±6,63	9,68	0,23	21,14	9,79±5,24	10	3,4	18,39	0,875

Fonte: Próprio autor.

^a Valores de média para o Teste t Student

Discussão

7. DISCUSSÃO

Diabetes mellitus (DM) é uma condição metabólica caracterizada pela hiperglicemia crônica e resulta de uma interação entre fatores genéticos e ambientais. As causas do DM classificam esta patologia em quatro tipos: DM tipo 1, DM tipo 2, DM gestacional (DMG) e outras, sendo a DM2 a mais comum (ADA, 2019).

A prevalência desta doença tem aumentado no mundo, em parte devido às mudanças do estilo de vida que predispõe os indivíduos à obesidade e sobrepeso (OJO, 2019). Neste presente estudo verificou-se que 90% dos pacientes apresentavam peso acima do adequado, sendo 43% sobrepeso e 47% obeso.

O estilo de vida inadequado associa-se com o excesso de peso, que é um fator de risco para resistência insulínica. O excesso de tecido adiposo bem como o consumo elevado de gordura é capaz de induzir alterações intracelulares que influenciam diretamente na fosforilação dos substratos de receptor de insulina (FREITAS; CESCHINI; RAMALLO, 2014). Além disso, o adipócito é capaz de liberar substâncias que são pró-inflamatórias e consequentemente aumentam a resistência insulínica (DE OLIVEIRA et al., 2020).

Sendo assim, nota-se que o perfil metabólico e consequente controle glicêmico dos pacientes com DM2 influenciam diretamente em seus status clínico e bioquímicos e estes podem ser influenciados por medicamentos. Ao contrário do que ocorre no DM1, os pacientes com DM2, na maior parte das vezes, inicia o tratamento com antidiabéticos orais e à medida que se prolonga o tempo da doença e consequentemente ocorre uma diminuição da função célula β , aumenta-se a frequência do uso da insulina (SBD 2019). Por isso, foi importante comparar estas características em pacientes DM2 em tratamento somente com antidiabético oral e aqueles com uso de insulina também.

A diminuição da atividade das células β geralmente é avaliada pelos níveis de glicemia e hemoglobina glicada, entretanto, também pode ser observada pela produção do peptídeo C. Esta molécula é originada na clivagem da pró-insulina e secretada na circulação porta em quantidades iguais à insulina, por isso ele é conhecido como um marcador útil da função destas células e pode ser utilizado para avaliar a secreção endógena deste hormônio (YIN et al., 2017).

Essa proteína também pode estar alterada no DM2 devido a glicolipotoxicidade que corresponde aos níveis elevados de glicose sanguínea e ácido graxos livres os quais

podem gerar estresse no retículo endoplasmático das ilhotas pancreáticas, que são conhecidos por sintetizar proteínas das células β , como a pró-insulina. Se a homeostase do retículo endoplasmático para produção desta proteína não é recuperada isto pode terminar com células em apoptose e piorar o perfil glicêmico (AKASH; REHMAN; CHEN, 2013).

Neste presente estudo verifica-se que os pacientes com uso de insulina (GCI) apresentam uma maior idade, maiores níveis de glicemia glicada e hemoglobina glicada e menores valores de peptídeo C do que os pacientes que utilizam somente antidiabético oral como tratamento (GSI). Estes resultados corroboram com os estudos anteriores e demonstram uma maior hiperglicemia no GCI devido à diminuição funcional das células responsáveis pela produção de insulina.

Além da alteração na produção do hormônio da insulina, um inadequado controle glicêmico resulta com um aumento do sistema imune inato levando a inflamação (MIRZA et al., 2012). Os mecanismos inflamatórios envolvem hipóxia celular, com acúmulo de macrófagos que além de ativar o estresse do retículo endoplasmático também podem induzir a morte celular das células pancreáticas (TURKMEN, 2017).

A apoptose destas células pode induzir a produção de citocinas que agem tanto em vias de sinalização para aumento da inflamação quanto no estresse oxidativo e resistência à insulina (LIU et al., 2016). Sendo assim, verifica-se que o estado crônico de hiperglicemia gera um metabolismo de carboidrato prejudicado e estende seus efeitos a quase todos os tecidos e órgãos do organismo através do perfil inflamatório e estresse oxidativo (PARAMASIVAN et al., 2020).

Estudos epidemiológicos têm mostrado níveis de citocinas como PCR, IL-6, TNF- α e IL-1 β elevadas em paciente com DM2 (LIU et al., 2016). Isso ocorre porque produtos finais metabólicos resultantes de um controle glicêmico inadequado podem ativar o sistema imune inato levando a inflamação (MIRZA et al., 2012).

Entretanto, níveis elevados dessas citocinas no DM2 podem refletir a ativação de células imune inata por aumento da concentração de nutrientes, mas não necessariamente reflete o grau de inflamação nos tecidos individuais. A intensidade da inflamação varia entre indivíduos e tecidos e a concentração de mediadores inflamatórios podem não refletir a gravidade da inflamação em tecido específico (TURKMEN, 2017; DONATH; SHOELSON, 2011).

Além disso, Liu et al., (2016) ao realizar associação entre marcadores inflamatório e DM2 analisando os fatores de confundimento verificou que PCR e DM2 não dependem

da obesidade e parecem ocorrer mais no sexo feminino. Isto corrobora com o presente estudo em que, embora os pacientes tenham demonstrado excesso de peso, níveis de glicemia e hemoglobina glicada altas, não se verificou concentrações de citocinas inflamatórias acima valores de normalidade.

Adicionado a isso, deve-se considerar que um dos critérios de inclusão dos voluntários foi que os pacientes apresentassem hemoglobina glicada estável por três meses, dessa forma optou-se por pacientes com bom controle glicêmico, sendo que os estudos mostram que elevados níveis de substâncias inflamatórias ocorrem principalmente em pacientes com pobre controle glicêmico.

Quando se compara o perfil inflamatório entre GSI e GCI embora não seja encontrada diferenças significativas verifica-se que os níveis de IL-6 no GCI, em média, são maiores do que o GSI (Tabela 7). Segundo Akash; Rehman & Chen (2013) o IL-6 pode causar resistência insulínica no tecido adiposo e apoptose celular na ilhota pancreática piorando o controle glicêmico. Além disso, a associação entre hiperglicemia, citocinas e proteínas inflamatórias podem causar aumento de espécies reativas de oxigênio e diminuição da defesa antioxidante gerando o estresse oxidativo (IGHODARO, 2018).

A hiperglicemia pode prejudicar o funcionamento adequado das células β e aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), os quais induzem ao estresse oxidativo, que resulta em produtos pró-inflamatórios e geram resistência insulínica e inflamação (AKASH; REHMAN; CHEN, 2013).

Diabetes Mellitus tipo 2 é caracterizado por defeitos nos domínios metabólicos e vascular com múltiplas fontes de radicais livres, as quais começam no início do processo da doença e pioram ao longo do tempo (PARAMASIVAN et al., 2020). Existem vários caminhos ativados pela hiperglicemia que podem acentuar o estresse oxidativo como glicólise, via de produtos finais de glicação avançada (AGE) e caminho de poliol (SOTTERO, 2015).

Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem normalmente nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma e podem ter sua geração favorecida pelos íons cobre (Cu) e ferro (Fe). Estes produtos devem ser controlados por mecanismos de defesas denominados antioxidantes, os quais podem ser composto por enzimas, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX) ou não enzimático como vitaminas A, C e E, zinco (Zn), selênio (Se), cobre (Cu) e magnésio (Mg) (BARBOSA et al., 2010).

A hiperglicemia, comum em pacientes diabéticos, ocasiona um aumento da intensidade de reações de glicação não enzimáticas de proteínas, associada ao estresse oxidativo, as quais prejudicam enzimas antioxidantes como a GPX (PICU et al., 2017). Associado a isso, pesquisas mostram que a atividade de enzima antioxidantes são menores no pâncreas em relação a outros tecidos, o que poderia acentuar o estresse oxidativo nestes pacientes (SIDDIQUI et al., 2019; AYDIN et al., 2000).

Neste estudo verificou-se que os pacientes apresentaram aumento da peroxidação lipídica evidenciado pelo elevado nível de MDA (malondialdeído) e baixa atividade da GPX. O mesmo ocorreu em um trabalho realizado por Aouacheri et al., (2015) que mostrou elevados níveis de MDA e baixas concentrações de GPX em pacientes com DM quando comparados à indivíduos saudáveis.

Outros estudos também mostram esta relação. Os autores avaliam duas possibilidades, sendo que a primeira ocorre devido a uma redução observada na GPX dos diabéticos que pode indiretamente levar ao aumento da peroxidação lipídica e a segunda que níveis mais altos de MDA podem afetar de alguma forma a atividade da GPX (HISALAR et al., 2012).

Ao comparar o GSI com o GCI verifica-se que o primeiro apresenta níveis menores de MDA, GSSG e GPX e níveis mais elevados de FRAP. Malondialdeído (MDA) associa-se com a peroxidação lipídica e consequentemente estresse oxidativo e GSSG e GPX representam a atividade antioxidante (REHMAN; AKASH, 2017). Sendo assim, observa-se que neste estudo o grupo com uso de insulina embora apresente um maior estresse oxidativo, possui maior atividade antioxidante do que o grupo sem uso de insulina.

O aumento da glicose pode aumentar a principal fonte de geração de espécies reativas de oxigênio que ocorre na cadeia mitocondrial e resulta na formação de superóxido (O_2^-), o qual é produzido pela NADPH oxidase (REHMAN; AKASH, 2017). Além disso, na hiperglicemia, uma grande quantidade da molécula é canalizada para o caminho do poliol, resultando no aumento do sorbitol e consumo excessivo de NADPH. Este apresenta papel essencial na manutenção do ciclo de redução celular, em que a molécula NADPH é utilizada como cofator para manter a GSH (glutathiona), utilizada na proteção antioxidante (IGHODARO, 2018).

O superóxido formado na respiração celular sofre processo de dismutação catalisado pela enzima superóxido dismutase (SOD) e se transforma em peróxido de hidrogênio, que é transformado em duas moléculas de água pela enzima GPX através da

conversão da glutathiona reduzida (GSH) à glutathiona oxidada (GSSG) (BARBOSA et al., 2010).

De acordo com Steinbrenner (2013) o peróxido de hidrogênio em pequenas concentrações é requerido como um mensageiro secundário na cascata de sinalização intracelular da insulina, pois age na liberação de cálcio, o qual estimula secreção de insulina e também inativa PTP-1B e PTEN, que agem no receptor de insulina impedindo sua fosforilação em serina, resultando na melhora da sinalização desse hormônio. Ao mesmo tempo, o excesso de ROS pode atenuar esta sinalização por ativar apoptose da proteína quinase B (Akt), o qual age no GLUT 4 estimulando a entrada da glicose na célula.

Sendo assim, o equilíbrio entre estresse oxidativo e perfil antioxidante é extremamente importante para controle glicêmico e ação da insulina. Trabalhos realizados com camundongos observaram que aqueles que apresentaram superexpressão da glutathiona peroxidase 1 (*GPX1*) desenvolveram resistência à insulina, hiperglicemia e obesidade enquanto, os camundongos nocauteados com essa enzima demonstraram sensibilidade melhorada à insulina (MCCLUNG et al., 2004; LOH et al., 2009).

Rehman & Akash (2017) ao observarem pacientes com DM2 verificaram que estes apresentavam concentrações diminuídas de GSH (glutathiona reduzida) e níveis elevados de GSSG (glutathiona oxidada), o que adicionado ao trabalho anterior suporta a ideia que o estresse oxidativo é fortemente correlacionado com a patogênese da diabetes.

Além disso, o peróxido de hidrogênio na presença de íons ferro ou cobre pode formar o radical hidroxil ($\text{OH}\cdot$) através da Reação de Fenton e da Reação de Haber-Weiss. Uma maneira de avaliar essa via é através do FRAP (Poder antioxidante redutor do ferro), em que níveis baixos desses marcadores indicam menor capacidade de ligação do ferro à ferritina e maior quantidade desses íons livres para catalisar a geração de radicais $\text{OH}\cdot$ e consequentemente aumentar as espécies reativas de oxigênio (BARBOSA et al., 2010).

Dessa forma, o que parece ocorrer em pacientes DM2 em geral é um aumento do estresse oxidativo e menor capacidade antioxidante e quando se compara os tipos de tratamento verifica-se que aqueles com uso de insulina, o aumento do estresse oxidativo é evidenciado pelo maior MDA e embora não haja diferença entre o perfil antioxidante geral evidenciado pela CAOT verifica-se que a via antioxidante das glutathionas estão em maior atividade no GCI do que no GSI.

Abou-Seif & Youssef (2004) ao comparem grupos controle, com pacientes diabéticos sem uso de insulina e com uso de insulina observaram, assim como este

trabalho, que o MDA está aumentado em pacientes diabético e ao comparar os tipos de tratamento verificou que pacientes sem uso de insulina apresentavam níveis mais elevados de produtos da via AGE e menores concentrações de GSH.

Outros pesquisadores compararam 3 grupos de pacientes diabéticos – somente antidiabético oral, uso de baixa dose de insulina e uso de alta dose de insulina e observaram que a ativação do estresse oxidativo parece depender primeiramente das classes de antidiabéticos ou em combinação com insulina e em segundo lugar com as doses de insulina administrada, sendo que menores doses sugerem efeitos pró-oxidantes semelhantes à população saudável (MONNIER et al., 2011).

Vale ressaltar que o perfil antioxidante não depende somente de agentes enzimáticos, micronutrientes também desempenham papel importante direta ou indiretamente neste processo (ALGHOBASHY et al., 2018). O estresse oxidativo pode ser controlado por substâncias não enzimáticas como vitaminas A, C e E e minerais, cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn) e selênio (BARBOSA et al., 2010). Estes podem atuar como cofatores de enzimas antioxidantes ou diretamente como um fator protetor do estresse oxidativo.

A alteração destes nutrientes além de contribuir com o estresse oxidativo também pode desempenhar um papel na perturbação normal do metabolismo de glicose e insulina e contribuir com a resistência insulínica (FORTE et al., 2013), já que eles estão envolvidos na síntese e secreção desse hormônio e consequente controle glicêmico (RODRIGUES, MELO, DOMINGUETE; 2020).

A inadequação destes elementos traços ocorre principalmente na combinação de doenças crônicas não transmissíveis e má absorção, o qual pode ser consequência da nutrição, estilo de vida, ritmo sazonal e circadiano, drogas, cirurgias, terapia física e morbidade (ALGHOBASHY et al., 2018; KRUSE-JARRES, RÜKGAEUER, 2000). Além disso, pacientes com DM2 podem apresentar alteração da excreção urinária, a qual também altera o perfil destes minerais (RODRIGUES; MELO; DOMINGUETI, 2020).

De acordo com a avaliação da ingestão alimentar dos pacientes deste estudo, verificou-se uma ingestão inadequada de cálcio, vitamina A e vitamina E e nenhuma diferença entre os grupos. A ingestão alimentar foi obtida através do registro alimentar de três dias. Este método de avaliação nutricional embora seja rápido, barato e prático apresenta uma série de limitações, como a alteração do que foi consumido, estimativa de porções, conhecimento de medidas caseira, as sobras podem alterar os valores

computados, o que pode não apresentar dados fidedignos (FISBERG; MARCHIONI; COLUCCI, 2009).

Dessa forma, o exame bioquímico reflete melhor o perfil nutricional destes pacientes. Na avaliação bioquímica os pacientes apresentaram níveis abaixo do adequado do Se e Ca sérico e Se eritrocitário. Também se verificou níveis acima do adequado de manganês eritrocitário. De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes (2019), a deficiência de vitaminas e minerais são comuns nestes pacientes e parecem estar relacionadas com o aumento da concentração da hemoglobina glicada, progressão e complicação do diabetes.

Os trabalhos que demonstram as alterações destes nutrientes em pacientes diabéticos ainda são controversos, pois dependem do perfil clínico do paciente, especialmente se há um bom ou mal controle glicêmico e o meio em que será avaliado este nutriente (EKMEKCIOGLU et al., 2001). Após investigar a associação entre prevalência de DM2 e a concentração de 25 elementos traços no sangue total, Simić et al. (2017) encontraram uma associação positiva com boro, cálcio e prata e inversamente com chumbo e magnésio. Não foi verificada associação com selênio, zinco e cromo.

Uma pesquisa semelhante que comparou a concentração de alguns metais em indivíduos saudáveis e pacientes diabéticos não verificou relação com zinco, selênio e ferro, porém encontrou uma deficiência sérica de manganês e de cobre em homens (FORTE et al., 2013). Assim como neste presente estudo, Kljai & Runje (2001) verificaram níveis eritrocitários de selênio abaixo do adequado. O status desse mineral pode gerar informações do estado metabólico, particularmente em pacientes que possuem DM há longo período e consequentemente um menor controle estaria relacionado com menores concentrações de selênio (KOHLENER et al., 2018).

Além disso, vários fatores podem alterar a distribuição destes nutrientes nos diferentes meios de análises. Mudanças nas concentrações dos elementos traços nos diferentes tipos de células mostram um melhor entendimento da patogênese e distúrbios metabólicos do que o plasma ou sangue total (SOBCZAK et al, 2019; KRUSE-JARRES; RÜKGAUER, 2000)

Neste trabalho nota-se que não houve diferenças significativa entre nas concentrações séricas dos minerais analisados entre os diferentes grupos, entretanto, nas concentrações eritrocitárias verificou-se que o GCI possui maior concentração de zinco, manganês e ferro e menor de cobre.

O zinco está envolvido no controle glicêmico tanto com síntese, estocagem e secreção de insulina como cofator para enzimas envolvidas no metabolismo de macronutrientes (FORTE et al., 2013). Além disso, age como um antioxidante por estar envolvido na estabilização da estrutura de membrana, na restrição da produção endógena de radicais livres, como cofator de enzimas antioxidantes e na manutenção das concentrações teciduais de metalotioneínas, as quais desempenham a função de sequestrar radicais livres (FUKUNAKA; FUJITANI, 2018).

O nível deste mineral em pacientes diabéticos ainda se apresenta controverso na literatura. Em alguns trabalhos é observado baixas concentrações e em outros altos níveis de Zn em paciente com DM2 (FERNÁNDEZ-CAO et al., 2019). De acordo com Kruse-Jarres, Rükgaue (2000) a intensidade da hiperglicemia correlaciona com baixas concentrações de zinco do plasma e maiores concentrações nos eritrócitos. Em casos de DM dependente de insulina, hipozincaemia é observado durante cetose e corrigido pelo tratamento desse hormônio, com melhora da sensibilidade a insulina (FAVRE, 2003).

É necessário um cuidado com este nutriente pois um desequilíbrio para mais ou para menos podem trazer complicações ao paciente. O aumento do zinco pode manipular a homeostase da leptina no corpo e resultar em aumento do índice de massa corporal e consequente aumento da resistência insulínica (ZHANG et al., 2017). Enquanto a deficiência pode diminuir a atividade da GPX e aumentar a peroxidação lipídica (ALGHOBASHY et al., 2018).

Isso pode ocorrer porque o zinco é um cofator da enzima superóxido dismutase (SOD) que catalisa a conversão do superóxido em peróxido de hidrogênio e no citoplasma é dependente da relação Cu/Zn (FUKUNAKA, FUJITANI, 2018; BARBOSA et al., 2010). Trabalho mostram que perdas destes minerais possuem relação com menor atividade da SOD (FORTE et al., 2013).

Associado a isso, estes micronutrientes além de constituírem locais ativos e/ou estabilizarem a conformação de enzimas antioxidantes, também competem pelos locais de ligação de ferro e cobre e podem fornecer proteção contra lesões mediadas por metais de transição e induzida por radicais livres (ABOU-SEIF; YOUSSEF, 2004).

O ferro embora esteja relacionado com a enzima catalase, em excesso é altamente pró-oxidante e que o aumento do seu íon livre pode aumentar o estresse oxidativo, o que parece estar envolvido com a patogênese da retinopatia diabética (FORTE et al., 2013). Como citado anteriormente, o ferro e o cobre estão envolvidos com as reações de Fenton e de Haber-Weiss, em que são produzidas espécies reativas de oxigênio, entretanto,

embora o cobre possa catalisar essas reações, o ferro por ser mais pesado e abundante no organismo está biologicamente mais capacitado e desenvolve um papel maior no estresse oxidativo (BARREIROS et al., 2006).

Outro mineral envolvido neste processo é o manganês. A superóxido dismutase no citoplasma é dependente de Zn e Cu e na mitocôndria é dependente do Mn (MnSOD) (LONGMAN; XIAOBO, 2018). A MnSOD é o primeiro antioxidante a eliminar os superóxidos formados na mitocôndria e protege contra o estresse oxidativo (LI; YANG, 2018).

Além de ser constituinte de metaloenzimas, o manganês é envolvido com metabolismo de carboidrato e lipídio, acelera síntese de proteína, vitamina C e B e em concentração adequada é requerido para síntese e secreção de insulina (FORTE et al., 2013). De acordo com Li & Yang (2018) tratamento com Mn pode aumentar secreção de insulina para melhorar a tolerância à glicose mesmo em condições de estresse e diminuir produção de ROS e NADPH oxidase, diminuindo o risco de disfunção endotelial.

Por fim, o selênio também é outro nutriente que desempenha um importante papel no estresse oxidativo e controle glicêmico. O excesso desse metal eleva o risco de desenvolver diabetes e síndrome metabólica (MAO; TENG, 2013). A maior parte do selênio eritrocitário está ligado à GPX e atuam no controle glicêmico (KOHLENER et al., 2018).

Trabalhos mostram que tanto a deficiência desse micronutriente como o excesso podem aumentar resistência insulínica. Isso pode ocorrer por envolvimento de três mecanismos: primeiro porque o selênio é uma componente chave em selenoproteínas envolvidos com homeostase de oxi-redução; segundo porque atua em enzimas envolvidas com estresse oxidativo e controle glicêmico e terceiro porque selênio pode mediar a ação da insulina (WONG-OGAWA; BERRY, SEAL, 2016; ZHOU; HUANG; LEI, 2013).

A selenoproteína 1 (SELENOP) além de agir como proteína transportadora do selênio para tecidos e biossíntese intracelular de proteínas dependentes de selênio também pode atuar nas células β e suprimir a sinalização de insulina diminuindo a sensibilidade à insulina (WONG-OGAWA; BERRY, SEAL, 2016). Dessa forma, a concentração adequada neste micronutriente é importante para manter os níveis ideais de SELENOP e GPX para atuar no controle glicêmico e atuação antioxidante adequada.

Dessa forma, é importante ressaltar que existem diferentes formas do selênio inorgânica e orgânica, selenito e selenato. De acordo com Steinbrenner (2013), trabalhos realizados em animais mostraram que as suplementações com as diversas formas desses

nutrientes agiram de forma diferente no controle glicêmico, sendo que o selenato mostrou-se eficiente enquanto selenito apresentou um controle pior do que animais deficientes e sem suplementação.

Sendo assim, verifica-se que há um importante papel dos micronutrientes no controle glicêmico dos pacientes com DM2, tanto do que diz respeito a síntese e secreção da insulina quanto no perfil metabólico, especialmente no estresse oxidativo. Dessa forma, estes nutrientes associados ao tratamento influenciam em rotas metabólicas de pacientes com DM2.

Conclusão

8. CONCLUSÃO

Pacientes com *Diabetes mellitus* tipo 2 apresentam peso, glicemia e hemoglobina glicada acima do adequado, o que pode interferir no perfil metabólico dos pacientes, alterando citocinas inflamatórias e estresse oxidativo.

Pacientes com DM2 apresentam um maior poder oxidativo evidenciado pelo aumento dos níveis de MDA e menor poder antioxidante, verificado pelos menores valores de GPX. Entretanto, os pacientes com uso de insulina demonstraram uma melhor defesa antioxidante do que os pacientes sem insulina.

A via de ativação do estresse oxidativo nos pacientes com insulina parecem depender de micronutrientes que são cofatores de enzimas antioxidantes, como zinco, cobre, manganês e ferro. Sendo assim, verifica-se que pacientes com insulina apresentam melhor perfil eritorocitário destes minerais e consequentemente melhor defesa contra radicais livres.

Além disso, a enzima chave para determinar este processo parece ser a SOD, os quais dependem principalmente de zinco e manganês para o bom funcionamento. Dessa forma, a ativação desta via levou a utilização maior da GPX para reduzir os níveis de peróxido de hidrogênio, mesmo com concentrações menores do selênio.

Portanto, o perfil metabólico do paciente diabético, como já conhecido, é influenciado pelo controle glicêmico, o qual dependerá do estilo de vida do paciente associado ao tipo de tratamento e também pelo perfil de micronutrientes, principalmente manganês e zinco, em que de acordo com este trabalho demonstraram maior atuação nas vias metabólicas.

Referências Bibliográficas

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-SEIF, M. A.; YOUSSEF, A. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clinica Chimica Acta* 2004, 346 (2): 161-170, 2004. doi: 10.1016/j.cccn.2004.03.030

ALGHOBASHY, A. A. et al. Trace elements and oxidative stress in Children with Type 1 Diabetes Mellitus. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2018, 26 (11): 85-92. doi: 10.2147/DMSO.S157348

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Position Statement. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2009; 32: 62-67. doi:10.2337/dc09-S062

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Glycemic Targets: Standards of Medical Care in Diabetes 2019. *Diabetes Care* 2019. 42, Suppl 1:61-70. doi: 10.2337/dc19-S006.

AKASH, M. S. H.; REHMAN, K.; CHEN, S. Role of inflammatory mechanisms in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Journal of cellular biochemistry*, 2013, 114(3): 525-531. doi: 10.1002/jcb.24402

ALEXANDRAKI, K. et al. Inflammatory process in type 2 diabetes: The role of cytokines. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006, 1084(1): 89-117. doi:10.1196/annals.1372.039

ALI, M. K. et al. Achievement of goals in US diabetes care, 1999–2010. *New England Journal of Medicine* 2013, 368(17): 1613-1624. doi: 10.1056/NEJMsa1213829

ALZAMIL, H. Elevated Serum TNF- α Is Related to Obesity in Type 2 Diabetes Mellitus and Is Associated with Glycemic Control and Insulin Resistance. *Journal of Obesity* doi: 10.1155/2020/5076858

AOUACHERI, O. et al. The investigation of the oxidative stress-related parameters in type 2 diabetes mellitus. *Canadian journal of diabetes* 2015, 39 (1): 44-49. doi: 10.1016/j.jcjd.2014.03.002

AYDIN, A. et al. Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control. *Clinical biochemistry* 2001, 34 (1): 65-70. doi: 10.1016/s0009-9120(00)00199-5.

BAHIA, L. R. et al. The costs of type 2 *diabetes mellitus* outpatient care in Brazilian Public health system. *Value Health*, 2011, 14 (5 Suppl 1): 137-40. doi: 10.1016/j.jval.2011.05.009

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de nutrição* 2010, 23 (4): 629-643. doi:10.1590/S1415-52732010000400013

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química nova* 2006, 29 (1): 113-123. doi:10.1590/S0100-40422006000100021

BATISTA, B. L. et al. Exploiting dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS) for sequential determination of trace elements in blood using a dilute-and-shoot procedure. *Anal Chim Acta* 2009, 639 (1-2): 13-18. doi:10.1016/j.aca.2009.03.016.

DE OLIVEIRA, C. B. C. Obesity: inflammation and bioactive compounds. *Journal of Health & Biological Sciences* 2020, 8 (1): 1-5. doi: 10.12662/2317-3076jhbs.v8i1.2785.p1-5.2020

DONATH, M. Y.; SHOELSON, S. E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology* 2011, 11 (2): 98-107. doi:10.1038/nri2925

DUWAYRI, Y.; JORDAN JR, W. D. Diabetes, dysglycemia, and vascular surgery. *Journal of vascular surgery* 2019, 71(2):701-711. doi: 10.1016/j.jvs.2019.05.027

EKMEKCIOGLU, C. et al. Concentrations of seven trace elements in different hematological matrices in patients with type 2 diabetes as compared to healthy controls. *Biological Trace Element Research* 2001, 79 (3): 205-219. doi: 10.1385/BTER:79:3:205

FAURE, P. Protective effects of antioxidant micronutrients (vitamin E, zinc and selenium) in type 2 diabetes mellitus. *Clinical chemistry and laboratory medicine* 2003, 41 (8): 995-998. doi: 10.1515/CCLM.2003.152

FERNÁNDEZ-CAO, J.C. et al. Zinc Intake and Status and Risk of Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 2019,11(5):1027. doi: 10.3390/nu11051027.

FUKUNAKA, A.; FUJITANI, Y. Role of Zinc Homeostasis in the Pathogenesis of Diabetes and Obesity. *Int J Mol Sci*. 2018, 19(2):476. doi: 10.3390/ijms19020476.

FISBERG, R. M.; MARCHIONI, D. M. L.; COLUCCI, A. C. A. Avaliação do consumo alimentar e da ingestão de nutrientes na prática clínica. *Arquivos Brasileiros de*

Endocrinologia & Metabologia 2009, 53 (5): 617-624. doi: 10.1590/S0004-27302009000500014

FORTE, G. et al. Blood metals concentration in type 1 and type 2 diabetics. Biological trace element research 2013, 156 (1-3): 79-90. doi: 10.1007/s12011-013-9858-6

FREITAS, M. C.; CESCHINI, F. L.; RAMALLO, B. T. Resistência à insulina associado à obesidade: efeitos anti-inflamatórios do exercício físico. Revista Brasileira de Ciência e Movimento 2014, 22 (3):139-147. doi: 10.18511/0103-1716/rbcm.v22n3p139-147

GUEGUEN, S. et al. Changes in serum retinol, alpha-tocopherol, vitamin C, carotenoids, zinc and selenium after micronutrient supplementation during alcohol rehabilitation. J Am Coll Nutr 2003; 22: 303–310. doi: 10.1080/07315724.2003.10719308

IGHODARO, O. M. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 108: 656-662. doi: 10.1016/j.biopha.2018.09.058

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF, Atlas, 8th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2017.

KOHLER, L. N. et al. Selenium and Type 2 Diabetes: Sistematic review. Nutrients. 2018 10(12):1924. doi: 10.3390/nu10121924.

KORNHAUSER, C., et al. Serum selenium and glutathione peroxidase concentrations in type 2 diabetes mellitus patients. Primary Care Diabetes, 2008, 2 (2): 81-85. doi: 10.1016/j.pcd.2008.02.003

KLJAI, K.; RUNJE, R. Selenium and glycogen levels in diabetic patients. Biological trace element research 2001, 83 (3): 223-229. doi: 10.1385/BTER:83:3:223

KRUSE-JARRES, J. D.; RÜKGAUER, M. Trace elements in diabetes mellitus. Peculiarities and clinical validity of determinations in blood cells. Journal of trace elements in medicine and biology 2000, 14 (1): 21-27. doi: 10.1016/S0946-672X(00)80019-X

LI, L.; YANG, X.. The essential element manganese, oxidative stress, and metabolic diseases: links and interactions. Oxidative medicine and cellular longevity 2018, 2018: 1-11. doi: 10.1155/2018/7580707

LOH, K. et al. Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity. Cell Metab 2009, 10:260–272. doi: 10.1016/j.cmet.2009.08.009

LIU, C. et al. Adiponectin, TNF- α and inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Cytokine* 2016, 86: 100-109. doi: 10.1016/j.cyto.2016.06.028

LONGMAN, L; XIAOBO, Y. The Essential Element Manganese, Oxidative Stress, and Metabolic Diseases: Links and Interactions. *Oxid Med Cell Longev.* 2018; 2018: 7580707. doi: 10.1155/2018/7580707

MAO, J.; TENG, W. The relationship between selenoprotein P and glucose metabolism in experimental studies. *Nutrients* 2013, 5 (6):1937-1948. doi: 10.3390/nu5061937

MCCLUNG, J. P. et al. Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004, 101 (24): 8852–8527. doi:10.1073/pnas.0308096101

MIRZA, S. et al. Type 2-diabetes is associated with elevated levels of TNF-alpha, IL-6 and adiponectin and low levels of leptin in a population of Mexican Americans: a cross-sectional study. *Cytokine* 2012, 57 (1): 136-142. doi: 10.1016/j.cyto.2011.09.029

MONNIER, L. et al. Insulin therapy has a complex relationship with measure of oxidative stress in type 2 diabetes: a case for further study. *Diabetes/metabolism research and reviews* 2011, 27 (4):348-353. doi.org/10.1002/dmrr.1174

NAVARRO-ALARCON, M.; LÓPEZ-MARTINEZ, M. C. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. *Science of the Total Environment* 2000, 249 (1-3): 347-371. doi: 10.1016/s0048-9697(99)00526-4

O'DELL, B. L. Role of zinc in plasma membrane function. *The Journal of nutrition* 2000, 130 (5): 1432-1436. doi: 10.1093/jn/130.5.1432S

OJO, O. Dietary Intake and Type 2 Diabetes. *Nutrients* 2019, 11: 2177. doi:10.3390/nu11092177

PARAMASIVAN, S. et al. Serum albumin cysteine trioxidation is a potential oxidative stress biomarker of type 2 diabetes mellitus. *Scientific Reports* 2020, 10 (1):1-12. doi: 10.1038/s41598-020-62341-z

PICU, A. et al. Markers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Romanian Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Obesity. *Molecules* 2017, 22 (5):714. doi: 10.3390/molecules22050714.

RADERMECKER, R. P.; RENARD, E.; SCHEEN, A. J. Circulating insulin antibodies: influence of continuous subcutaneous or intraperitoneal insulin infusion, and impact on

glucose control. *Diabetes/metabolism research and reviews* 2009, 25 (6): 491-501. doi: 10.1002/dmrr.961

REHMAN, K.; AKASH, M. S. H. Mechanism of generation of oxidative stress and pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: how are they interlinked? *Journal of cellular biochemistry* 2017, 118 (11): 3577-3585. doi: 10.1002/jcb.26097.

RENDRA, E. et al. Reactive oxygen species (ROS) in macrophage activation and function in diabetes. *Immunobiology* 2019, 224 (2): 42-253. doi: 10.1016/j.imbio.2018.11.010

RODRIGUES, A. K.; MELO, A. E.; DOMINGUETI, C. P. Association between reduced serum levels of magnesium and the presence of poor glycemic control and complications in type 1 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews* 2020, 14 (2): 127-134. doi: 10.1016/j.dsx.2020.01.015

SHARMA, J. K.; GUPTA, A.; KHANNA, P. Diabetes and respiratory system including tuberculosis-challenges. *Indian Journal of Tuberculosis* 2019, 66 (4): 533-538. doi: 10.1016/j.ijtb.2019.11.006

SIDDIQUI et al. Association of Oxidative Stress and Inflammatory Markers With Chronic Stress in Patients With Newly Diagnosed Type 2 Diabetes. *Diabetes Metab Res Ver.* 2019, 35(5):3147. doi: 10.1002/dmrr.3147

SIMIĆ, A. et al. Trace element status in patients with type 2 diabetes in Norway: The HUNT3 Survey. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2017, 41: 91-98. doi: 10.1016/j.jtemb.2017.03.001

SINGER, J. A. A simple procedure to compute the sample size needed to compare two independent group when the population variances are unequal. *Statistics in medicine*, 2001; 20:1089-1095. doi: 10.1002/sim.722

SOBCZAK, A. I. S. et al. Total plasma magnesium, zinc, copper and selenium concentrations in type-I and type-II diabetes. *Biometals* 2019, 32:123–138. doi: 10.1007/s10534-018-00167

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2019-2020. São Paulo: Clannad; 2019. Disponível em: <<https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/DIRETRIZES-COMPLETA-2019-2020.pdf>. > Acesso em 20 de março 2020.

SOTTERO, B. et al. Postprandial dysmetabolism and oxidative stress in type 2 diabetes: pathogenetic mechanisms and therapeutic strategies. *Medicinal research reviews* 2015, 35 (5): 968-1031. doi: 10.1002/med.21349

STEINBRENNER, H. Interference of selenium and selenoproteins with the insulin-regulated carbohydrate and lipid metabolism. *Free Radical Biology and Medicine* 2013, v 65: 1538-1547. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.016

STRAIN, W. D.; PALDANIUS, P. M. Diabetes, cardiovascular disease and the microcirculation. *Cardiovascular diabetology* 2018, 17 (1): 57. doi: 10.1186/s12933-018-0703-

TURKMEN, K. Inflammation, Oxidative Stress, Apoptosis, and Autophagy in Diabetes Mellitus and Diabetic Kidney Disease: The Four Horsemen of the Apocalypse *Int Urol Nephrol* 2017, 49(5):837-844. doi: 10.1007/s11255-016-1488-4

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química nova* 2007, 30 (5): 1323-1338. doi: 10.1590/S0100-40422007000500046

WONG-OGAWA, A.N; BERRY, M.J; SEAL, L.A. Selenium and Metabolic Disorders: An Emphasis on Type 2 Diabetes Risk . *Nutrients* 2016, 8 (2): 80; doi:10.3390/nu8020080

World Health Organization (WHO). Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Geneva: World Health Organization; 1995, 854:452 doi.org/10.1017/S0021932098261359

World Health Organization (WHO), editor. Global health risks: mortality and burden of diseases attributable to selected major risks. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2009. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44203/9789241563871_eng.pdf> Acesso em 10 de dezembro de 2019.

YIN, P. et al. C-peptide levels and the risk of diabetes and pre-diabetes among Chinese women with gestational diabetes. *Journal of diabetes and its complications* 2017, 31 (12): 1658-1662. 10.1016/j.jdiacomp.2017.08.006

ZHANG, H. et al. Alterations of serum trace elements in patients with type 2 diabetes. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2017, 40:91-96. doi: 10.1016/j.jtemb.2016.12.017

ZHOU, J.; HUANG, K.; LEI, X. G.. Selenium and diabetes—evidence from animal studies. *Free Radical Biology and Medicine* 2013, 65 1548-1556. 10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.012

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O(a) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar do estudo denominado **“Participação do selênio na modulação da síntese de insulina e controle glicêmico de pacientes com e sem uso de insulina”**. Este estudo irá avaliar as concentrações de microelementos como selênio, magnésio e zinco e selenometabólitos em seu organismo, os quais estão envolvidos diretamente com a produção do hormônio da insulina, essencial para o controle da glicemia. Além disso, o(a) senhor(a) terá o perfil nutricional avaliado.

Para este trabalho será realizada uma avaliação nutricional, na qual será aferido o peso, altura, massa gorda e massa magra. Também haverá uma avaliação alimentar através de 3 registros alimentares, na qual, para isto, lhe será entregue um papel para que seja anotado tudo o que comer e beber durante três dias.

Além disso, serão coletados dois frascos de 5 ml cada de sangue, no mesmo dia em que estiver marcado o retorno no ambulatório de Diabetes, essa quantidade já é a retirada rotineiramente. Essas amostras serão necessárias para verificação dos níveis de microelementos e selenometabólitos envolvidos com a síntese de insulina e importantes para controle da *Diabetes Mellitus*.

O benefício que este estudo trará ao paciente é em relação ao perfil nutricional dele, o qual terá uma avaliação sobre o seu peso, estado nutricional, principalmente em relação aos micronutrientes, e alimentação, sendo que, possíveis inadequações poderão ser corrigidas. O estudo não trará nenhum risco para saúde do paciente. O único possível risco será a picada com agulha na coleta do sangue, a qual poderá resultar em um pequeno hematoma, porém a coleta será realizada por um profissional especializado e bem treinado.

Este estudo não fornece nenhum tipo de pagamento para os participantes.

O(a) senhor(a), caso aceite participar da pesquisa, terá acesso a todos os resultados pelos participantes da pesquisa e receberá uma via (e não uma cópia) do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assinado pelo participante e pelo pesquisador. O(a) senhor(a) tem o direito de desistir do estudo em qualquer momento, sem prejudicar o tratamento que recebe no Hospital.

Todas as informações obtidas serão mantidas em sigilo, apresentadas em revistas científicas e congressos sem sua identificação.

Em caso de dúvidas em relação à pesquisa o telefone de contato dos pesquisadores responsáveis: Livia Fernandes de Lima e Prof. Dr. Anderson M. Navarro é : (16) 33153367 e para os esclarecimento de dúvidas ética, o contato do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto é (16) 3602-2228 e funciona das 8:00 às 17:00.

Dessa forma, o(a) senhor(a) está sendo convidado(a) e aceita livremente a participar do estudo intitulado “Participação do selênio na modulação da síntese de insulina e controle glicêmico de pacientes com e sem uso de insulina”, sob a responsabilidade dos pesquisadores Livia Fernandes de Lima e Prof. Dr. Anderson Marliere Navarro, docente do departamento de Clínica Médica do HCFMRP- USP.

Data: _____

Nome do participante: _____ Assinatura: _____

Data: _____

Nome do pesquisador: _____ Assinatura: _____

Universidade de São Paulo
Av. Bandeirantes, 3900 – Monte Alegre
CEP: 14049-900 Ribeirão Preto/SP
Fone: (16) 33153367

ANEXO 2**MANUSCRITO ENVIADO PARA CLINICAL NUTRITION**

Title: The role of manganese, zinc, selenium, and cooper in the metabolic profile and glycemic control of patients with and without the use of insulin

Authors: Livia Fernandes de Lima MSc^{a*}, Lígia Moriguchi Watanabe Ph.D.^a, Rafael Ferraz-Bannitz MSc^a, Vivian Marques Miguel Suen Ph.D^a, Maria Cristina Foss de Freitas Ph.D^a, Fernando Barbosa Júnior Ph.D^b, Anderson Marliere Navarro Ph.D^a.

Affiliation:

^a Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo - FMRP/USP, Brazil

^b Department of Clinical and Toxicological Analyses and Bromatology, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo - FCFRP/USP, Brazil

- Word count: 6250
- Tables: 7
- Figures: 1

Corresponding author: Livia Fernandes de Lima. 3900, Bandeirantes Avenue. Monte Alegre, 14049-900. Ribeirão Preto - SP, Brazil. E-mail address: livia.lima@usp.br

ABSTRACT

Background and aims: *Diabetes Mellitus* (DM) is characterized by hyperglycemia and could be associated with complications such as inflammation and oxidative stress, which is influenced by the concentration of zinc (Zn), manganese (Mn), iron (Fe), copper (Cu), and selenium (Se). The imbalance in the level of these micronutrients can contribute to increased insulin resistance and the development of diabetic complications. The aim of this study was to evaluate the effect of micronutrients Mn, Zn, Se and Cu on the metabolic profile and glycemic control in patients with type 2 DM with or without the use of insulin.

Methods: A total of 67 patients were selected at the Clinics Hospital at Ribeirão Preto Medical School and separated into two groups: group of patients using insulin (GPUI; n = 34) and group of patients without insulin use (GPWI; n = 33). Anthropometric data, dietary records, and evaluation of clinical, inflammatory and oxidative stress profiles were performed. Serum and erythrocyte concentrations of micronutrients were also analyzed. **Results:** Among the total of 67 patients with DM2 90% were overweight. These patients had higher serum levels of glycemia, glycated hemoglobin and triglycerides. but deficiency of serum selenium ($88.27 \mu\text{g} / \text{L}$) and calcium ($7.61\text{mg} / \text{dL}$). Considering the oxidative stress parameters, we found increased levels of malonaldehyde (MDA) and a decreased levels of glutathione peroxidase activity (GPX). Between groups, the GPUI was predominately composed by women ($X^2 = 4.35$; $p = 0.04$) and the mean of age was higher than GPWI. We also verified higher serum concentrations of glycemia and glycated hemoglobin, higher concentrations of erythrocyte Zn ($14.71\mu\text{g} / \text{L}$; $p = 0.001$), Mn ($23.34\mu\text{g} / \text{L}$; $p = 0.01$) and Fe ($727.6 \text{ mg} / \text{L}$; $p = 0.008$), and lower concentrations of erythrocyte Cu ($0.012 \mu\text{g} / \text{dL}$; $p = 0.012$) when compared with GPWIU. In addition, GPUI had significantly higher levels of MDA ($7.46 \text{ nmol} / \text{mL}$; $p < 0.0001$), GSSG (30.97

nmol / mL; $p = 0.004$) and GPX (33.63U / mL; $p < 0, 0001$) and lower levels of FRAP (0.97 nmol / mL; $p = 0.03$) and C-peptide (1776.22pg / mL; $p = 0.0001$) than GPWIU.

Conclusion: In general, patients with DM2 had increased oxidative stress. However, patients with DM2 using insulin demonstrated a better antioxidant defense than patients without insulin use. The oxidative stress activation pathway may be dependent of the profile of micronutrients, especially Zn and Mn, cofactors of antioxidant enzymes. Therefore, the metabolic profile of the DM2 patient appears to be influenced by glycemic control, dependent of the patient's lifestyle and treatment.

Keywords: *Diabetes Mellitus*, minerals, oxidative stress, inflammatory profile

Introduction

Diabetes Mellitus (DM) is a metabolic disorder characterized by persistent hyperglycemia due to deficient production or inefficacy activity of the hormone insulin which in the long term generates complications to the body [1,2,3].

Oxidative stress is a DM complication. In certain pathological stages, the increase of the production or elimination of reactive oxygen species (ROS) by antioxidants can play a crucial role in determining tissue damage [4].

The central ROS generation occurs in the mitochondria in the energy synthesis process and produces hydrogen peroxide (H_2O_2) as the final product from the activity of superoxide dismutase enzyme (SOD) [5]. According to Steinbrenner (2013) [6], in a lower concentration H_2O_2 participates as a secondary messenger in the activity and production of insulin but the excessive levels induce oxidative stress.

The control of the production of this molecule in pancreatic cells occurs through the action of glutathione peroxidase (GPX), an antioxidant which is activated by the presence of H_2O_2 [5,6]. The excess of the antioxidant activity of GPX could decrease the

concentration of H_2O_2 and consequently attenuate the insulin signaling but the deficiency would greatly increase the H_2O_2 and decrease the secretion of glucose-stimulated insulin (GSIS). Thus, a balance between ROS and antioxidants is necessary [6].

In addition, the concentration of microelements such as manganese (Mn), Copper (Cu), selenium (Se) and zinc (Zn) [7, 8, 9] could influence the antioxidant activity and may be altered in type 2 DM patients due to increased urinary excretion, decreased intestinal absorption capacity, and food intake [1,2].

Furthermore, patients with DM treated with insulin improve their glycemic control and could change their oxidative stress profile [10]. However, a limited number of studies demonstrated the relationship between changes in nutrient metabolism, inflammatory profile, and oxidative stress in the context of the insulin use.

We hypothesized that Mn, Zn, Se and Cu levels could interfere in glycemic control of DM2 patients through oxidative stress mechanisms and the levels of the micronutrients could variate between patients with and without insulin. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of these micronutrients on the metabolic profile of patients with DM2 with and without insulin use.

METHODS

Ethic Statement

All procedures followed in this study have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the Declaration of Helsinki. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Ribeirão Preto Medical School at the University of São Paulo, Brazil (14417313.6.0000.5440, nº 359593 in 14/08/2013). Informed consent was obtained from all individual participants.

Study population

In this open, cross-sectional, single center study we evaluated 67 volunteers of both sexes with type 2 *Diabetes Mellitus* aged between 18 and 60 years at the Diabetes Outpatient Clinic at Clinical Hospital of the Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil (HCFMRP - USP), during August 2016 to March 2017. Informed consent was obtained from all individual participants. All volunteers were stable for glycated hemoglobin in the last 3 months. Patients with retinopathy, nephropathy, severe liver disease, cancer, and thyroid dysfunction were excluded.

DM2 patients were allocated according to the medical prescription of oral antidiabetic with or without insulin use (Figure 1). They were divided into two groups: patients using only oral antidiabetic treatment, without insulin (GPWI; $n = 33$), and patients using oral antidiabetic and insulin (GPUI; $n = 34$).

Figure 1. Flowchart of inclusion and follow-up.

Sample calculation

A pilot study was carried out among DM2 patients with and without the use of insulin. In these patients, the levels of erythrocyte selenium were measured, which directly participates in GPX activity and could influence the control of insulin synthesis. The

average erythrocyte selenium for each group and the standard deviation were obtained for the sample size (n) calculation.

Adopting a significance level of 0.05 and 0.80 of test power and using the following equation [11], a total sample size of 64 patients was obtained, 32 from each group.

$$n = \frac{2\sigma^2(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

Study procedures

In the beginning, we pre-selected the participants at the Diabetes Outpatient Clinic at HCFMRP – USP and invited them to participate in the study. During this first visit, we interviewed the participants to obtain general information and measured the height and weight to calculate the body mass index (BMI). We also collected venous blood samples to perform biochemical evaluations. After that, the volunteers were instructed to perform a non-consecutive 3-day food record.

Blood samples fractionation

Immediately after collection, the blood samples was taken to the Nutrition and Metabolism Laboratory of the Department of Clinical Medicine at FMRP-USP, where all vacutainers were placed in a centrifuge and subjected to 3600 rotations per minute, for 10 minutes at 40°C. 1 mL of serum was stored in Eppendorf's tubes in a freezer at -80°C.

To obtain red blood cells, after centrifugation, all the serum present in the bottle was removed and 0.9% saline solution was added, in the same amount of serum removed. The mixture was homogenized, and it was again subjected to 3600 rotations per minute, for

10 minutes at 40 ° C. This process was repeated three times. At the end, 1mL of this material was transferred to Eppendorf's tubes that were stored in a freezer at -800°C.

Anthropometric evaluation

For the anthropometric evaluation we measured the weight and height of participants. The values of BMI were also calculated, and the classifications were according to the World Health Organization (1995) [12]. We also evaluated the body composition, using bioimpedance (Model 310e Biodynamics® Biodynamics Corp., Seattle, USA).

Food intake evaluation

The method of food registration was used to evaluate food intake. It consists of recording all the foods and drinks consumed and their respective quantities during a certain period, usually over the course of a day. The patients filled a non-consecutive 3-day food record. According to the information presented in the food records, we evaluated the energy values, macronutrients, minerals (calcium, iron, zinc, selenium and magnesium) and vitamins (A, D, C, E, B5, B6, B9 and B12) using the program DietWin® - Nutrition Software (Brazil). After that, the average consumption between these 3 days of each volunteer was calculated, obtaining a mean of food consumption through comparison with the values of EAR (Estimated Average Requirement) present in the DRIs (Dietary References Intakes).

Biochemical evaluation

Commercially available kits by Labtest (Minas Gerais, Brazil) were performed following the manufacturer protocol to evaluate metabolic state: blood count, lipid profile, albumin, urea and serum creatinine, blood glucose and serum glycated hemoglobin were analyzed

by flow cytometry methods (ref. 207), colorimetric method (ref.146), bromocresol green (ref. 19), urease / GLDH (ref. 27), Jafee reaction (ref. 35), oxidase / peroxidase (ref. 133) and immunoturbidimetry (ref. 385), respectively, at the Central Laboratory of HCFMRP.

Oxidative stress evaluation

The following oxidative stress biomarkers were evaluated using reagents from Sigma-Aldrich Chemie GmbH® (Schnelldorf, Germany) following the manufacturer protocol in the FMRP Nutrition and Metabolism laboratory: malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), total antioxidant capacity (CAOT), Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and glutathione peroxidase (GPX) [13]. Vitamin A (retinol) and vitamin E (α -tocopherol) levels were evaluated at the Nutrition Laboratory, HCFMRP, by HPLC using a Shimadzu instrument (model LC10A, Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a Shimadzu isocratic system model SPD-10AV and a UV-vis spectrophotometric detector [14].

Inflammatory profile evaluation

Commercially available kits using a type magnetic panel by MILLIPLEX® Multiplex Assays Using Luminex (Merck, Massachusetts, USA) were performed following the manufacturer protocol to evaluate inflammatory profile: interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor α (TNF- α), peptide C were measured using the HMHEMAG-34K-03 kit (Human Metabolic Hormone Magnetic Bead Panel, Merck, Massachusetts, USA). This analysis was performed at the Virology Laboratory of the Ribeirão Preto Medical School.

Micronutrients evaluation

The inductively coupled plasma spectrometry method (ICP-MS ELAN 6100 Sciex® [PerkinElmer Instruments, 71 Ribeirão Preto, SP, Brazil]) was used to measure serum and erythrocyte levels of selenium, magnesium, copper, zinc, calcium, manganese and iron at the Laboratory of Clinical, Toxicological and Bromatological Analyses of the Faculty of Pharmacy of Ribeirão Preto [15].

Statistical analysis

The statistical analysis was performed considering: 1.first all individuals with DM2; 2.second the individuals stratified in two groups according to the insulin use. Exploratory analysis of the data was first carried out to obtain an overview of the variation of those values by organizing and describing the data in tables with descriptive measures. The average, standard deviation and confidence interval (95%) were calculated. After the data distribution analysis, the Kolmogorov–Smirnov test was performed to verify equality between the groups. In the data analysis, the Student's t-test was applied to the independent variables that followed normality, whereas the Mann–Whitney test was applied to the non-parametric independent variables. The X^2 exact test was used for the categorical variables, and Spearman's correlation coefficient was applied to verify the correlations between variables. Significant differences were obtained at a 5% significance level ($p < 0.05$). Analysis was performed with the use of SPSS (version 19; SPSS, Inc., Chicago, IL) software.

RESULTS

A total of 67 volunteers participated in this study. The mean age was 52.7 years, 39 participants (58.2%) were female and 28 (41.8%) were male. Weight, height, BMI and percentage of average fat mass were 81.83 kg, 1.64 m, 30.33 kg / m² and 35.12%, respectively.

When we analyzed all 67 participants with DM2 together, we observed elevated levels of glucose (161.3 ± 63.7 mg / dL), glycated hemoglobin ($8.6 \pm 2.2\%$), and triglyceride (190.8 ± 112.3 mg / dL). Regarding the oxidative stress of the volunteers (Table 2), we observed increased levels of MDA (6.2 ± 2.11 nmol / mL) and decreased levels of serum GPX activity (26.54 ± 13.3 U / mL), indicating a higher oxidative stress. The evaluation of biomarkers, C-peptide and cytokines did not indicate an inflammatory status in these patients. The levels of minerals in serum were adequate, except for selenium (88.27 ± 21.68 µg / L), which was below than the reference values. Of the patients analyzed, 55.38%, 80% and 27.7% had an indication of serum selenium, calcium and magnesium deficiency, respectively. Considering the erythrocyte concentrations of the minerals, 50.77% had selenium deficiency, while 46.15% and 80.3% had excessive levels of zinc and manganese, respectively (Table 3). Food intake evaluation showed that patients had decreased intake of energy (1681.22 ± 509.41 kcal), fiber (24.06 ± 9.16 g), calcium (538.07 ± 284.87 mg), magnesium (267.43 ± 111.82 mg), vitamin A (515.86 ± 396.46 EU), and vitamin E (9.64 ± 5.84 mg) (Table 4).

When we stratified the patients according to insulin use, the participants in GPUI were composed mostly by women, had advanced age, and higher levels of glycemia and glycated hemoglobin than the GPWI (Table 5). Considering the oxidative stress and inflammatory profile, the GPUI had higher levels of MDA, GSSG, GPX and lower levels of FRAP and C peptide than GPWI (Table 6). The mineral evaluation in erythrocyte showed differences between GPUI and GPWI. GPUI had higher levels of zinc, manganese and iron and lower levels of copper than GPWI (Tables 7). We did not find significant differences for food intake between the groups.

Table 1: Biochemical profile of 67 patients with type 2 *Diabetes Mellitus* following at the Diabetes Outpatient Clinic at Clinical Hospital of the Ribeirão Preto, University of São Paulo.

Variables	Mean (DP)	Median	Minimun	Maximun	References
Urea (g / dL)	37.65 (16.37)	35	16	80	16-40
Creatinine (g / dL)	1.04 (0.42)	0.95	0.5	2.16	0.6-1.2
Blood glucose (g / dL)	161.3 (63.7)	140	52	387	70 – 99

Glycated hemoglobin (%)	8.6 (2.2)	8.1	5.9	15.5	<6.5%
Total cholesterol (mg / dL)	171.7 (37.57)	168	101	309	<190
LDL (mg / dL)	94.67 (31.27)	94	44	206	<130
HDL (mg / dL)	40.42 (12.26)	38	23.2	95.5	>40
Triglycerides (mg / dL)	190.8 (112.3)	159	38	632	<150
Red blood cells (10⁶/ m³)	4.66 (0.51)	4.68	3.44	6.03	4-6.5
Hematocrit (%)	40.77 (4.22)	41	32	57	36-48
V.C.M (fL)	87.7 (5.88)	88	71	104	80-100
H.C.M (pg)	29.43 (2.25)	29.6	23.3	35.4	27-33
Leukocyte (mil / mm³)	8.03 (2.64)	7.5	3.5	14.4	3.6-11
Platelets (mil / mm³)	282.23 (81.66)	267	119	522	150-400

LDL: low density lipoprotein; HDL: high density lipoprotein; V.C.M: average corpuscular volume; H.C.M: mean corpuscular hemoglobin.

Table 2: Oxidative stress and inflammatory profile of 67 patients with type 2 *Diabetes Mellitus* following at the Diabetes Outpatient Clinic at Clinical Hospital of the Ribeirão Preto, University of São Paulo.

Oxidative Stress	Mean (DP)	Median	Minimun	Maximun
Oxidant				
MDA (nmol/mL)	6.2 (2.11)	6.07	1.73	11.4
Antioxidant				
GSH (nmol/mL)	2.43 (0.66)	2.54	0.03	3.67
GSSG (nmol/mL)	28.09 (8.51)	28.17	10.76	42.68
FRAP (nmol/mL)	1.03 (0.22)	1	0.37	1.65
GPX (U/L)	26.54 (13.3)	26.98	5.97	60.04
CAOT (nmol/mL)	1.92 (0.18)	1.91	1.3	2.45
Vitamin A (mg/L)	0.74 (0.28)	0.69	0.21	1.57
Vitamin E (mg/L)	7.19 (3.08)	6.9	1.56	19.39
Inflammatory profile				
C peptide (pg/mL)	2708.47 (1689.56)	2452	2.49	7395
IL-6 (pg/mL)	4.31 (9.88)	2	2	72.94
TNF - α (pg/mL)	8.19 (13.8)	6.23	1.67	118

MDA: malondialdehyde; GSH: reduced glutathione; GSSG: oxidized glutathione; FRAP: iron reduction power; GPX: glutathione peroxidase; CAOT: total antioxidant capacity; IL-6: interleukin 6; TNF- α : tumor necrosis factor.

Table 3: Serum and erythrocytes mineral levels of 67 patients with type 2 *Diabetes Mellitus* following at the Diabetes Outpatient Clinic at Clinical Hospital of the Ribeirão Preto, University of São Paulo.

Serum levels	Mean (DP)	Median	Minimun	Maximun	References
Selenium (μg/L)	88.27 (21.68)	83.3	45.97	172.91	90-125
Zinc (μg/dL)	89.92 (12.55)	89.1	63.43	124.75	75-110
Copper (μg/dL)	134.78 (28.05)	133.4	84.13	211.46	70-155
Magnesium (mg/dL)	1.83 (0.31)	1.84	1.21	2.48	1.6-2.6
Calcium (mg/dL)	7.61 (1.18)	7.11	5.9	10.29	8.6-10.3
Iron (μg/dL)	129.67 (38.7.1)	124.09	60.06	267.98	65-175
Manganese (μg/L)	2.048 (0.64)	1.93	1.08	4.78	1.6-5.4

Erythrocytes levels					
Selenium (µg/L)	93 (26.92)	89	40	185	90-190
Zinc (µg/dL)	13 (3.4)	14	5	21	10-14
Copper (µg/dL)	74.3 (16.31)	70.5	51.4	134.9	30.5-132.2
Magnesium (mg/dL)	4.6 (9.03)	4.9	2.7	6.3	4-6.4
Manganese (µg/L)	21.5 (6.43)	21.3	6.5	37.2	4-16.5

Table 4: Food intake evaluation of 67 patients with type 2 *Diabetes Mellitus* following at the Diabetes Outpatient Clinic at Clinical Hospital of the Ribeirão Preto, University of São Paulo.

Nutrient	Mean (DP)	Median	Minimun	Maximun	References
Energy (kcal)	1681.22 (509.41)	1697.31	744.05	2836.13	2000
Carbohydrate (g)	215.1 (66.94)	207.61	92.64	362.7	225 – 325
Protein (g)	86.28 (31.9)	86.23	21.26	154.36	50 – 175
Lipid (g)	65.93 (73.32)	49.14	24.15	451.11	44 – 77.7
Fiber (g)	24.06 (9.16)	23.56	8.43	41.89	25
Calcium (mg)	538.07 (284.87)	490.37	127.56	1466.32	1000
Iron (mg)	11.68 (5.03)	11.8	2.27	22.81	6 / 8.1
Selenium (µg)	68.62 (118.1)	38.52	7.1	677.02	45
Zinc (mg)	13.76 (8.1)	13.28	1.93	31.25	6.8 / 9.44*
Copper (mg)	1.27 (0.59)	1.12	0.06	2.53	0.7
Magnesium (mg)	267.43 (111.82)	267.86	58.88	471.28	265 / 350*
Manganese (mg)	3.77 (2.24)	3.0	0.82	8.51	1.8/2.3*
Vitamin A (RE)	515.86 (396.46)	473.28	50.55	1775.38	500 / 625*
Vitamin E (mg)	9.64 (5.84)	9.7	0.23	21.14	12

* References for women / References for men

Table 5: Comparison of general characteristics and biochemical evaluation between patients with DM2 using oral antidiabetic agents as treatment (GPWI) and those using insulin hormone as treatment (GPUI).

Variable	GPWI (n= 33)				GPUI (n=34)				p
	Mean ± DP	Median	Minimun	Maximun	Mean ± DP	Median	Minimun	Maximun	
Anthropometric profile									
Age (anos)	51.3±6.45	53	36	59	54.03±5.15	55	35	59	0.03*
Height (m) ^a	1.66±0.09	1.67	1.48	1.9	1.61±0.15	1.59	1.43	1.86	0.05*
Weight (Kg) ^a	82.91±15.59	85	54	116.4	80.88±15.92	78.9	54.5	118.7	0.61
IMC (Kg/m²) ^a	29.72±4.61	29.13	22.52	41.24	30.92±5.32	30.25	20.26	47.62	0.33
Fat mass (%) ^a	35.18±5.03	33.88	26.5	43	35.09±7.98	35	21	50.3	0.97
Biochemical profile									
Urea (g / dL)	37.7±13.4	35.5	20	80	37.61±19.03	35	16	77	0.74
Creatinine (g / dL)	1±0.29	1	0.53	1.61	1.07±0.5	0.92	0.5	2.16	0.56
Blood glucose (g / dL)	140.9±35.61	130	82	210	181.2±77.87	154	52	387	0.01*
Glycated hemoglobin (%)	7.42±1.05	7.2	5.9	10.2	9.8±2.2	9.3	6.4	15.5	<0.0001***
Total cholesterol (mg / dL)	168.4±33.56	168	114	236	174.9±41.49	170	101	309	0.49
LDL (mg / dL)	93.32±29.98	90	46	183	96.07±33.02	95.5	44	206	0.66
HDL (mg / dL)	38.71±9.24	37.7	23.9	68.1	42.12±14.63	38.25	23.2	95.5	0.62
Triglycerides (mg / dL)	184.1±97.55	175	65	408	197.5±12.7	157.8	38	632	0.82
Red blood cells (10 ⁶ / m ³) ^a	4.54±0.55	4.63	3.44	5.88	4.74±0.48	4.68	3.81	6.03	0.12
Hematocrit (%)	40.39±3.69	41	32	48	40.91±4.82	42	34	57	0.7
V.C.M (fL) ^a	89.36±5.44	89	79	104	86.29±6.16	87	71	99	0.035*
H.C.M (pg)	30.07±2.3	30	23.8	35.4	28.94±2.28	29.35	23.3	32.7	0.1
Leukocyte (mil / mm ³) ^a	7.88±2.72	7.5	3.5	14.2	8.22±2.65	7.5	4.1	14.4	0.6
Platelets (mil / mm ³)	279.79±80.58	252	160	479	284.76±84.93	271	119	522	0.63

***p< 0.0001; ** p< 0,005; *p<0.05

^a Mean values for Student's t-test.

IMC: body mass index; LDL: low density lipoprotein; HDL: high density lipoprotein; V.C.M: average corpuscular volume; H.C.M: mean corpuscular hemoglobin.

Table 6: Comparison of oxidative stress and inflammation profile between patients with DM2 using oral antidiabetic agents as treatment (GPWI) and those using insulin hormone as treatment (GPUI).

Variable	GPWI (n= 33)				GPUI (n=34)				p
	Mean ± DP	Median	Minimun	Maximun	Mean ± DP	Median	Minimun	Maximun	
Oxidative stress									
Oxidant									
MDA (nmol/mL) ^a	5.11±1.74	5	1.73	9.27	7.26±1.91	7.46	3.6	11.4	<0.0001***
Antioxidant									
GSH (nmol/mL)	2.39±0.62	2.48	0.03	3.23	2.46±0.67	2.62	1.01	3.67	0.55
GSSG (nmol/mL)	25.13±7.61	25.68	10.76	38.63	30.97±8.43	32.64	14.11	42.68	0.004**
FRAP (nmol/mL) ^a	1.09±0.26	1.07	0.36	1.65	0.97±0.15	0.97	0.71	1.43	0.03*
GPX (U/mL)	19.24±13.37	15.68	5.97	52.49	33.63±8.68	32.41	15.05	60.04	<0.0001***
CAOT (nmol/mL) ^a	1.93±0.21	1.93	1.3	2.45	1.91±0.15	1.88	1.43	2.17	0.61
Vitamin A (mg/L) ^a	0.7±0.29	0.65	0.24	1.57	0.78±0.27	0.75	0.21	1.39	0.22
Vitamin E (mg/L)	6.87±2.98	6.29	1.58	18.1	7.42±3.16	7.05	1.56	19.39	0.19
Inflammatory profile									
C peptide (pg/mL) ^a	3320.51±2015.3	3266	782	7395	1776.22±1394.97	1814.5	225	5429	0.001**
IL-6 (pg/mL)	2.54±2.16	2.0	2.0	11.5	6.02±13.58	2.0	2.0	72.94	0.15
TNF - α (pg/mL)	6.17±2.4	5.41	2.9	13.13	10.15±19.26	6.67	1.67	118	0.18

***p< 0.0001; ** p< 0,005; *p<0.05

^a Mean values for Student's t-test.

MDA: malondialdehyde; GSH: reduced glutathione; GSSG: oxidized glutathione; FRAP: iron reduction power; GPX: glutathione peroxidase; CAOT: total antioxidant capacity; IL-6: interleukin 6; TNF-α: tumor necrosis factor.

Table 7: Comparison serum and erythrocytes mineral levels between patients with DM2 using oral antidiabetic agents as treatment (GPWI) and those using insulin hormone as treatment (GPUI).

Variable	Mean ± DP	GPWI (n= 33)			Mean ± DP	GPUI (n=34)			p
		Median	Minimun	Maximun		Median	Minimun	Maximun	
Serum levels									
Selenium (µg/L)	93.39±20.12	91.5	62.88	148.99	83.88±22.29	81.15	45.97	172.91	0.064
Zinc (µg/dL) ^a	90.69±12.41	89.75	75.04	117.51	89.03±12.78	89	63.42	124.75	0.53
Copper (µg/dL) ^a	130.71±27.14	150.33	107.45	175	138.25±28.73	138.54	84.63	211.46	0.28
Magnesium (mg/dL) ^a	1.81±0.35	2.18	1.69	2.4	1.85±0.29	1.78	1.32	2.48	0.65
Calcium (mg/dL)	7.63±1.24	7.11	5.9	10.06	7.6±1.14	7.08	6.09	10.29	0.96
Iron (µg/dL)	137.21±41.42	130.86	79.94	267.78	123.2±35.84	115.38	60.06	254.55	0.08
Manganese (µg/L)	1.92±0.4	2.01	1.08	2.63	2.16±0.78	1.91	1.42	4.78	0.72
Erythrocytes levels									
Selenium (µg/L)	96.96 ±29.43	93.77	55.74	185.14	88.96±24.39	87.71	40.25	139.3	0.35
Zinc (µg/dL)	11.6±3.84	11.73	4.78	18.73	14.71±2.15	14.53	11.26	20.6	0.001**
Copper (µg/dL) ^a	80.08±20.55	75.6	51.4	134.8	69.36±9.3	69.8	52.6	88.1	0.012*
Magnesium (mg/dL)	4.28±1.1	4.25	2.65	5.61	4.84±0.72	4.96	2.8	6.34	0.07
Manganese (µg/L)	19.29±7.76	19.15	6.5	35.88	23.34±4.33	23.36	16.21	38.2	0.01*
Iron (mg/L)	566.64±230.8	651.14	183.71	881.42	727.61±65.06	731.38	552.25	819.07	0.008*

9

***p< 0.0001; ** p< 0,005; *p<0.05

^a Mean values for Student's t-test.

DISCUSSION

The metabolic profile and glycemic control of DM2 patients directly influenced their clinical and biochemical outcomes [1,2]. The decrease in β cell activity may be assessed by blood glucose levels, glycated hemoglobin, and mainly C peptide synthesis. The C peptide is originating in the pro-insulin cleavage and is secreted in the portal circulation in amounts equal to insulin, thus it can be used to evaluate the endogenous secretion of this hormone [16]. C peptide may also be changed in DM2 due to glucolipotoxicity, which may cause stress in the endoplasmic reticulum of pancreatic islets, known to synthesize β cell proteins, such as proinsulin. If the homeostasis of the endoplasmic reticulum for the production of C peptide is not recovered, this may carry through the end with cells in apoptosis and worsen the glycemic profile [17]. In addition to changes in insulin hormone synthesis, inadequate glycemic control results in an increase in the innate immune system leading to inflammation [18]. Epidemiological studies showed elevated levels of cytokines such as CRP, IL-6, TNF- α , and IL-1 β in patients with DM2 with inadequate glycemic control [19]. However, in the present study considering that one of our inclusion criteria was the stability of glycemic control, we attributed the absence of differences in the inflammatory profile of patients with and without insulin use to the normal levels of glycemia. In fact, another study also found unaltered serum cytokine levels in patients with DM2 with glycemic control when compared with patients without glycemic control [20].

Type 2 DM is characterized by the impairment of the metabolic and vascular domains with multiple sources of free radicals, which start early in the disease process and worsen over time [21]. Hyperglycemia may also impair the proper functioning of β cells, increasing the intensity of non-enzymatic protein glycation reactions (AGEs), affecting the GPX activity and consequently increasing the production of reactive oxygen species (ROS) [17; 22]. Associated with these conditions, the lower activity of antioxidant enzymes in the pancreas could accentuate oxidative stress in DM disease [23]. In the present study, patients had an impairment in lipid peroxidation, evidenced by the high level of MDA (malondialdehyde) and low GPX activity. These results

corroborated with Aouacheri et al., (2015) [24] which observed an increased oxidative stress in patients with DM when compared to healthy individuals.

Hyperglycemia may increase the main source of ROS generation that occurs in the mitochondrial chain and results in the synthesis of superoxide (O_2^-), which is produced by NADPH oxidase [9]. Also, a large amount of glucose is directed to the polyol pathway, resulting in increased sorbitol and excessive consumption of NADPH, which is a cofactor to maintain GSH (glutathione) [4]. The superoxide dismutase enzyme (SOD) converts the O_2^- to H_2O_2 . Then, the H_2O_2 formed is converted into two water molecules through the alteration of reduced glutathione (GSH) to oxidized glutathione (GSSG), catalyzed by the enzyme GPX [25]. According to Steinbrenner (2013) [6], in small levels the H_2O_2 is required to increase calcium intracellular, which stimulates insulin secretion, and also to inactivate PTP-1B and PTEN, which act on the insulin receptor preventing its phosphorylation in serine, resulting in improved signaling of this hormone. At the same time, excess ROS may attenuate this signaling by activating apoptosis of protein kinase B (Akt), which acts on GLUT 4 stimulating the entry of glucose into the cell. Thus, the balance between oxidative stress and antioxidant profile is extremely important for glycemic control and insulin action [26].

The study conducted by Rehman & Akash (2017)[9] observed that patients with DM2 had decreased levels of GSH and higher levels of GSSG, which could support the idea that oxidative stress is strongly correlated with the pathogenesis of diabetes. Another study compared 3 groups of diabetic patients including patients with oral antidiabetic drugs only, patients with low insulin use, or patients with high insulin use, and found that oxidative stress activation was associated with the antidiabetic drug classes combine or not with insulin. Moreover, the dose of insulin administered also influenced in the oxidative stress, in which lower doses suggested prooxidant effects similar to the healthy population. [27]. These results corroborated with our study, in which the GPUI had greater antioxidant protection than GPWI.

It is important to highlight that the antioxidant profile is not only dependent on enzymatic agents. Micronutrients also have an important role directly or indirectly in this process [28]. Oxidative

stress may be controlled by non-enzymatic nutrients such as vitamins A, C and E and minerals, copper (Cu), zinc (Zn), manganese (Mn), selenium (Se), and iron (Fe) [25]. These nutrients could act as cofactors for antioxidant enzymes or directly as a protective factor against oxidative stress. One example is the enzyme SOD that in the cytoplasm is dependent on Zn and Cu and in mitochondria is dependent on Mn (MnSOD) [29]. MnSOD is the first antioxidant to eliminate the H_2O_2 formed in the mitochondria and protects against oxidative stress [30]. According to Li & Yang (2018) [30], treatment with Mn would increase insulin secretion and improve glucose tolerance even under stress conditions, decreasing ROS and NADPH oxidase synthesis, and thus reducing the risk of endothelial dysfunction.

Zn acts as an antioxidant because it is involved in stabilizing the membrane structure, restricting endogenous production of free radicals, and maintaining metallothioneins tissue levels, which perform the function of kidnap free radicals [31]. High Zn levels may change leptin homeostasis in the body and result in an increase in body mass index and a consequent increase in insulin resistance, while deficiency may decrease SOD and GPX activity and increase lipid peroxidation [32, 28].

Although Fe is related to the catalase enzyme, in excess it is highly pro-oxidant and the increase in its free ion may increase oxidative stress, which seems to be involved in the pathogenesis of diabetic retinopathy [33]. Both Fe and Cu are involved in the reactions of Fenton and Haber-Weiss, in which ROS are produced, however, although Cu may catalyze these reactions, Fe is biologically more capable and plays a greater role in oxidative stress [34].

Most of the erythrocyte Se is linked to GPX and acts on glycemic control [35]. Studies demonstrated that both the deficiency and the excess could increase insulin resistance. This may occur due to the involvement of three mechanisms: Se is a key component in selenoproteins involved with redox homeostasis; it acts on enzymes involved with oxidative stress and glycemic control; and it may mediate the action of insulin [36, 5].

In the present study we observed that the micronutrient profile of patients with DM2 in GPUI could be related to the better antioxidant defense, especially considering the levels of erythrocyte concentration of Zn, Mn and Fe. Therefore, there is an important role of micronutrients in the glycemic control of DM2 patients, especially considering the management of oxidative stress that could affect the insulin homeostasis and the metabolic profile.

CONCLUSION

The body composition and glycemic control of patients with type 2 Diabetes mellitus could interfere in the metabolic profile and parameters of oxidative stress. However, in the present study the use of insulin ameliorate the antioxidant defense of these patients. The pathway of antioxidants activation in patients with insulin was dependent on micronutrients, such as manganese, zinc, copper, selenium, and iron, that acts as cofactors of the antioxidant enzymes. Thus, it appears that patients using insulin have a better micronutrient profile and consequently better defense against free radicals.

In summary, the metabolic profile of the diabetic patient is influenced by glycemic control, which depends on the lifestyle associated with the pharmacological treatment, and, as we concluded in the present study, by the micronutrient profile. Together, all these factors will improve the prognosis of the disease and contribute to a better quality of life for DM2 patients.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful for the help of laboratory technicians from University of São Paulo (USP): Paula Payão Ovídio, MSc (Ribeirão Preto School of Medicine), Julia Keiko Shigetone (Ribeirão Preto School of Medicine) and Vanessa Cristina de Oliveira Souza, Ph.D (Ribeirão Preto School of Pharmaceutical Sciences).

FUNDING SOURCES

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. Funding sources had no involvement in study design, collection, analysis and interpretation of data from the present research.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare they have no financial conflict of interest.

STATEMENT OF AUTHORSHIP

LFL and AMN made the conception and design of the study. LFL and LMW did the collection and carried out the sample analyses. LFL and LMW participated in the sample analyses and revision of the manuscript. LFL did all the data analysis and interpretation with help of LMW. All authors read and approved the final manuscript.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Glycemic Targets: Standards of Medical Care in Diabetes 2019. *Diabetes Care* 2019. 42, Suppl 1:61-70. [doi: 10.2337/dc19-S006](https://doi.org/10.2337/dc19-S006).
- [2] SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2019-2020. São Paulo: Clannad; 2019. Disponível em: <https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/DIRETRIZES-COMPLETA-2019-2020.pdf>. > Acesso em 20 de março 2020.
- [3] AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Position Statement. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2009; 32: 62-67. [doi:10.2337/dc09-S062](https://doi.org/10.2337/dc09-S062)
- [4] IGHODARO, O. M. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 108: 656-662. doi: [10.1016/j.biopha.2018.09.058](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.058)
- [5] ZHOU, J.; HUANG, K.; LEI, X. G.. Selenium and diabetes—evidence from animal studies. *Free Radical Biology and Medicine* 2013, 65 1548-1556. [10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.012](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.012)

- [6] STEINBRENNER, H. Interference of selenium and selenoproteins with the insulin-regulated carbohydrate and lipid metabolism. *Free Radical Biology and Medicine* 2013, v 65: 1538-1547. doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.016](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.016)
- [7] AYDIN, A. et al. Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control. *Clinical biochemistry* 2001, 34 (1): 65-70. doi: [10.1016/s0009-9120\(00\)00199-5](https://doi.org/10.1016/s0009-9120(00)00199-5).
- [8] KORNHAUSER, C., et al. Serum selenium and glutathione peroxidase concentrations in type 2 diabetes mellitus patients. *Primary Care Diabetes*, 2008, 2 (2): 81-85. doi: [10.1016/j.pcd.2008.02.003](https://doi.org/10.1016/j.pcd.2008.02.003)
- [9] REHMAN, K.; AKASH, M. S. H. Mechanism of generation of oxidative stress and pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: how are they interlinked? *Journal of cellular biochemistry* 2017, 118 (11): 3577-3585. doi: [10.1002/jcb.26097](https://doi.org/10.1002/jcb.26097).
- [10] RADERMECKER, R. P.; RENARD, E.; SCHEEN, A. J. Circulating insulin antibodies: influence of continuous subcutaneous or intraperitoneal insulin infusion, and impact on glucose control. *Diabetes/metabolism research and reviews* 2009, 25 (6): 491-501. doi: [10.1002/dmrr.961](https://doi.org/10.1002/dmrr.961)
- [11] SINGER, J. A. A simple procedure to compute the sample size needed to compare two independent group when the population variances are unequal. *Statistics in medicine*, 2001; 20:1089-1095. doi: [10.1002/sim.722](https://doi.org/10.1002/sim.722)
- [12] World Health Organization (WHO). *Physical status: the use and interpretation of anthropometry*. Geneva: World Health Organization; 1995, 854:452 doi:[10.1017/S0021932098261359](https://doi.org/10.1017/S0021932098261359)
- [13] VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química nova* 2007, 30 (5): 1323-1338. doi: [10.1590/S0100-40422007000500046](https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000500046)
- [14] GUEGUEN, S. et al. Changes in serum retinol, alpha-tocopherol, vitamin C, carotenoids, zinc and selenium after micronutrient supplementation during alcohol rehabilitation. *J Am Coll Nutr* 2003; 22: 303–310. doi: [10.1080/07315724.2003.10719308](https://doi.org/10.1080/07315724.2003.10719308)
- [15] BATISTA, B. L. et al. Exploiting dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS) for sequential determination of trace elements in blood using a dilute-and-shoot procedure. *Anal Chim Acta* 2009, 639 (1-2): 13-18. doi:[10.1016/j.aca.2009.03.016](https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.03.016).
- [16] YIN, P. et al. C-peptide levels and the risk of diabetes and pre-diabetes among Chinese women with gestational diabetes. *Journal of diabetes and its complications* 2017, 31 (12): 1658-1662. [10.1016/j.jdiacomp.2017.08.006](https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2017.08.006)
- [17] AKASH, M. S. H.; REHMAN, K.; CHEN, S. Role of inflammatory mechanisms in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Journal of cellular biochemistry*, 2013, 114(3): 525-531. doi: [10.1002/jcb.24402](https://doi.org/10.1002/jcb.24402)

- [18] TURKMEN, K. Inflammation, Oxidative Stress, Apoptosis, and Autophagy in Diabetes Mellitus and Diabetic Kidney Disease: The Four Horsemen of the Apocalypse *Int Urol Nephrol* 2017, 49(5):837-844. doi: 10.1007/s11255-016-1488-4
- [19] LIU, C. et al. Adiponectin, TNF- α and inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Cytokine* 2016, 86: 100-109. doi: 10.1016/j.cyto.2016.06.028
- [20] GUPTA, S. et al. Analysis of inflammatory cytokine and TLR expression levels in Type 2 Diabetes with complications. *Sci Rep.* 2017; 7: 7633. doi: [10.1038/s41598-017-072308](https://doi.org/10.1038/s41598-017-072308)
- [21] PARAMASIVAN, S. et al. Serum albumin cysteine trioxidation is a potential oxidative stress biomarker of type 2 diabetes mellitus. *Scientific Reports* 2020, 10 (1):1-12. doi: 10.1038/s41598-020-62341-z
- [22] PICU, A. et al. Markers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Romanian Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Obesity. *Molecules* 2017, 22 (5):714. doi: 10.3390/molecules22050714.
- [23] SIDDIQUI et al. Association of Oxidative Stress and Inflammatory Markers With Chronic Stress in Patients With Newly Diagnosed Type 2 Diabetes. *Diabetes Metab Res Ver.* 2019, 35(5):3147. doi: 10.1002/dmrr.3147
- [24] AOUACHERI, O. et al. The investigation of the oxidative stress-related parameters in type 2 diabetes mellitus. *Canadian journal of diabetes* 2015, 39 (1): 44-49. doi: 10.1016/j.cjcd.2014.03.002
- [25] BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de nutrição* 2010, 23 (4): 629-643. doi:10.1590/S1415-52732010000400013
- [26] LOH, K. et al. Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity. *Cell Metab* 2009, 10:260–272. doi: [10.1016/j.cmet.2009.08.009](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.08.009)
- [27] MONNIER, L. et al. Insulin therapy has a complex relationship with measure of oxidative stress in type 2 diabetes: a case for further study. *Diabetes/metabolism research and reviews* 2011, 27 (4):348-353. doi.org/10.1002/dmrr.1174
- [28] ALGHOBASHY, A. A. et al. Trace elements and oxidative stress in Children with Type 1 Diabetes Mellitus. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2018, 26 (11): 85-92. doi: 10.2147/DMSO.S157348
- [29] LONGMAN, L; XIAOBO, Y. The Essential Element Manganese, Oxidative Stress, and Metabolic Diseases: Links and Interactions. *Oxid Med Cell Longev.* 2018; 2018: 7580707. doi: 10.1155/2018/7580707
- [30] LI, L.; YANG, X. The essential element manganese, oxidative stress, and metabolic diseases: links and interactions. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2018, 2018: 1-11. doi: [10.1155/2018/7580707](https://doi.org/10.1155/2018/7580707)

- [31] FUKUNAKA, A.; FUJITANI, Y. Role of Zinc Homeostasis in the Pathogenesis of Diabetes and Obesity. *Int J Mol Sci.* 2018, 19(2):476. doi: 10.3390/ijms19020476.
- [32] ZHANG, H. et al. Alterations of serum trace elements in patients with type 2 diabetes. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2017, 40:91-96. doi: 10.1016/j.jtemb.2016.12.017
- [33] FORTE, G. et al. Blood metals concentration in type 1 and type 2 diabetics. *Biological trace element research* 2013, 156 (1-3): 79-90. doi: 10.1007/s12011-013-9858-6
- [34] BARREIROS, A. L. B. S; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química nova* 2006, 29 (1): 113-123. doi:10.1590/S0100-40422006000100021
- [35] KOHLER, L. N. et al. Selenium and Type 2 Diabetes: Sistematic review. *Nutrients.* 2018 10(12):1924. doi: 10.3390/nu10121924.
- [36] WONG-OGAWA, A.N; BERRY, M.J; SEAL, L.A. Selenium and Metabolic Disorders: An Emphasis on Type 2 Diabetes Risk. *Nutrients* 2016, 8 (2): 80; doi:10.3390/nu8020080

ANEXO 3

PARECER DE CONFORMIDADE DO ORIENTADOR

<p>Universidade de São Paulo</p> <p>Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto</p> <p>Av. Bandeirantes, 3900. Cep 14049-900 - Ribeirão Preto – SP Tel.: (016) 3602-2448 - FAX: (016) 36336695</p>
---	--

PARECER

Ribeirão Preto, 11 de junho de 2020.

À Comissão Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da FMRP-USP.

Declaro que a aluna Livia Fernandes de Lima do Programa de Pós Graduação em Clínica Médica da FMRP-USP, em conformidade com o Regimento Geral da Pós-Graduação da USP e com o Regulamento do Curso de Pós-Graduação do Programa de Clínica Médica da FMRP-USP opção investigação Biomédica, após ter analisado o andamento da tese da referida aluna intitulada **“Participação do selênio, manganês, zinco e cobre no perfil metabólico e controle glicêmico de pacientes com e sem uso de insulina”**, confirmo que a mesma se encontra em condições de seguir para sua defesa.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Anderson Marliere Navarro
Divisão de Nutrição e Metabolismo
Departamento de Ciências da Saúde