UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
T 22275-F

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

**Restrição dietética de magnésio em ratos alimentados com rações hiperlipídicas:
implicações sobre o *status* de ferro e a inflamação no tecido adiposo visceral**

Versão original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP

Priscila Dryelle Sousa Teixeira

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientador:

Profa. Dra. Célia Colli

**São Paulo
2014**

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

Teixeira, Pryscila Dryelle Sousa
T266r Restrição dietética de magnésio em ratos alimentados com rações
hiperlipídicas : implicações sobre o *status* de ferro e inflamação
no tecido adiposo visceral / Pryscila Dryelle Sousa Teixeira. --
São Paulo, 2014.
65p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental.
Orientador: Colli, Célia

1. Nutrição experimental : Ciência dos alimentos 2. Ferro :
Metabolismo 3. Magnésio : Deficiência 4. Tecido adiposo
5. Inflamação I. T. II. Colli, Célia, orientador.

641.1 CDD

Pryscila Dryelle Sousa Teixeira

Restrição dietética de magnésio em ratos alimentados com rações hiperlipídicas:
implicações sobre o *status* de ferro e a inflamação no tecido adiposo visceral

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Célia Colli
orientadora/presidente

1º Examinador

2º Examinador

São Paulo, _____ de 2014.

*Aos meus pais e a Erick Sacramento que
me apoiam incondicionalmente e são
meus maiores incentivadores*

Agradecimentos

A Deus, inteligência suprema do Universo, Pai de todas as Ciências por me abençoar tanto.

Aos meus pais Edivanio Teixeira e Aparecida Teixeira, e irmãos João Gabriel e Edivanio Júnior, minha família, por serem minha base e porto-seguro, por acreditarem em mim e estarem sempre ao meu lado, por compreenderem minha ausência física e por serem tão presentes em todos os momentos... Meu amor e meus agradecimentos!

Ao meu companheiro, por me incentivar tanto, por compreender minhas necessidades, por acreditar tanto em mim, por ser um exemplo de dedicação e persistência... Erick Sacramento: te amo e agradeço por tudo!

À professora doutora Célia Colli, minha orientadora, obrigada pelo acolhimento, pela confiança, pelos ensinamentos... Obrigada, professora, por cada oportunidade!

À professora doutora Raquel Simões Mendes-Netto por ser um exemplo e me incentivar a trilhar este caminho.

Às amigas Diva Vieira e Bruna Reis por todos os desafios que enfrentamos juntas no início desta jornada.

Ao grupo do Laboratório de Minerais em Alimentos e Nutrição, e todos que passaram e fizeram parte dele, por tudo: Adriana Rodrigues, Amanda Romero, Beatriz Mastroeni, Camila Torreglosa, Carla Piola, Cristiane Sales, Eduardo Gaievski, Fabiana Lima, Jéssica Silva, Vivianne Rocha. Por me acolher, confiar no meu trabalho, me ensinar, me ouvir... Agradeço de forma carinhosa, por terem sido tão importantes desde o início: Ana Lina, por sua bondade e carinho, Alexandre Lobo por me transmitir de certa forma seu amor pela ciência e contribuir tanto para a concepção deste trabalho e Eduardo De Carli, por seu companheirismo e sua amizade!

Aos colegas de departamento com quem pude compartilhar dúvidas, alegrias e experiências: Fernanda Santana, Fernanda Shinagawa, Kaluce Almondes, Isabela Saraiva, Kática Callou, Larissa Bezerra e Graziela Biude.

Às professoras: Lílian Sá, Primavera Borelli e Rosa Pereira e aos colegas Graziela Silva, Ed Santos, Liliam Takayama e Renato Astorino pelas valiosas e indispensáveis colaborações!

Aos professores que compartilharam um pouco dos seus conhecimentos de sala de aula durante meu estágio no programa de aperfeiçoamento de ensino: Prof. Fernando Salvador Moreno, Prof. Thomas Prates Ong, Prof. Júlio Tirapegui, Profa. Sílvia Cozzolino, Prof. Marcos Minicucci, Dr. Alexandre Lobo e Profa. Célia Colli, responsável pela disciplina

Aos professores Eliane Beraldi Ribeiro, José Donato Júnior e Fernando Salvador Moreno pelas importantes contribuições durante meu exame de qualificação.

Aos técnicos Ivanir Pires, Alexandre Pimentel e Rosângela Pavan pela presteza em todos os momentos que precisamos.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas que contribuíram nos mais diversos aspectos: Cleonice Estrela, Edilson Feitosa, Mônica Perussi, Mirian Lopes, Jorge de Lima e Roberta Uehara.

Aos funcionários do Biotério de Experimentação Animal do Conjunto das Químicas, pelo cuidado com os nossos animais e pelos conhecimentos compartilhados, Flávia Ong e Renata Fontes.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, por me proporcionar trilhar este caminho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo auxílio à pesquisa (Edital Universal) e pela bolsa de mestrado concedidos.

Muito obrigada!

RESUMO

TEIXEIRA, P.D.S. **Restrição dietética de magnésio em ratos alimentados com rações hiperlipídicas: implicações sobre o *status* de ferro e a inflamação no tecido adiposo visceral.** 2014. 65 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A deficiência dietética de magnésio (Mg), muitas vezes observada na população, em obesos, é condição que pode contribuir para a inflamação que, por sua vez, influencia o metabolismo do ferro. Com essa perspectiva, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da deficiência de magnésio no processo inflamatório do tecido adiposo de ratos alimentados com rações hiperlipídicas e a repercussão desses efeitos na homeostase de ferro (Fe). Dois ensaios, com duração de 8 semanas, foram conduzidos, com ratos *Wistar*, machos, com peso inicial entre 180 e 200 g. No primeiro ensaio (Ensaio 1), os animais consumiram *ad libitum* rações normolipídicas com diferentes concentrações de Mg (500, 300 e 150 mg de Mg/kg; 100, 60 e 30% das recomendações para roedores, respectivamente). No segundo ensaio (Ensaio 2), os animais foram distribuídos em 3 grupos, que receberam, *ad libitum*, rações controle (normolipídica, 7% de lipídios; 16% do valor calórico total – VCT) e hiperlipídicas (32% de lipídios, uma mistura de óleo de soja e banha suína; 60% do VCT), sendo estas últimas adequadas ou restritas em Mg (500 e 150 mg de Mg/kg). A restrição dietética de Mg resultou em alterações tanto na composição corporal (diminuição da gordura e aumento da massa magra) como na distribuição compartimental de Mg (diminuição da excreção urinária), sem alterar o *status* em Fe, estes efeitos foram mais exacerbados nos animais do grupo Mg-150 (Ensaio 1). Quando associada à dieta hiperlipídica (Ensaio 2), a restrição dietética de Mg levou à redução em sua excreção urinária e fecal. Aumento do percentual de gordura corporal, hipertrofia do adipócito e alteração histopatológica indicativa de processo inflamatório no tecido adiposo visceral, além de menores concentrações de Fe no baço e menor saturação da transferrina, foram observados nos animais alimentados com as rações hiperlipídicas, independentemente da concentração dietética de Mg. Entretanto, nos animais que receberam ração hiperlipídica e restrita em Mg foi observado aumento da fragilidade osmótica do eritrócito, sugerindo maior atividade eritropoética, apesar de a contagem de eritrócitos e reticulócitos não se alterar. É possível que a associação entre sobrecarga lipídica e restrição dietética de Mg resulte em aumento da demanda de Fe para eritropoese, antes de ocorrerem modificações nos parâmetros hematológicos.

Palavras-chave: Ferro, Deficiência de Magnésio, Tecido Adiposo, Inflamação

ABSTRACT

TEIXEIRA, P.D.S. **Dietary Magnesium Restriction in rats fed high-fat diets: implications for iron *status* and inflammation in visceral adipose tissue.** 2014. 65 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The dietary deficiency of magnesium (Mg) often observed in obese is a condition that can contribute to the inflammatory process which, in turn, is a factor which influences the metabolism of iron. Thus, this study aimed to assess the effect of magnesium deficiency on the inflammatory process of adipose tissue of rats fed high-fat diets and the impact of such effects on the homeostasis of iron (Fe). Two experiments with duration 8 weeks, were conducted with male Wistar rats, initial weight between 180-200 g. In the first test (Test 1), the animals consumed ad libitum normolipidic diets with different concentrations of Mg (500, 300, and 150 mg Mg / kg; 100, 60 and 30% of recommendations for rodents, respectively). In the second test (Test 2), the animals were divided into 3 groups, which received ad libitum control diets (normolipidic, 7% fat, 16% of the total caloric value - VCT) and hyperlipidemic (32% lipids, one mixture of soybean oil and lard, 60% of TAC), the latter being suitable or limited for mg (500 mg and 150 mg / kg). The dietary restriction of Mg resulted in changes in body composition (decreased fat and increased lean mass) and compartmental distribution of Mg (decreased urine output), without changing the status of Fe, these effects were exacerbated in group mg-150 (test 1). When combined with high-fat diet (trial 2), dietary restriction of Mg led to reduction in urinary and fecal excretion. Increase the percentage of body fat, adipocyte hypertrophy and histopathological changes indicative of inflammation in visceral adipose tissue, and lower concentrations of Fe in the spleen and lower transferrin saturation were observed in animals fed hyperlipidemic diets, independent of dietary concentration Mg. However, the animals fed high fat and restricted diet in Mg had increased osmotic fragility of erythrocytes, suggesting greater erythropoietic activity, despite the number of erythrocytes and reticulocytes have not changed. It is possible that the association between lipid overload and dietary restriction of Mg result in increased demand for Fe for erythropoiesis occurred before changes in hematological parameters.

Keywords: Iron, Magnesium Deficiency, Adipose Tissue, Inflammation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Homeostase de magnésio. Adaptada de Barbagallo, Belvedere e Dominguez (2009).	23
Figura 2.	Delineamento experimental dos Ensaio 1 e 2. Os animais passaram por período de 7 dias de adaptação às condições ambientais do ensaio, foram eutanasiados após 60 dias. Nos 52º e 53º dias foi feita avaliação da composição corporal por DXA.....	31
Figura 3.	Procedimento para histomorfometria no tecido adiposo branco. (A) Imagem original do tecido adiposo. (B) Imagem segmentada. (C) Luminosidade e contraste editados. (D) Seleção dos adipócitos a serem analisados. Barra, 100 µm.	37
Figura 4.	Evolução do peso de animais que receberam rações normolipídicas adequada (Mg500) e deficientes em Mg (Mg300 e Mg150) durante 60 dias de ensaio	40
Figura 5.	Composição corporal de ratos alimentados com rações controle (500 mg de Mg/Kg) e com restrição de Mg (300 mg/Kg e 150 mg/Kg) após 60 dias. Em (A) percentual de massa magra. Em (B) Densidade Mineral Óssea (DMO) (g/cm ³). Em (C) gordura corporal. Em (D) correlação da densidade mineral óssea, percentual de massa magra e percentual de gordura corporal com o consumo de Mg (mg/dia) após 60 dias de ensaio. Em (E) imagem gerada pelo DXA, ilustrando o redução de gordura na região abdominal de dois animais com restrição dietética de Mg, um animal do grupo Mg ₃₀₀ e outro do grupo Mg ₁₅₀ em relação a um controle (grupo Mg ₅₀₀), após 60 dias. Resultados expressos como média ± DP (n = 7-10). Valores considerados significativamente diferentes quando p < 0,05. As diferenças entre as médias dos grupos foram avaliadas por Kruskal-Wallis, seguido do post-hoc de Dunns.	41
Figura 6.	Evolução do consumo de ração e peso de animais que receberam rações controle (CON e PF) e hiperlipídicas adequada (HF) ou restrita em Mg (HF[Mg-]) durante 60 dias de ensaio experimental.	44

- Figura 7.** Composição corporal de ratos alimentados com rações controle (CON e PF) e hiperlipídicas adequada ou restrita em Mg (HF e HF[Mg-]) após 60 dias de experimento. Em (A) massa magra (g), em (B) Densidade Mineral Óssea (DMO) (g/cm²), em (C) gordura corporal (g). Em (D) imagem gerada pelo DXA, ilustrando aumento de gordura corporal na região abdominal dos animais dos grupos que receberam ração hiperlipídica. Resultados expressos em mediana (P25-P75) (n=4, 5, 7, 7). Valores considerados significativamente diferentes quando $p < 0.05$. A comparação entre os grupos foi feita usando o teste estatístico não-paramétrico Kruskal-Wallis, seguido de post-hoc de Dunns. 44
- Figura 8.** Parâmetros histomorfométricos e aspecto histológico do tecido adiposo branco retroperitoneal de ratos que receberam rações controle (CON) e hiperlipídicas adequada (HF) ou restrita em Mg (HF-). Em (A) observa-se a comparação do número de adipócitos por campo microscópico de 900 μ^2 ; em (B) o diâmetro de Feret e em (C) a área do adipócito. Estas medidas foram obtidas por ferramenta do *software* Image J, a contagem de células foi feita manualmente. Resultados expressos como mediana (P25-P75). O teste estatístico utilizado foi Kruskal-Wallis, seguido do post-hoc de Dunns. De D-F: Fotomicrografia do tecido adiposo retroperitoneal. Observar tamanho e número de adipócitos no campo de 20x. D. Grupo CON; B. Grupo HF; C. Grupo HF[Mg-]. HE, barra= 100 μ m. 45
- Figura 9.** Fotomicrografia do tecido adiposo retroperitoneal dos animais do grupo HF. (A) Foco de esteatite discreta com predomínio de macrófagos; (B) Em destaque, adipócito com citoplasma multivacuolizado. HE, barra= 25 μ m. 47
- Figura 10.** Concentração de citocinas inflamatória (TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10) no extrato proteico do tecido adiposo branco retroperitoneal corrigido pela concentração de proteína total. Resultados expressos como mediana (P25-P75). O teste estatístico utilizado foi Kruskal-Wallis, seguido do post-hoc de Dunns. 47
- Figura 11.** Parâmetros hematológicos e do *status* em Fe de ratos alimentados com ração controle (CON e PF) e rações hiperlipídicas adequada (HF: com 500mg de Mg/Kg) ou restrita (HF[Mg-]: com 150 mg de Mg/Kg) em Mg após 60 49

dias. De A-D concentração de Fe nos diferentes compartimentos corporais; em (E) Capacidade Total de Ligação com Fe; em (F) Percentual de saturação de transferrina medida pela relação do Fe sérico com a CTLFe; em (G) hepcidina sérica medida por ELISA; em (H) expressão hepática do gene que codifica para hepcidina avaliado por qRT-PCR; em (I) Fragilidade osmótica do Eritrócito; em (J) Expressão Proteica de Ferroportina na Mucosa do Duodeno por Western-Blott. Resultados expressos como mediana (P25-P75). O teste estatístico utilizado foi Kruskal-Wallis, seguido do post-hoc de Dunns.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Formulação de rações experimentais	29
Tabela 2.	Composição química das rações experimentais utilizadas no <i>Ensaio 2</i>	39
Tabela 3.	Peso inicial e final, ganho de peso e consumo de ração de ratos alimentados com rações controle (500 mg de Mg/Kg) e com restrição de Mg (300 mg/Kg e 150 mg/Kg) por 60 dias de experimento	39
Tabela 4.	Concentração de magnésio em plasma, eritrócito, tibia e urina de ratos alimentados com rações controle (500 mg de Mg/Kg) e restritas em Mg (300 mg/Kg e 150 mg/Kg) após 60 dias de experimento	41
Tabela 5.	<i>Status</i> de Ferro e Parâmetros Hematológicos de ratos alimentados com rações controle (500 mg de Mg/Kg) e com restrição de Mg (300 mg/Kg e 150 mg/Kg) por 60 dias.....	42
Tabela 6.	Consumo de ração de ratos alimentados com rações controle (500 mg de Mg/Kg), hiperlipídica sem restrição e com restrição de Mg (150 mg de Mg/Kg)	43
Tabela 7.	Concentração de magnésio em plasma, eritrócito, tibia e urina de animais ratos alimentados com ração normolipídica e hiperlipídicas adequada (HF com 500 mg de Mg/Kg) ou restrita em Mg (HF[Mg ⁻] com 150 mg de Mg/Kg) após 60 dias de experimento	48
Tabela 8.	Frações de lipídios séricos de ratos alimentados com rações controle (CON e PF) e hiperlipídicas adequada ou restrita em Mg (150 mg/Kg) após 60 dias de experimento	50
Tabela 9.	Parâmetros hematológicos de ratos alimentados com rações controle (CON e PF) e hiperlipídicas adequada (500 mg/Kg) ou restritas em Mg (150 mg/Kg) após 60 dias de experimento.	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIN	<i>American Institute of Nutrition</i> (Instituto Americano de Nutrição)
BMTC	Bone Marrow Total Cells (Células totais da medulla óssea)
CCR2	<i>CC-Chemokine receptor 2</i> (Receptor de Quimiocinas-CC 2)
cDNA	<i>Complementar Desoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico Complementar)
CEP	Coeficiente de Eficiência Proteica
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CON	Grupo Controle
Dcytb	<i>Duodenal Cytochrome b</i> (Citocromo b Duodenal)
DMO	Densidade Mineral Óssea
DMT-1	<i>Divalent Metal Transporter 1</i> (Transportador de Metal Divalente 1)
DXA	<i>Dual X Ray Absorptiometry</i> (Raios-x de Dupla Energia)
EAA	Espectrofotometria de Absorção Atômica
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> (Ensaio Imunoenzimático)
Fpn	Ferroportina
HAMP	Hepcidina
HE	Hematoxilina Eosina
HF	Grupo Hiperlipídico
HF[Mg]	Grupo Hiperlipídico com restrição dietética de Magnésio
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
LCAT	Lecitina Colesterol Aciltransferase
LIP	<i>Pool</i> de Ferro Lábil
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinases</i> (Proteína quinase ativada por mitógenos)
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i> (Proteína Quimiotática de Monócitos-1)
Mg₁₅₀	Grupo Normolipídico com Restrição Dietética de 70% de Magnésio
Mg₃₀₀	Grupo Normolipídico com Restrição Dietética de 40% de Magnésio
Mg₅₀₀	Grupo Normolipídico Controle
NFκB	<i>Nuclear Factor kappa B</i> (Fator de Transcrição Nuclear kappa B)

PBS	Tampão Fosfato Salino
PBS-T	Tampão Fosfato Salino com Tween
PF	Grupo <i>Pair Feeding</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative Reverse Transcriptase Real-Time Polymerase Chain Reaction</i> (Reação Quantitativa de Transcriptase Reversa em Tempo Real)
SDS-Page	Dodecil-Sulfato de Sódio de Poliacrilamida
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> (Transdutores de Sinais e Ativadores de Transcrição-3)
TA	Tecido Adiposo
TAB	Tecido Adiposo Branco
TAM	Tecido Adiposo Marrom
TfR	Receptor de Transferrina
TIBC	<i>Total iron-binding capacity</i> (Capacidade Total de Ligação com o Fe)
TLR-4	<i>Toll Like Receptor</i> (Receptor do tipo <i>Toll-4</i>)
TNF-R	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i> (Receptor do Fator de Necrose Tumoral)
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> (Fator de Necrose Tumoral- α)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 TECIDO ADIPOSEO: MODIFICAÇÕES NO EXCESSO DE PESO	20
2.2 MAGNÉSIO: ALTERAÇÕES DA HOMEOSTASE E IMPLICAÇÕES NO PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	22
2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE HOMEOSTASE DE FERRO NA INFLAMAÇÃO	25
2.4 INFLUÊNCIA DA DEFICIÊNCIA DE MAGNÉSIO NA HOMEOSTASE DE FERRO	26
3 OBJETIVOS	28
3.1 GERAL.....	28
3.2 ESPECÍFICOS	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 ENSAIOS BIOLÓGICOS	29
4.1.1 Animais.....	29
4.1.2 Formulação das rações experimentais	29
4.1.3 Avaliação da composição química das rações	30
4.1.4 Delineamento Experimental.....	31
4.1.5 Status de magnésio.....	33
4.1.6 Parâmetros hematológicos	33
4.1.7 Concentração de ferro no sangue, nos tecidos e nas fezes	33
4.1.8 Análise de Hormônios.....	34
4.1.9 Composição corporal	34
4.1.10 Avaliações nos tecidos: mucosa do duodeno e fígado	34
4.1.11 Avaliações no Tecido Adiposo Branco	36
4.1.12 Análise estatística	38
5 RESULTADOS	39
5.1 ENSAIO 1.....	39
5.2 ENSAIO 2.....	43
5.2.1 Alterações observadas no Tecido Adiposo	45
5.2.2 Status em Mg	48
5.2.3 Status em Fe e Parâmetros Hematológicos.....	49
5.2.4 Hormônios	50
5.2.5 Perfil Lipídico	51

6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXOS	64

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera o sobrepeso e obesidade a quinta causa de risco de morte no mundo (WHO, 2008). Estudo recente mostra que a prevalência da obesidade aumentou substancialmente entre 1980 e 2013. Há atualmente, 2,1 bilhões de pessoas obesas ou com sobrepeso (quase 30% da população mundial) (NG *et al.*, 2014). O Brasil está acima da média global de obesidade. Dados do Vigitel¹ indicam que o excesso de peso acomete 54,7% dos homens e 47,4% das mulheres (sendo 16,5% de homens e 18,2% de mulheres obesas) no país (BRASIL, 2012; NG *et al.*, 2014).

O tecido adiposo do obeso é caracterizado pela hipertrofia e hiperplasia do adipócito, alterações responsáveis pela expansão do tecido, sendo que a hipertrofia é anterior à hiperplasia e acontece para atender à necessidade de armazenamento de gordura adicional da dieta (FAUST *et al.*, 1978; JO *et al.*, 2009). Estas alterações são seguidas pelo aumento da angiogênese, pela infiltração de células do sistema imunológico, pela produção elevada de matriz extracelular e pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias durante a progressão da inflamação crônica (OUCHI *et al.*, 2011; SUGANAMI e OGAWA, 2010). A expansão do tecido adiposo em indivíduos obesos, principalmente o visceral, também está associada a um quadro inflamatório crônico subclínico (HAGITA *et al.*, 2011; KARALIS, 2009). Estudos recentes indicam que a inflamação, sistêmica e no tecido adiposo, pode resultar em alterações na distribuição tecidual de Fe, em diferentes magnitudes (ORR *et al.*, 2014; SONNWEBER, 2012; SANAD, OSMAN e GHARIB, 2011).

A hepcidina hormônio regulador da homeostase de Fe tem sua produção influenciada pelo *status* de Fe e pela inflamação. A compreensão do papel fisiológico deste hormônio tem contribuído para o entendimento da relação entre o aumento da adiposidade e as alterações na homeostase de Fe observadas em indivíduos obesos e com sobrepeso (BEKRI *et al.*, 2006; McCLUNG & KARL, 2009).

Sabe-se que um padrão alimentar caracterizado pelo consumo elevado de lipídios (com predomínio de lipídios saturados) e de carboidratos simples, associado ao consumo reduzido de fibras alimentares, de compostos bioativos e de micronutrientes, pode levar, fundamentalmente, a alterações no peso corporal (BES-RASTROLLO, 2008). Nesse aspecto, estudos sugerem que o sobrepeso e a

¹ Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

obesidade também sejam decorrentes de inadequações alimentares em longo prazo, não apenas associadas ao excesso, mas também às deficiências nutricionais (ALBEIRT et al., 2005; MOIZÉ et al., 2011).

Estudos que avaliam o consumo alimentar de populações mostraram ainda, que indivíduos com excesso de peso apresentam baixo consumo de Magnésio (Mg). (CAHIL et al., 2013; JARVANDI et al., 2011; MOIZÉ et al., 2011). Neste contexto, alterações no *status* de Mg, como resultado da inadequação dietética do mineral, vêm sendo associadas com alteração de indicadores de estresse oxidativo e de inflamação (SONG et al., 2005; CORICA et al., 2006; CHACKO et al., 2011). Trabalhos realizados em nosso laboratório observaram alta probabilidade de inadequação na ingestão de magnésio no diabético e no estado fisiológico da gestação (SALES et al., 2011; ROCHA et al., 2012). Em estudos experimentais, dieta pobre em magnésio levou a secreção ineficiente de insulina, alterações na sua sinalização, inflamação aguda em ratos, bem como possível alteração na homeostase de Fe (MAZUR et al., 2007; SALES et al., 2013; DE CARLI et al., 2014).

Considerando que a expansão do tecido adiposo e o consumo insuficiente de Mg são fatores que podem levar a uma condição inflamatória, e que o ferro, por sua vez, tem sua homeostase regulada pela hepcidina, nossa hipótese é de que o consumo excessivo de lipídios associado à deficiência dietética de Mg resulta em um quadro inflamatório no tecido adiposo e em alterações na homeostase de Fe.

O presente trabalho, vinculado a outro em desenvolvimento no laboratório de Minerais em Alimentos e Nutrição (FAPESP, processo No. 2012/16284-5) se propôs investigar a inflamação no tecido adiposo visceral e o *status* de ferro de ratos que receberam rações hiperlipídicas e deficientes em Mg.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TECIDO ADIPOSEO: MODIFICAÇÕES NO EXCESSO DE PESO

Dois tipos de tecido adiposo são encontrados nos mamíferos: o branco (TAB) e o marrom (TAM). Eles diferem, principalmente, na forma de armazenamento de triacilglicerol (TAG) no adipócito e na presença de mitocôndrias. No TAM há maior número de mitocôndrias e alta concentração de citocromo oxidase nestas organelas, condição que confere a coloração mais escurecida do tecido. O TAB tem distribuição mais abrangente e é o tecido adiposo predominante em adultos, além disso, sabe-se que é este tipo que apresenta importante papel endócrino em decorrência da vasta gama de proteínas produzidas e secretas por ele (CANNON & NEDERGAARDE, 2004; E.B., 2014).

O aumento de peso pode levar a alterações na composição celular do tecido adiposo. Há anos já se observa que o consumo de dietas hiperlipídicas pode levar a rápida expansão em decorrência de ingestão calórica excessiva, e influenciar a celularidade do tecido adiposo (GEALEKMAN et al., 2014; FAUST, 1978; HALBERG et al., 2009).

Esta expansão do tecido adiposo pode transcorrer de duas formas, uma considerada expansão saudável e outra patológica. No primeiro tipo há hipertrofia do adipócito, aumento do recrutamento de células precursoras que em proporções adequadas, proporcionam boa vascularização subsequente. Esta vascularização adequada é condição ideal para minimizar a hipóxia, considerada como um dos eventos mais importantes associados à disfunção do tecido adiposo (HALBERG et al., 2009).

Por sua vez, a disfunção do tecido adiposo é decorrente da expansão patológica. Este tipo de alteração é caracterizado pela infiltração de células inflamatórias, especialmente macrófagos, bem como vascularização inapropriada e fibrose. Células inflamatórias estão presentes em maior número no tecido adiposo de indivíduos obesos que no de indivíduos magros, o que não significa que este tecido tenha disfunção e presença de inflamação em todos os indivíduos obesos. A diferença na expansão deste tecido pode explicar o fato de alguns indivíduos obesos

não apresentarem estado inflamatório, como esperado (GEALEKMAN et al., 2014; OUCHI et al., 2011).

Estes indivíduos são considerados obesos metabolicamente saudáveis e apresentam baixo risco cardiometabólico, com sensibilidade à insulina preservada, *status* inflamatório reduzido e perfil lipídico adequado. Primeau et al. (2011) sugere que a diferença do perfil metabólico de obesos aconteça, também, pelo local de deposição de gordura, considerando que a gordura visceral oferece maior risco metabólico do que a periférica (GUENTHER et al., 2014), peso do indivíduo ao nascer; tamanho do adipócito; e diferenciação celular no tecido adiposo.

Como já mencionado que o tecido adiposo é capaz de produzir e secretar muitas proteínas, conhecidas como adipocinas, as quais diferem quanto ao efeito biológico que pode ser pró (fator de necrose tumoral- α [TNF- α], Interleucina [IL]-6, resistina, são exemplos) ou anti-inflamatório (leptina e adiponectina). A expressão destas adipocinas pode variar a depender do sítio de depósito do tecido adiposo (GUENTHER et al., 2014; HALBERG, 2008).

O tecido adiposo é composto de vários tipos de células, incluindo pré-adipócitos, células endoteliais, fibroblastos e células imunes. Tanto as células do sistema imune inato quanto as do sistema imune adaptativo estão presentes no tecido adiposo. Macrófagos e monócitos são parte do sistema imune inato e representam larga proporção da fração celular da porção estroma-vascular do tecido adiposo e parecem ser a principal fonte de mediadores inflamatórios, como o TNF- α (OLEFSKY & GLASS, 2010; SELL & ECKEL, 2010).

Na obesidade observa-se interação entre células parenquimatosas e do estroma em resposta ao estresse tecidual ou ao mau funcionamento do tecido. A interação entre estas células permite o aumento da expressão de quimiocinas no tecido adiposo do obeso o que implica no controle do recrutamento de monócitos. Há evidências de que a via *monocyte chemoattractant protein-1/CC Chemokine receptor 2* (MCP-1/CCR2) tem um papel patofisiológico importante na infiltração de macrófagos no tecido adiposo obeso (DIVOUX et al., 2012; SUGANAMI, TANAKA e OGAWA, 2012).

Embora os macrófagos tenham sido os primeiros entre as células imunes a serem estudados, o envolvimento de outros tipos celulares tem sido observado. Resultados encontrados por Divoux et al. (2012), demonstraram correlação entre a presença de mastócitos e os componentes que alteram as características do TAB na

obesidade, sugerindo que estas células podem contribuir para o acúmulo de outras células imunes.

O acúmulo de células imunes no tecido adiposo é proporcional à adiposidade tanto em humanos quanto em ratos, a perda constante de peso resulta na redução no número de macrófagos no tecido adiposo fato que é acompanhado pela redução do perfil pró-inflamatório de indivíduos obesos (OUCHI et al., 2011).

O recrutamento e a infiltração de macrófagos levam à inflamação local (importante no desencadeamento da resistência periférica à insulina), que está associada com a produção de mediadores inflamatórios (adipocinas, como resistina, MCP-1 e outras citocinas, como TNF- α , IL-1 β , IL-6, dentre outras), espécies reativas de oxigênio e alterações nas concentrações sanguíneas de glicose, ácidos graxos e minerais (SHOELSON et al., 2007; AIGNER et al., 2008). Por sua vez, estes mediadores inflamatórios poderão exercer efeitos parácrinos e endócrinos, contribuindo para a resposta inflamatória em outros tecidos, como por exemplo, fígado, músculo e intestino.

Dentre os mecanismos moleculares envolvidos no desencadeamento da resposta inflamatória induzida pela obesidade, merece destaque a via de sinalização do fator de transcrição nuclear (NF)- κ B. A ativação deste fator de transcrição pode ser mediada por fatores endógenos (citocinas, espécies reativas de oxigênio, ácidos graxos) e exógenos (lipopolissacarídeo [LPS] bacteriano), e envolve a participação de receptores como, por exemplo, o receptor para o TNF- α (TNF-R) e o receptor do tipo Toll (TLR)-4 (CAI et al., 2005; SONG et al., 2006).

Desse modo, o aumento do consumo de ácidos graxos saturados pode favorecer a ativação de vias inflamatórias no tecido adiposo e em outros tecidos, condição que, associada ao consumo de dietas hipercalóricas, pode levar ao aumento do risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis.

2.2 MAGNÉSIO: ALTERAÇÕES DA HOMEOSTASE E IMPLICAÇÕES NO PROCESSO INFLAMATÓRIO

O magnésio (Mg) é o segundo cátion intracelular em maior concentração no organismo e participa de diversas reações enzimáticas, em particular, aquelas relacionadas com a síntese de DNA e de proteínas, bem como com a transferência, o armazenamento e o transporte de energia (RUDE, 1989; ALEXANDER et al., 2008; SHAH et al., 2014). Cerca de 60% do Mg no organismo encontra-se nos

tecidos mineralizados, enquanto os 40% restantes estão distribuídos entre músculo esquelético e outros tecidos, como coração e fígado, dos quais somente 2-3% não estão complexados (Figura 1); essa fração, no entanto, é fundamental para a regulação de diversas funções celulares (RUDE & GRUBER, 2004; ALEXANDER et al., 2008).

Figura 1. Homeostase de magnésio. Adaptada de Barbagallo, Belvedere e Dominguez (2009).

A concentração sérica normal de Mg é mantida numa faixa estreita de 0,75-0,96 mmol/L, que é regulada pelo balanço entre sua absorção intestinal, excreção, reabsorção urinárias e retenção e mobilização ósseas (ARNAUD, 2008). Clinicamente, a hipomagnesemia é caracterizada por concentrações séricas abaixo de 0,5 mmol/L, condição que é acompanhada, em situações de função renal normal, por redução rápida e progressiva na sua excreção pelos rins (BELIN & HE, 2007). Situações de redução na ingestão de Mg também levam à redução da excreção renal, sem necessariamente ocorrer alteração nas suas concentrações sanguíneas (BELIN & HE, 2007; ALEXANDER et al., 2008; ARNAUD, 2008).

A deficiência de Mg pode ser classificada em primária e secundária. A primeira está relacionada com baixa ingestão, redução na absorção intestinal (por

exemplo, pelo aumento na ingestão de inibidores da absorção), aumento na excreção urinária (reduzida reabsorção tubular), alteração na deposição/mobilização ósseas, hiperadrenocorticismismo e/ou resistência à insulina (BELIN & HE, 2007). Situações crônicas em decorrência deste tipo de deficiência estão relacionadas com complicações associadas com a síndrome metabólica (por exemplo aterosclerose, hipertensão e resistência à insulina) (HE et al., 2006).

Por outro lado, a deficiência secundária pode ser decorrente de condições patológicas como diabetes mellitus do tipo 2 ou doenças que prejudiquem a absorção intestinal (como a doença inflamatória intestinal e a doença celíaca) ou, ainda decorrentes de determinadas terapias medicamentosas como, por exemplo, utilização de diuréticos depletos de Mg e inibidores da bomba de prótons (AYUK & GITTOES, 2014; BELIN & HE, 2007). Nesse contexto, estudo recente demonstrou que indivíduos portadores de diabetes mellitus do tipo 2 apresentam alterações no *status* de Mg que são associadas ao controle glicêmico inadequado (SALES et al., 2011).

Estudos clínicos e epidemiológicos também têm demonstrado que a alteração na homeostase de Mg, como resultado da baixa ingestão do mineral, está associada ao aumento nas concentrações sanguíneas de proteína C reativa, um indicador de inflamação (DIBABA et al., 2014; SONG et al., 2005; CORICA et al., 2006). Esta associação é ainda maior naqueles indivíduos com idade superior a 40 anos, com índice de massa corporal maior do que 25 e que consomem menos do que 50% da RDA para o mineral (RODRIGUEZ-MORAN et al., 2004; SONG et al., 2005).

A alteração mais significativa em animais deficientes em Mg, é a leucocitose, pelo aumento do número de neutrófilos e eosinófilos (MAZUR et al., 2007). Em situações de restrição mais acentuada (10% das recomendações de magnésio dietético para roedores adultos e em crescimento), observa-se aumento na produção/ativação de neuromediadores (por exemplo, acetilcolina, catecolaminas, substância P), condição que acompanha as alterações na contagem de leucócitos e de outros mediadores inflamatórios, e que é associada ao aumento das concentrações intracelulares de cálcio (MAZUR et al., 2007).

O Mg é antagonista do Ca, pois competem por sítios de ligação de receptores. Esta condição faz com que concentrações adequadas de Mg sejam essenciais para compensar os efeitos produzidos pelo influxo celular de Ca, que são a ativação de vias inflamatórias, como *via* P38 MAPK e NF κ B, resultando em

aumento das concentrações de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 (CHANDRASEKARAN, 2014; MARGOLIS & GERSHON, 2009).

É importante considerar ainda que o magnésio, além de estar relacionado com inflamação, também apresenta importante papel no metabolismo de lipídios, uma vez que as enzimas lecitina colesterol aciltransferase (LCAT) e lipase de lipoproteína (LPL) estão relacionadas a este mineral para exercerem sua função (TAN, 1978; BELIN, HE, 2007). Além disso, baixas concentrações dietéticas de Mg foram associada à maior síntese e liberação de ceramidas, via ativação de p53 em células cardíacas, o que caracteriza o início de um estado de lipotoxicidade, condição que também é induzida pelo consumo de dieta rica em lipídios (SHAH et al., 2014; BADIN et al., 2013).

2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE HOMEOSTASE DE FERRO NA INFLAMAÇÃO

O *status* de Fe do organismo é influenciado, basicamente, pela eficiência da sua absorção no intestino e pela eritropoiese, evento caracterizado por etapas que conduzirão à formação do eritrócito. A absorção intestinal de Fe ocorre em toda a extensão do intestino, embora seja mais eficiente no duodeno e no jejuno superior (FRAZER et al., 2007). No meio intracelular, o Fe pode se complexar aos compostos de baixo peso molecular como citrato, ADP, ATP, se ligar a proteínas ou ser armazenado no interior da ferritina – uma cápsula proteica formada por 24 subunidades de baixo (cadeias L; 19 KDa) e alto pesos moleculares (cadeias H; 21 KDa) capaz de armazenar até 4.500 átomos de Fe. No sangue, o Fe é transportado pela transferrina e captado pelas células em seus tecidos-alvo por meio da ligação específica da transferrina com seu receptor (TfR), localizado na membrana plasmática (HENTZ, 2010).

A quantidade de Fe transferido para a circulação é, em princípio, influenciada por suas reservas no organismo. Dessa forma, quando os estoques de Fe encontram-se reduzidos ou quando existe aumento na eritropoiese, a sua absorção intestinal é aumentada, basicamente, como consequência de alterações na expressão da proteína citocromo b duodenal (Dcytb), divalent metal transporter (DMT-1) e ferroportina nos enterócitos. Por outro lado, em situações de sobrecarga de Fe e inflamação ocorre aumento da síntese da hepcidina, um hormônio produzido predominantemente pelo fígado, que bloqueia a saída de Fe das células para a circulação, fundamentalmente impedindo sua absorção intestinal e sua reciclagem a

partir de macrófagos do baço e do sistema reticuloendotelial (NEMETH & GANZ, 2006). O Fe sérico é modulado, portanto, pela ação da hepcidina que, por sua vez, afeta indiretamente o *pool* de Fe lábil (LIP, labile iron pool) intracelular (KRUSZEWSKI, 2003; OATES, 2007). Na inflamação, a expressão da hepcidina envolve a ativação da Signal Transducer and Activators of Transcription-3 (STAT), que é estimulada em resposta à ação de citocinas (principalmente IL-6) (PIETRANGELO et al., 2007).

Em estados pró-inflamatórios, a ativação de macrófagos resulta em alterações celulares, morfológicas e funcionais, que intensificam a resistência do hospedeiro à infecção. O aumento na produção de citocinas afeta a atividade biossintética do hepatócito, resultando em alterações associadas à resposta de fase aguda (WEISBERG et al., 2003; SHOELSON et al., 2007).

A produção da hepcidina, nesses casos, ocorre como estratégia de defesa do organismo (de reduzir a disponibilidade de Fe para agentes patogênicos) (THEURL et al., 2009; WEISS, 2009). Assim, como resultado, esse quadro é acompanhado por diminuída liberação de Fe pelas células, que se reflete em aumento da síntese intracelular de ferritina, em depósitos de hemossiderina, em hipoferremia e em alterações hematológicas que são frequentemente observadas em situações de anemia de doença crônica ou anemia da inflamação (WEISS, 2009).

2.4 INFLUÊNCIA DA DEFICIÊNCIA DE MAGNÉSIO NA HOMEOSTASE DE FERRO

Há muito se observou que a deficiência de Mg resulta no aumento da concentração de Fe nos tecidos, aparecendo, em paralelo, aumento de hemólise (SCHUMANN et al., 1996; KIM et al., 2011). Schumann e col. (1996) sugeriram uma redistribuição de Fe proveniente de eritrócitos hemolisados, reconhecendo que há três possíveis vias para o acúmulo de Fe no organismo em condição de deficiência de Mg: redução da excreção de Fe, aumento da absorção intestinal ou alteração na distribuição do Fe corporal.

Sanchez-Morito e colaboradores (2000) observaram, em condições de grande restrição de Mg, aumento da absorção intestinal de Fe, seguido de diminuição da contagem de células vermelhas no sangue e da concentração deste mineral nos tecidos.

Uma vez que a deficiência de Mg contribui para o aumento da inflamação acredita-se no aumento da expressão de hepcidina, hormônio regulatório do *status*

em Fe, que tem sua expressão aumentada em condições inflamatórias. Porém Ishizaki e colaboradores (2011), não observaram alteração na expressão de hepcidina hepática em ratos que receberam rações deficientes em Mg, mesmo havendo acúmulo de Fe no fígado.

De acordo com estes achados, estudo recente mostrou que ratos alimentados com rações hiperlipídicas e deficientes em Mg menores concentrações de Fe no baço e inalterada expressão de ferroportina, sugerindo que a influência da deficiência dietética deste mineral no *status* em Fe pode ser decorrente da distribuição no organismo (DE CARLI, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar os efeitos da restrição dietética de Mg no *status* de Fe e no tecido adiposo de ratos alimentados com rações hiperlipídicas.

3.2 ESPECÍFICOS

- Determinar as concentrações de Fe no soro, no fígado, no baço e nas fezes.
- Mensurar as concentrações de Mg no plasma, no eritrócito, na urina, no músculo e no osso.
- Verificar as alterações morfológicas, histopatológicas e inflamatórias no tecido adiposo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FCF/USP (Protocolo CEUA nº 371).

4.1 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.1.1 Animais

Ratos (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*) machos, da linhagem *Wistar Hannover*, com peso corporal inicial entre 180 e 200g, heterogênicos, provenientes do Biotério de Produção e Experimentação da FCF e do Instituto de Química da USP, foram mantidos em gaiolas semimetabólicas individuais, de aço inoxidável, em ambiente com temperatura e umidade controladas (22°C; 55%, respectivamente), e ciclos de claro/escuro de 12 h (período claro, 23-11h).

4.1.2 Formulação das rações experimentais

Rações experimentais, semipurificadas e peletizadas, adquiridas por importação pela empresa *Harlan Teklad Laboratories* (Madison, WI, EUA), foram acondicionadas na câmara fria (~4°C) da FCF/USP, até o momento da sua utilização. A formulação das rações seguiu as recomendações do *American Institute of Nutrition* (REEVES *et al.*, 1993) (Tabela 1).

Para o Ensaio 1, a ração do grupo Mg₅₀₀ foi elaborada de forma que atendesse 100% das recomendações de Mg (500 mg/Kg de ração). As rações dos grupos Mg₃₀₀ e Mg₁₅₀ atendem, respectivamente, 60% e 30% das recomendações de Mg para roedores (300 mg/Kg e 150 mg/Kg de ração).

Para o Ensaio 2, a ração dos grupos CON e PF foi elaborada com 7% de lipídios (como óleo de soja; 16% do valor calórico total [VCT] proveniente dos lipídios) e as dos grupos HF e HF[Mg⁻] com 32% de lipídios (uma mistura de óleo de soja e banha suína; cerca de 60% do VCT provenientes dos lipídios). A quantidade adicional de lipídios nas rações hiperlipídicas foi descontada do total de amido da formulação. A mistura mineral, das rações do grupo HF[Mg⁻] (grupo com restrição de Mg), foi formulada de modo a conter 30% da recomendação de Mg (como MgO) para

roedores (150 mg/Kg de ração) e 35 mg de Fe/Kg de ração (como FeSO_4) (REEVES *et al.*, 1993).

Tabela 1. Formulação das rações experimentais.

Ingredientes (%)	CONTROLE e PF	HF	HF[Mg]
Caseína	20,0	20,0	20,0
Fibra (celulose)	5,0	5,0	5,0
L-cistina	0,3	0,3	0,3
Bitartarato de colina ³	0,25	0,25	0,25
Mistura vitamínica ⁴	1,0	1,0	1,0
Mistura salina ⁵	3,5	3,5	3,5
Sacarose	10,0	10,0	10,0
Amido de milho	52,95	27,95	27,95
Lipídios			
Óleo de soja	7,0	7,0	7,0
Gordura suína	-	25,0	25,0
TBHQ, antioxidante ⁶	0,0014	0,0014	0,0014

CONTROLE e PF: 16 % do VCT provenientes dos lipídeos; HF e HF[Mg]: 60% do VCT provenientes dos lipídeos;

¹ Com base nas recomendações da AIN-93 (REEVES *et al.*, 1993), com modificações;

² 85% de proteína (N $\times$ 6,25);

³ 41,1% de colina;

⁴ AIN-93G-VX (REEVES *et al.*, 1993);

⁵ Modificada a partir da formulação AIN-93G-MX (REEVES *et al.*, 1993): a concentração de Mg, da mistura mineral da ração dos grupos G3 será 60% da recomendação para o mineral (507 e 150 mg Mg/kg para as rações dos grupos CON, PF, HF e HF[Mg], respectivamente);

⁶ TBHQ, Terc Butil Hidroquinona

4.1.3 Avaliação da composição química das rações

Foi determinada a composição química das rações: umidade, lipídios, cinzas (BRASIL, 2005) e proteínas (AOAC, 2006). As concentrações de Fe e de Mg foram determinadas por espectrofotometria de absorção atômica (EAA) (AAnalyst 100, Perkin Elmer, Norwalk, CT, EUA), empregando-se lâmpadas de cátodo oco e fenda, respectivamente de 248,3 e 0,2 para o Fe e 202,6 nm e 1,3 nm para o Mg. Após digestão por via úmida (HNO_3 : H_2O_2 , 5:1; v/v), e diluição com HNO_3 a 1% (v/v), na presença de 0,1% (p/v) de lantânio (como La_2O_3) para análises de Mg (AOAC, 2006).

A qualidade das análises foi monitorada pelo controle das leituras de padrões primários (*Bovine Liver* e *Bone Ash*, National Institute of Standards & Technology, MD, EUA). Toda a vidraria usada para análise dos minerais foi previamente desmineralizada. Curvas-padrão foram preparadas pela diluição dos padrões de Fe (FeCl_3) e de Mg (MgCl_2) em 15% de HCl (*Titrisol*, Merck, Darmstadt, Alemanha).

4.1.4 Delineamento Experimental

Foram conduzidos dois ensaios biológicos:

4.1.4.1 Ensaio 1

O delineamento experimental do Ensaio 1 está apresentado na Figura 2. Os animais, após sete dias de adaptação às condições ambientais do ensaio, foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais. As rações foram formuladas de acordo com as recomendações da AIN (REEVES et al., 1993), com diferentes concentrações de sulfato de magnésio (MgSO_3) na mistura mineral (500, 300 e 150 mg Mg/Kg de ração; grupos Mg_{500} , Mg_{300} e Mg_{150} , respectivamente). Ração e água desmineralizada foram oferecidas *ad libitum*. O consumo de ração foi registrado diariamente e o peso corporal a cada dois dias. O coeficiente de eficiência proteica (CEP) foi calculado pela razão ganho de peso (g) e consumo de proteína (g).

Figura 2. Delineamento experimental dos Ensaio 1 e 2. Os animais passaram por período de 7 dias de adaptação às condições ambientais do ensaio, foram eutanasiados após 60 dias. Nos 52º e 53º dias de ensaio foi feita avaliação da composição corporal por DXA.

Os animais foram eutanasiados, por exsanguinação, após anestesia por injeção intraperitoneal com solução de anestésicos contendo xilazina (10 mg/kg; Virbaxil 2%, Virbac, São Paulo, Brasil e quetamina (25 mg/kg; Vetaset, Fort Dodge, Iowa, EUA) (LOBO *et al.*, 2009). Amostras de sangue, obtidas da veia porta, foram coletadas para análise do hemograma, do *status* de Fe e Mg, insulina, leptina e do perfil lipídico (Labtest Diagnóstica S/A, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). Fígado, baço e tíbias foram removidos, pesados e acondicionados a -20°C ou -80°C para posteriores análises.

Durante 3 dias nos períodos anteriores ao t 15, t 30 e t60, os animais foram transferidos para gaioleiro metabólico para coleta de fezes e urina. Foram determinados Mg e Fe nas fezes e Mg na urina.

4.1.4.2 Ensaio 2

O delineamento experimental do *Ensaio 2* está apresentado na Figura 2. Os animais passaram por período de sete dias de adaptação às condições ambientais do ensaio e foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (grupos CON, PF, HF e HF[Mg²⁺]). Ração e água (desmineralizada) foram oferecidas *ad libitum*. O consumo de ração foi registrado diariamente e o peso corporal a cada dois dias. A oferta da ração do grupo PF (*pair-feeding*) foi pareada à média do consumo dos animais alimentados com as rações hiperlipídicas, considerando que não foram observadas diferenças no consumo entre os grupos HF e HF[Mg²⁺].

Os animais foram submetidos à eutanásia seguindo o mesmo protocolo do *Ensaio 1*. As amostras de sangue foram coletadas para análise do hemograma, do *status* de Fe e Mg, das concentrações de insulina, leptina e de adiponectina e do perfil lipídico (Labtest Diagnóstica S/A, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). Fígado, tecidos adiposos retroperitoneal e periepídimal, baço, mucosa do duodeno e tíbias foram coletados, pesados e acondicionados para posteriores análises.

Nos períodos anteriores aos tempos 15, 30 e 60, os animais foram transferidos, por um dia, para gaioleiro metabólico para coleta de fezes e urina (urina

de 24h) e por mais dois dias fezes foram coletadas no gaioleiro semimetabólico. Foram analisados Fe e Mg, nas fezes, e Mg na urina de 24h.

4.1.5 Status de magnésio

Amostras de sangue com citrato de sódio a 30% (p/v) foram separadas para análises de Mg no plasma e nos eritrócitos, obtidos após lavagem e lise da papa de hemácias provenientes da centrifugação do sague total. As concentrações de Mg no sangue, na urina, nas fezes e no fêmur foram determinadas por EAA, nas mesmas condições descritas para a análise das rações. As análises nos eritrócitos foram realizadas após diluição das amostras com solução de glicerol (5%).

4.1.6 Parâmetros hematológicos

Amostras de sangue foram obtidas com anticoagulante EDTA 10% (1 mg/mL) para contagem total, diferencial de células e hemograma (hematócrito, hemoglobina [DRABKIN & AUSTIN, 1935] e contagem de eritrócitos e leucócitos totais) (DACIES & LEWIS, 1995). O número total de células, a concentração de Hb e o hematócrito foram obtidos no hemocítômetro ABX Micros ABC Vet (Horiba; Montpellier, França). Os reticulócitos foram quantificados, em extensão sanguínea, pela coloração supravital com Novo Azul de Metileno (BRECHER, 1949). Células da medula óssea foram obtidas por lavagem da cavidade medular com meio *McCoy's* 5A (Sigma) e também quantificadas em hemocítômetro. Para avaliação da fragilidade osmótica, o sangue foi coletado com heparina sódica, e medida pelo grau de hemólise dos eritrócitos em solução salina hipotônica (O'DELL et al., 1987).

4.1.7 Concentração de ferro no sangue, nos tecidos e nas fezes

Amostras de sangue, sem anticoagulante, foram coletadas para análises da concentração de Fe sérico e da capacidade total de ligação com o Fe (TIBC) (Labtest Diagnóstica S/A, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). A saturação da transferrina foi calculada a partir dos resultados de Fe sérico e TIBC. A concentração de Fe foi determinada no fígado, no baço e nas fezes por EAA, conforme descrito para a análise das rações experimentais.

4.1.8 Análise de Hormônios

Foram feitas as determinação de insulina, leptina, adiponectina e hepcidina no soro por ELISA, usando os Kits: Insulin ELISA Kit (Millipore, Missouri, EUA), Mouse/Rat Leptin Immunoassay (Quantikine, R&D Systems Ltd, Minneápolis, EUA), Adiponectin ELISA Kit (Millipore, Missouri, EUA) e Rat Hpcidin (Hepc) Elisa Kit (NOVATEINBIO, Massachusetts, EUA).

4.1.9 Composição corporal

A composição corporal foi avaliada, cerca de 8 dias antes de cada eutanásia (Figura 2), por radioabsorciometria de dupla energia (DXA) Densitômetro Hologic QDR-4500 (Discovery-A SN, Bedford, MA, USA), no modo de alta resolução e analisada no *Small Animal Body Composition software* (Hologic QDR Software for Windows XP, version 12.3), para animais de pequeno porte. Os animais foram anestesiados e posicionados na mesa do equipamento para escaneamento. Os dados foram obtidos como massa adiposa (g), massa magra (g), conteúdo mineral ósseo (BMC, em g de hydroxiapatita) e densidade (BMD, in g/cm²).

4.1.10 Avaliações nos tecidos: mucosa do duodeno e fígado

4.1.10.1 Extração de proteínas totais

Para o preparo de extratos proteicos totais, fragmentos congelados de mucosa do duodeno e do tecido adiposo epididimal foram homogeneizados em reagente de extração T-PER (Pierce Technology, EUA) contendo coquetel de inibidores de proteases Halt (Pierce Technology, EUA) e fosfatases (NaF 100 mM, Na₃VO₄ 10 mM, Na₄P₂O₇ 10mM). Debris teciduais foram removidos por centrifugação a 10.000 g por 5 min e a concentração de proteínas totais nos sobrenadantes foi determinada por ensaio BCA (Pierce Technology, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

4.1.10.2 Western Blotting

Cerca de 50 µg de proteínas totais, obtidas da sua extração em raspados da mucosa do duodeno, foram separados por SDS-PAGE, utilizando *EZ-Run 12,5% Gel Solution* (Fisher Scintific, EUA), e transferidos para membranas de nitrocelulose (GE

Healthcare, Reino Unido). O bloqueio das membranas foi feito com tampão *Blocker Casein* (Pierce Technology, EUA) e, após três ciclos de lavagens de 10 min com tampão PBS-T (0,1% Tween 20/PBS), as membranas foram incubadas por 14 h a 4°C com anticorpo primário policlonal de coelho específico para ferroportina (1:1000, Abcam Antibodies, Reino Unido), diluído no mesmo tampão de bloqueio. O anticorpo secundário conjugado a peroxidase (1:50,000, Sigma Aldrich, EUA) reagiu por aproximadamente 2h em temperatura ambiente e, em seguida à lavagem das membranas, os complexos antígeno-anticorpo foram identificados por quimioluminescência, utilizando o kit de detecção *Amersham ECL Select* (GE Healthcare, Reino Unido) em equipamento fotodocumentador *Alliance 4.7* (Uvitec Cambrige, Reino Unido). Logo após a captação das bandas de sinal referentes à ferroportina, todas as membranas foram novamente lavadas e re incubadas com anticorpo monoclonal de camundongo específico para beta-actina (1:50.000, Sigma Aldrich) nas mesmas condições do primeiro anticorpo. As imagens das bandas referentes à beta-actina foram utilizadas como controle do carregamento de proteínas no gel. A análise densitométrica das bandas visualizadas foi conduzida no *software Alliance 2.7* (Uvitec, Reino Unido), sendo os sinais da ferroportina normalizados com os do controle (100%). Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de unidades arbitrárias.

4.1.10.3 Extração de RNA total

O RNA total do fígado foi extraído utilizando o kit RNeasy mini kit (Qiagen, Alemanha) em todas as extrações foi adicionado à coluna DNase I, livre de RNase (Thermo Scientific, EUA) para maior pureza do RNA extraído. O material obtido foi quantificado por espectrofotometria, utilizando o espectrofotômetro NanoDrop modelo ND-2000 (NanoDropTechnologies, Wilmington, Delaware, EUA) e aliqotado para concentração final de 1 μ g de RNA/ μ L. O grau de pureza do RNA foi determinado pela relação A_{260nm}/A_{280nm} (SAMBROOK, 2001). A integridade do RNA total extraído foi avaliada em gel de agarose 1% corado com 0,5 μ g/ μ L de brometo de etídio.

4.1.10.4 qRT-PCR

A expressão do gene *Hamp*, no fígado, foi avaliada por reação de transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia de polimerase em tempo real (qRT-PCR).

A transcrição reversa foi feita com o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando hexâmeros randômicos para a síntese do cDNA. A amplificação por qRT-PCR em tempo real e a aquisição dos dados foi realizada com o termociclador *StepOne™ PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As reações foram feitas em 20 µL utilizando 10 µL do Taqman Universal PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 100 ng de cDNA como molde e 1 µL da mistura 20 X de iniciadores e sondas Taqman para os genes alvo (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os dados de expressão foram adquiridos em triplicata para cada extração de RNA e estes valores serão usados nos cálculos para determinação da expressão relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.1.11 Avaliações no Tecido Adiposo Branco

4.1.11.1 Avaliação histológica

Fragmentos do tecido adiposo periepídimal e retroperitoneal foram coletados e fixados em solução tamponada de formalina a 10% (v/v). Após fixação mínima de 24h, os fragmentos foram processados, segundo técnica padrão, e incluídos em parafina. Os blocos de parafina foram seccionados em cortes de 15µm. O exame histológico das lâminas foi realizado em microscopia de luz, utilizando microscópio óptico (Zeiss, modelo Primo Star, Thornwood, EUA). As imagens digitais foram adquiridas com microscópio Eclipse Ni-U (Nikon, Japão) acoplado à câmara digital refrigerada DS-U3 (Nikon, Japão) e *software* NIS-elements para captura de imagens. Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Gastroenterologia Experimental e Comparada, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Os cortes histológicos das regiões epididimal e retroperitoneal foram analisados quanto à presença de processo inflamatório, à intensidade deste processo e o tipo celular predominante envolvido; também quanto à presença de estruturas *crown-like*, adipócitos multivacuolizados e alterações circulatórias. A

intensidade das alterações histopatológicas foi avaliada semiquantitativamente na escala de 0 a 3, onde: 0 = parâmetro tido como dentro da normalidade, 1 = alterações mínimas, 2 = alterações em grau moderado e 3 = alterações em grau marcante.

Os cortes também foram avaliados do ponto de morfoistológico quanto a celularidade, à densidade de estruturas *crown-like*, à área da superfície e ao volume do adipócito. O número de células do tecido adiposo foi a partir da contagem de adipócitos em 10 campos microscópicos no aumento de 40x. O tamanho do adipócito (volume e área) foi medido usando o recurso de contagem do software Image J, após decalque das células e remoção do fundo, conforme Figura 3.

Figura 3. Procedimento para histomorfometria no tecido adiposo branco. (A) Imagem original do tecido adiposo. (B) Imagem segmentada. (C) Luminosidade e contraste editados. (D) Seleção dos adipócitos a serem analisados. Barra, 100 μm .

4.1.11.2 Avaliação de parâmetros inflamatórios

As concentrações de IL-6, IL-1 β e TNF- α foram determinadas por ELISA, em extratos proteicos totais obtidos do tecido adiposo periepídídimo e retroperitoneal (Quantikine, R&D Systems Ltd, Minneápolis, EUA) (PIMENTEL et al., 2012)

4.1.12 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o programa GraphPad InStat (GraphPad Software, versão 2.0). Os dados são apresentados como mediana (Percentil 25 - Percentil 75). A normalidade dos dados foi testada usando o teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Levene. As medianas das variáveis dos grupos foram comparadas com o teste Kruskal-Wallis. Quando as análises apresentaram $p < 0,05$, o pós-teste de Dunn foi realizado para comparação das medianas entre os grupos, adotando-se intervalo de confiança de 95%. A correlação entre os parâmetros foi avaliada pelo teste de correlação de Spearman.

5 RESULTADOS

5.1 ENSAIO 1

No primeiro ensaio experimental (*Ensaio 1*), foram oferecidas rações experimentais, com a mesma composição de macronutrientes (carboidratos, lipídios e proteínas), porém com diferentes concentrações de Mg. Esta ração foi oferecida para ratos jovens (peso inicial ~200g) por 60 dias (8 semanas). Esta formulação das rações permitiu desenvolver um experimento para avaliar o efeito isolado de deficiência dietética de Mg. As composições das rações são detalhadas na Tabela 2.

Tabela 2. Composição química das rações experimentais utilizadas no *Ensaio 1* (n=3).

Nutrientes	500 mg Mg ¹	300 mg Mg ²	150 mg Mg ³
Proteína (g/100 g)	18,9 ± 0,9	17,8 ± 0,3	16,51 ± 0,7
Lipídios (g/100 g)	6,3 ± 0,1	6,4 ± 0,1	6,6 ± 0,1
Umidade (g/100 g)	13,6 ± 0,1	13,3 ± 0,1	11,5 ± 0,1
Cinzas (g/100 g)	2,2 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,2 ± 0,1
Cálcio (μg/g)	6729 ± 203,6	6617 ± 86,1	6444 ± 2,3
Magnésio (μg/g)	469,7 ± 9,3 ^a	299,1 ± 11,0 ^{a,b}	183,5 ± 4,8 ^b
Ferro (μg/g)	49,3 ± 1,2	47,5 ± 1,8	53,5 ± 0,2
Zinco (μg/g)	38,8 ± 1,2	37,7 ± 1,0	41,9 ± 0,6
Cobre (μg/g)	6,1 ± 0,0	5,1 ± 0,5	6,5 ± 0,8

Resultados expressos como média ± DP

¹ Ração oferecida para o grupo Mg₅₀₀ (TD.110294)

² Ração oferecida para o grupo Mg₃₀₀ (TD.110296)

³ Ração oferecida para o grupo Mg₁₅₀ (TD.110296)

Os resultados seguintes correspondem aos dados obtidos após 60 dias (8 semanas de experimento) de ensaio experimental com a oferta destas rações para os três diferentes grupos. Na Tabela 3 e na Figura 4, são apresentados os resultados de consumo e peso corporal.

Tabela 3. Consumo de ração de ratos alimentados com rações controle (500 mg de Mg/Kg) e com restrição de Mg (300 mg/Kg e 150 mg/Kg) por 60 dias de experimento.

Dados	Grupos Experimentais			p
	Mg ₅₀₀ (n=10)	Mg ₃₀₀ (n=7)	Mg ₁₅₀ (n=7)	
Consumo de ração (g)	24,99 (23,39-25,69)	23,95 (23,05-25,18)	23,24 (21,97-25,19)	0,255
Consumo de proteína (g)	4,72 ^a (4,42-4,86)	4,26 ^b (4,10-4,48)	4,56 ^{a,b} (4,31-4,87)	0,034
CEP* (g/g) ¹	44,38 (43,28-45,43) ^{a,b}	48,85 (44,97-50,02) ^a	40,12 (38,75-40,90) ^b	0,002
Consumo de Mg (mg)	11,74 (10,99-12,07) ^a	7,16 (6,89-7,53) ^b	4,27 (4,03-4,62) ^c	<0,001
Consumo de Fe (mg)	12,32 (11,53-12,66) ^a	11,38 (10,95-11,96) ^a	13,60 (12,85-14,73) ^b	<0,001

Resultados expressos como mediana (P25-P75). O teste estatístico utilizado foi Kruskal-Wallis, seguida do post-hoc de Dunns.

* Coeficiente de Eficiência Proteica

Figura 4. Evolução do peso de animais que receberam rações normolipídicas adequada (Mg₅₀₀) e deficientes em Mg (Mg₃₀₀ e Mg₁₅₀) durante 60 dias de ensaio experimental.

Mesmo o consumo de proteína pelo grupo controle tendo sido maior do que o do grupo Mg₃₀₀, ao se avaliar o coeficiente de eficiência proteica, nota-se que não há diferença no aproveitamento deste nutriente nestes grupos. Ao mesmo tempo nota-se que o grupo com deficiência de Mg tem um menor CEP. Apesar de não ter sido observada diferença no conteúdo de Fe das rações, o grupo com maior restrição dietética de Mg teve maior consumo de Fe.

Na Figura 5 são apresentados os resultados de composição corporal. Observou-se uma correlação fraca e positiva entre consumo de magnésio e gordura corporal, demonstrando tendência para menor percentual de gordura corporal nos animais que tiveram o consumo de Mg restrito.

Figura 5. Composição corporal de ratos alimentados com rações controle (500 mg de Mg/Kg) e com restrição de Mg (Mg₃₀₀ e Mg₁₅₀, 300 mg de Mg/Kg e 150 mg de Mg/Kg de ração) por 60 dias. Em (A) percentual de massa magra. Em (B) Densidade Mineral Óssea (DMO) (g/cm³). Em (C) gordura corporal. Em (D) correlação da densidade mineral óssea, percentual de massa magra e percentual de gordura corporal com o consumo de Mg (mg/dia) após 60 dias de ensaio. Em (E) imagem gerada pelo DXA, ilustrando o redução de gordura na região abdominal de dois animais com restrição dietética de Mg, um animal do grupo Mg₃₀₀ e outro do grupo Mg₁₅₀ em relação a um controle (grupo Mg₅₀₀), após 60 dias. Resultados expressos como média $\pm$ DP (n = 7-10). Valores considerados significativamente diferentes quando $P < 0,05$. As diferenças entre as médias dos grupos foram avaliadas por ANOVA one-way, seguido de pós-teste de Tukey.

Na Tabela 4 são apresentados os dados de *status* de magnésio após 60 dias de experimento.

Tabela 4. Concentração de magnésio em plasma, eritrócito, tíbia e urina de animais alimentados com rações controle (500 mg de Mg/Kg) e restritas em Mg (300 mg/Kg e 150 mg/Kg) após 60 dias de experimento.

	Grupos Experimentais			p
	Mg ₅₀₀	Mg ₃₀₀	Mg ₁₅₀	
Plasma (mg/dL)	1,68 (1,61-2,02) (n=6)	1,82 (1,63-1,92) (n=4)	1,70 (0,15-1,92) (n=3)	0,814
Eritrócito (mg/dL)	3,60 (2,87-4,50) (n=5)	3,43 (2,82-5,16) (n=4)	2,87 (2,82-2,92) (n=3)	0,429
Tíbia (mg/g)	2,51(2,46-2,69) (n=10)	2,55 (2,37-2,64) (n=7)	2,39 (2,26-2,48) (n=7)	0,150
Urina	4,29	2,97	0,67	0,027

(µg/mL)	(2,90-7,58) ^b (n=6)	(2,13-5,14) ^{a,b} (n=7)	(0,02-2,76) ^a (n=9)
---------	-----------------------------------	-------------------------------------	-----------------------------------

Resultados expressos como mediana (P25-P75). O teste estatístico utilizado foi Kruskal-Wallis, seguida do post-hoc de Dunns.

A restrição dietética de Mg levou a menor excreção urinária de Mg e esse feito foi maior no grupo de maior restrição (Tabela 4). Na Tabela 5 são apresentados os dados de *status* de ferro; nota-se que há maior excreção fecal de Fe pelo grupo Mg₁₅₀, provavelmente como consequência do maior consumo deste mineral observado neste grupo. Não foram observadas diferenças nos parâmetros hematológicos (Tabela 5). Não houve diferenças entre os grupos no número de leucócitos, plaquetas e células totais da medula óssea (dados não apresentados).

Tabela 5. Concentração de Ferro em fígado, baço e fezes e parâmetros hematológicos de ratos alimentados com rações controle (500 mg de Mg/Kg) e com restrição de Mg (300 mg/Kg e 150 mg/Kg) por 60 dias.

	Grupos Experimentais			p
	Mg ₅₀₀ (n=10)	Mg ₃₀₀ (n=7)	Mg ₁₅₀ (n=6)	
Fígado (µg/g)	187,1 (143,7-201,0)	151,1 (139,3-161,6)	134,9 (121,9-164,5)	0,111
Baço (µg/g)	1178,0 (1009,0-1254,0)	1097,0 (958,8-1243,0)	1205,0 (845,7-1289,0)	0,734
Fezes (µg/g)	466,9 (458,1-509,3) ^a	489,9 (478,6-522,0) ^{a,b}	555,6 (539,6-577,5) ^b	0,003
Hemoglobina (g/dL)	14,62 (14,13-15,76)	15,10 (13,85-15,65)	14,58 (14,16-15,66)	0,923
Hematócrito (%)	45,03 (43,61-47,40)	45,65 (42,55-47,95)	45,48 (43,30-47,81)	0,890
VCM (fL)	55,00 (54,00-55,25)	54,50 (54,00-56,00)	55,00 (53,75-55,13)	0,927
HCM (pg)	18,00 (17,35-18,51)	17,75 (17,40-19,05)	17,93 (17,36-18,21)	0,970
CHCM (g/dL)	32,56 (32,41-32,90)	32,90 (32,30-33,15)	32,55 (32,20-33,11)	0,781
RBC (x10 ⁶ /µL)	8,19 (7,82-8,14)	8,34 (7,93-8,83)	8,41 (7,80-8,78)	0,964
Reticulócitos (%)	10,75 (8,41-11,50)	9,70 (8,25-12,05)	9,45 (7,65-10,15)	0,192
Fragilidade Osmótica ^a (%)	0,44 (0,41-0,46)	0,47 (0,36-0,48)	0,45 (0,42-0,52)	0,421

Resultados expressos como mediana (P25-P75). O teste estatístico utilizado foi Kruskal-Wallis, seguido do post-hoc de Dunns.

^a Concentração de NaCl em que ocorre hemólise em 50% dos eritrócitos

5.2 ENSAIO 2

No Ensaio 2, os animais receberam rações hiperlipídicas, com restrição dietética de Mg (30% da recomendação) por 60 dias. Estudos já haviam demonstrado que nesse tipo de delineamento experimental com roedores, utilizando rações hiperlipídicas, ocorre redução da ingestão dietética. Foi necessário, portanto, incluir um grupo controle *pair-feeding*, condição que permitiu maior homogeneidade no consumo de proteínas e de minerais entre os grupos, mantendo-se somente a variação na concentração de Mg.

Os dados de consumo e peso corporal são apresentados na Tabela 6 e na Figura 6. Após o 9º dia de experimento os grupos controle e hiperlipídicos apresentaram diferença no consumo de ração (g): por isso, o grupo controle foi subdividido, para se criar um grupo pareado, de modo que o consumo de minerais entre os grupos pudesse ser comparado. Ao final do experimento foi observado maior ganho de peso dos animais dos grupos hiperlipídicos quando comparados ao grupo PF e menor consumo de Fe pelos grupos HF em relação ao controle. Quanto ao consumo de Mg, como já esperado, o grupo HF[Mg] teve menor ingestão, já o consumo do grupo HF foi semelhante ao do PF.

Tabela 6. Consumo de ração de ratos alimentados com rações controle (500 mg de Mg/Kg), hiperlipídica sem restrição e com restrição de Mg (150 mg de Mg/Kg) por 60 dias.

Dados	Grupos Experimentais				p
	CON (n=5)	PF (n=5)	HF (n=7)	HF[Mg] (n=7)	
Peso Inicial (g)	249,3 (230,9- 253,7)	264,1 (253,2- 279,2)	250,1 (230,4- 267,2)	246,2 (227,5- 266,7)	0,314
Peso final (g)	420,5 (394,1- 447,3) ^{a,b}	399,2 (375,4- 307,9) ^a	448,9 (418,6- 464,9) ^b	448,0 (408,4- 501,7) ^b	0,032
Ganho de peso (g)	171,2 (160,6- 196,3) ^{a,b}	128,5 (114,1- 140,2) ^b	197,4 (147,6- 238,0) ^a	208,4 (176,8- 234,8) ^a	0,005
Consumo de ração (g)	24,08 (22,62-24,14)	20,75 (20,72-20,89)	21,42 (19,09-23,13)	21,40 (19,20-23,51)	0,059
Consumo de Mg (mg)	12,54 (11,78- 13,61) ^a	10,80 (10,79- 10,88) ^b	11,49 (10,27- 12,40) ^b	4,57 (4,09-5,01) ^c	0,001
Consumo de Fe (mg)	1,19 (1,12-1,29) ^a	1,02 (1,02- 1,03) ^{a,b}	0,93 (0,83-1,00) ^b	0,94 (0,84-1,03) ^b	0,007

Resultados expressos como mediana (P25-P75). O teste estatístico utilizado foi Kruskal-Wallis, seguida do post-hoc de Dunns.

Figura 6. Evolução do consumo de ração e peso de animais que receberam rações controle (CON e PF) e hiperlipídicas adequada (HF) ou restrita em Mg (HF[Mg-]) durante 60 dias de ensaio experimental.

Os resultados de composição corporal ao final do experimento são apresentados na Figura 7. Foi observado maior percentual de gordura corporal nos animais dos grupos hiperlipídicos em relação aos do grupo PF, independentemente da restrição de Mg.

Figura 7. Composição corporal de ratos alimentados com rações controle (CON e PF) e hiperlipídicas adequada ou restrita em Mg (HF e HF[Mg-]) após 52 dias de experimento. Em (A) massa magra (g), em (B) Densidade Mineral Óssea (DMO) (g/cm²), em (C) gordura corporal (g). Em (D) imagem gerada pelo DXA, ilustrando aumento de gordura corporal na região abdominal dos animais dos grupos que receberam ração hiperlipídica. Resultados expressos em mediana (P25-P75) (n=4, 5, 7, 7). Valores considerados significativamente diferentes quando $p < 0.05$. A comparação entre os grupos foi feita usando o teste estatístico não-paramétrico Kruskal-Wallis, seguido de post-hoc de Dunns.

5.2.1 Alterações observadas no Tecido Adiposo

5.2.1.1 Histomorfometria

A Figura 8 apresenta os resultados referentes às alterações histomorfométricas no tecido adiposo branco retroperitoneal e ilustra o aspecto histológico do tecido adiposo do grupo controle (D), hiperlipídico (E) e hiperlipídico com restrição de magnésio (F). Observa-se maior número de adipócitos e menor área desta célula no tecido adiposo dos animais do grupo controle em relação aos dos grupos hiperlipídicos, demonstrando hipertrofia do adipócito destes animais. Estes resultados foram confirmados pelo maior diâmetro de Feret (grupos HF), medida definida como a distância entre duas linhas tangenciais paralelas e usada para avaliar projeções de um objeto tridimensional sobre um plano bidimensional, estimando o volume da célula.

Figura 8. Parâmetros histomorfométricos e aspecto histológico do tecido adiposo branco retroperitoneal de ratos que receberam rações controle (CON) e hiperlipídicas adequada (HF) ou restrita em Mg (HF-). Em (A) observa-se a comparação do número de adipócitos por campo microscópico de $900\mu^2$; em (B) o diâmetro de Feret e em (C) a área do adipócito. Estas medidas foram obtidas por ferramenta do software *Image J*, a contagem de células foi feita manualmente. Resultados expressos como mediana (P25-P75). O teste estatístico utilizado foi Kruskal-Wallis, seguido do post-hoc de Dunns. De D-F: Fotomicrografia do tecido adiposo retroperitoneal. Observar tamanho e número de adipócitos no campo de 20x. D. Grupo CON; B. Grupo HF; C. Grupo HF[Mg⁻]. HE, barra= 100 μ m.

5.2.1.2 Histopatológico

A Figura 9 ilustra foco de esteatite com predomínio de macrófagos (A) e células adiposas com citoplasma multivacuolizado (B). A análise histopatológica semiquantitativa demonstrou focos discretos de esteatite com predomínio de macrófagos em um caso (1/5) e em um (1/5) com focos de adipócitos com múltiplos vacúolos no citoplasma de fragmento de tecido adiposo retroperitoneal dos animais do grupo CON, já o fragmento do tecido adiposo epididimal dos animais deste grupo não apresentou nenhuma alteração histopatológica.

No tecido adiposo retroperitoneal dos animais do grupo HF, foram observados focos de esteatite com predomínio de macrófagos em cinco casos (5/7), e em todos os animais houve presença de adipócitos multivacuolizados (7/7); já no TA epididimal dos animais deste mesmo grupo também observou-se focos de esteatite com predomínio de macrófagos no mesmo número de casos, um caso com estruturas *crown-like* (1/7) e em todos houve presença de adipócitos multivacuolizados (7/7).

No grupo HF[Mg⁻] não foi localizado foco de esteatite no fragmento de TA retroperitoneal: entretanto, em todos observaram-se adipócitos multivacuolizados (5/5). Já no fragmento epididimal foram observados focos de esteatite, com predomínio de macrófagos em todos os casos (5/5) e em todos houve presença de adipócitos multivacuolizados (5/5).

Figura 9. Fotomicrografia do tecido adiposo retroperitoneal dos animais do grupo HF. (A) Foco de esteatite discreta com predomínio de macrófagos; (B) Em destaque, adipócito com citoplasma multivacuolizado. HE, barra= 25μm.

5.2.1.3 Avaliação de Parâmetros Inflamatórios

Na Figura 10 estão apresentados os resultados de concentração de citocinas inflamatória (TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10) no extrato proteico do tecido adiposo retroperitoneal íntegro. Não foram observadas alterações na produção destas citocinas no TA dos animais de nenhum dos grupos.

Figura 10. Concentração de citocinas inflamatória (TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10) no extrato proteico do tecido adiposo branco retroperitoneal corrigido pela concentração de proteína total. Resultados expressos como mediana (P25-P75). O teste estatístico utilizado foi Kruskal-Wallis, seguido do post-hoc de Dunns.

5.2.2 Status em Mg

Foi observada, como esperado, menor excreção fecal e urinária de Mg nos animais que receberam ração com restrição de Mg. O Mg plasmático dos animais deste grupo também foi menor; porém esta diferença não foi significativa. A Tabela 7 apresenta os resultados referentes ao status de Mg dos animais dos quatro grupos experimentais ao final do estudo.

Tabela 7. Concentração de magnésio em plasma, eritrócito, tibia e urina de animais ratos alimentados com ração normolipídica e hiperlipídica adequada (HF com 500 mg de Mg/Kg) ou restrita em Mg (HF[Mg] com 150 mg de Mg/Kg) após 60 dias de experimento.

	Grupos Experimentais				p
	CON	PF	HF	HF[Mg]	
Plasma	1,90	2,20	2,00	1,68	0,075
(mg/dL)	(1,78-2,58)	(1,90-2,24)	(1,82-3,70)	(1,58-1,95)	
Eritrócito	6,28	5,52	5,69	5,67	0,705
(mg/dL)	(5,64-6,62)	(5,21-6,59)	(3,87-6,79)	(5,04-6,20)	
Gatrocnêmio	295,0	295,2	291,2	295,6	0,548
(μg/g)	(281,9-295,5)	(278,6-313,8)	(286,5-294,9)	(288,8-302,7)	
Tíbia (mg/g)	3,85 (3,71-3,96)	3,95 (3,71-3,97)	3,92 (3,50-4,09)	3,59 (3,36-3,72)	0,105
Urina	0,02 (0,01-0,05) ^{a,b}	0,03 (0,01-0,04) ^{a,b}	0,05 (0,03-0,06) ^a	0,01 (0,01-0,02) ^b	0,044
(μg/dL)					
Feces (mg/g)	3,49 (3,38-3,63) ^a	3,08 (2,96-3,13) ^a	2,22 (2,11-2,45) ^a	0,89 (0,74-0,9) ^b	<0,001

Resultados expressos como mediana (P25-P75). O teste estatístico utilizado foi Kruskal-Wallis, seguido do post-hoc de Dunns.

5.2.3 Status em Fe e Parâmetros Hematológicos

Figura 11. Parâmetros hematológicos e do *status* em Fe de ratos alimentados com ração controle (CON e PF) e rações hiperlipídicas adequada (HF: com 500mg de Mg/Kg) ou restrita (HF[Mg]: com 150 mg de Mg/Kg) em Mg após 60 dias. De A-D concentração de Fe nos diferentes compartimentos corporais; em (E) Capacidade Total de Ligação com Fe; em (F) Percentual de saturação de transferrina medida pela relação do Fe sérico com a CTLFe; em (G) hepcidina sérica medida por ELISA; em (H) expressão hepática do gene que codifica para hepcidina avaliado por qRT-PCR; em (I) Fragilidade osmótica do Eritrócito; em (J) Expressão Proteica de Ferroportina na Mucosa do Duodeno por Western-Blott. Resultados expressos como mediana (P25-P75). O teste estatístico utilizado foi Kruskal-Wallis, seguido de post-hoc de Dunns.

A Figura 11 apresenta os resultados do *status* em Fe e fragilidade osmótica do eritrócito dos animais ao final do ensaio. Foi observada menor excreção fecal de Fe nos animais do grupo hiperlipídico em relação aos controles; porém, sem alteração da expressão de ferroportina na mucosa do duodeno, ao mesmo tempo

que este grupo apresenta maior capacidade total de ligação com o Fe. Foi observada menor concentração de Fe no baço nos animais dos grupos hiperlipídicos, independentemente da restrição dietética de Mg. A restrição dietética deste mineral, quando associada à dieta hiperlipídica aumentou a fragilidade do eritrócito após 60 dias de experimento. Os outros parâmetros hematológicos que não tiveram diferenças entre os grupos são descritos na Tabela 8.

Tabela 8. Parâmetros hematológicos de ratos alimentados com rações controle (CON e PF) e hiperlipídicas adequada (500 mg/Kg) ou restritas em Mg (150 mg/Kg) após 60 dias de experimento.

	Grupos Experimentais				p
	CON	PF	HF	HF[Mg ⁻]	
Hemoglobina (g/dL)	14,65 (13,68-17,58)	14,80 (14,15-16,60)	15,20 (14,25-2025)	15,05 (14,50-16,95)	0,739
Hematócrito (%)	43,30 (42,23-52,70)	42,20 (40,55-50,60)	44,60 (43,05-59,00)	43,45 (41,43-49,60)	0,506
VCM (fL)	54,0 (52,5-54,8)	54,0 (52,5-55,0)	53,0 (51,5-54,0)	53,0 (52,8-53,3)	0,415
HCM (pg)	18,3 (16,3-18,9)	18,2 (17,7-19,1)	17,8 (17,4-18,2)	18,4 (18,1-18,8)	0,380
CHCM (g/dL)	33,9 (31,4-34,5)	34,0 (32,9-35,6)	34,0 (33,0-34,4)	34,6 (34,3-35,1)	0,314
RBC (x10⁶/μL)	8,10 (7,73-9,83)	8,00 (7,60-9,25)	8,70 (7,95-11,30)	8,10 (7,75-9,30)	0,643
Reticulócitos (%)	5,80 (4,75-6,20)	5,40 (4,05-6,00)	6,20 (4,30-6,60)	5,75 (4,76-6,95)	0,696
Plaquetas (10³/mm³)	556 (465-814)	745 (567-843)	645 (434-802)	688 (550-804)	0,902
WBC^b (x10³/μL)	3,1 (2,3-4,2)	4,3 (2,7-5,4)	4,4 (2,6-4,8)	3,4 (1,8-4,7)	0,628

Os valores são apresentados em mediana (P25-P75). O teste estatístico utilizado foi Kruskal-Wallis, seguido do post-hoc de Dunns.

^a Total de Células da medula óssea

^b Total de células brancas da medula óssea

5.2.4 Hormônios

Na figura 13 são apresentadas as concentrações séricas de hormônios dos animais dos quatro grupos experimentais. Foram observadas menores concentrações de insulina e leptina nos animais do grupo *pair-feeding* (PF) em relação aos grupos hiperlipídicos (HF para a insulina e ambos para leptina).

Figura 13. Hormônios séricos (insulina, leptina e adiponectina) determinados por ELISA após 60 dias de experimento de ratos alimentados com ração controle (CON e PF) e rações hiperlipídicas adequada (HF: com 500mg de Mg/Kg) ou restrita (HF[Mg]: com 150 mg de Mg/Kg) em Mg. Resultados expressos como mediana (P25-P75). O teste estatístico utilizado foi Kruskal-Wallis, seguido do post-hoc de Dunns.

5.2.5 Perfil Lipídico

Na Tabela 9, são apresentados os valores de concentração sérica de frações lipídicas dos animais dos quatro grupos experimentais. Notam-se menores concentrações de triacilglicerol (TAG) no soro dos animais do grupo PF e maiores concentrações de HDL no soro dos animais do grupo hiperlipídico restrito em Mg em relação ao grupo hiperlipídico. Apesar de não ser diferença significativa são observados valores de colesterol maiores no grupo HF[Mg] quando comparado aos controles.

Tabela 9. Frações de lipídios séricos de ratos alimentados com rações controle (CON e PF) e hiperlipídicas adequada ou restrita em Mg (150 mg/Kg) após 60 dias de experimento.

	Grupos Experimentais				p
	CON	PF	HF	HF[Mg]	
Colesterol (mg/dL)	63,0 (58,5-69,75)	61,0 (51,0-67,0)	67,0 (59,0-71,5)	77,0 (68,0-83,0)	0,061
Triacilglicerol (mg/dL)	75,5 (31,75-89,25) ^a	30,0 (20,5-45,0) ^b	75,0 (65,0-122,0) ^a	76,0 (67,8-89,0) ^a	0,034
LDL (mg/dL)	13,0 (9,5-19,0)	10,0 (8,5-17,0)	10,0 (10,0-12,5)	13,0 (10,75-16,25)	0,569
HDL (mg/dL)	24,0 (19,5-28,5) ^{a,b}	18,0 (17,5-19,0) ^a	22,0 (20,0-24,5) ^{a,b}	23,5 (21,75-25,5) ^b	0,027

Resultados expressos como mediana (P25-P75). O teste estatístico utilizado foi Kruskal-Wallis, seguido do post-hoc de Dunns.

6 DISCUSSÃO

O aumento da adiposidade está associado com alterações na homeostase de Fe tanto em animais quanto em humanos (DE CARLI et al, 2014; BERTINATO et al., 2013; SONNWEBER et al., 2011). Por outro lado, uma redistribuição compartimental de Fe, foi também descrita em estudos que utilizaram animais deficientes em Mg como modelo (SCHUMANN et al., 1996; KIM et al., 2011). O importante é que estas duas condições, que podem ocorrer como consequência de inadequações dietéticas, são associadas com inflamação e desenvolvimento de comorbidades relacionadas à obesidade.

Para avaliar as alterações decorrentes dessas condições nutricionais, primeiramente buscou-se realizar ensaio com animais submetidos a nível marginal de restrição dietética de Mg, que se aproximasse da inadequação de consumo do mineral descrita em estudos populacionais (FEILLET-COUDRAY et al., 2000; CAHIL et al., 2013). Adotaram-se, para tanto, dois diferentes graus de restrição, 40 e 70% da recomendação de ingestão do mineral para roedores (300 e 150 mg/Kg de ração) (REEVES et al., 1993).

Nas condições experimentais deste estudo, o consumo de Mg associou-se com a adiposidade ($r = 0,50$; $p = 0,02$). No entanto, não foram observadas alterações na homeostase de Fe e de Mg e nos parâmetros hematológicos analisados (hemograma, fragilidade osmótica do eritrócito, reticulócitos e celularidade da medula óssea). Além disso, a alteração da composição corporal não parece estar relacionada com o consumo de macronutrientes, uma vez que a ingestão de proteínas e de lipídios foi similar entre os grupos. Entretanto, os resultados mostraram correlação entre composição corporal e consumo de Mg. Outros estudos demonstraram menor peso corporal em animais que tiveram restrição dietética de Mg por mecanismos ainda não bem estabelecidos (RUDE et al., 2004; NASSIR et al., 1995; LUTHRINGER et al., 1987). Sabe-se que duas importantes enzimas envolvidas com o metabolismo de lipídios, a lecitina colesterol aciltransferase (LCAT) e a lipase de lipoproteína (LPL), dependem do magnésio para exercerem sua atividade. A LPL, expressa em grande quantidade no tecido adiposo, é fundamental para remoção dos ácidos graxos transportados pelas lipoproteínas para incorporação dos mesmos, na forma de triacilglicerol, no adipócito (TAN, 1978;

BELIN, HE, 2007). Este aspecto nos leva a sugerir que a restrição dietética de Mg pode ter limitado a atividade desta enzima, diminuindo a eficiência de armazenamento no tecido adiposo.

A restrição imposta não foi suficiente para induzir hipomagnesemia, mas sim para redução da excreção urinária do mineral. A alteração é explicável pelo fato de o controle da homeostase de Mg ser feito primariamente pelos rins, para manter as concentrações plasmáticas dentro de certo intervalo (JAHNEN-DECHENT, 2012).

Em nossas condições experimentais, a restrição dietética de magnésio não afetou o *status* de Fe quando os animais consumiram rações normolipídicas. O conteúdo de Fe nas rações oferecidas não diferiu estatisticamente, porém, a variabilidade do conteúdo deste mineral na ração oferecida para o grupo Mg₁₅₀ em relação ao controle, pode ter influenciado para que este grupo tivesse maior consumo do mineral ao longo dos dias de ensaio e, conseqüentemente, maior excreção fecal.

As alterações decorrentes da restrição de Mg, como esperado, foram mais evidentes quando esta foi de 70% (150 mg de Mg/Kg); portanto esta restrição foi adotada no modelo experimental para condução do segundo ensaio em que foram avaliadas as alterações no *status* de Fe e no tecido adiposo frente a dois diferentes “desafios” nutricionais.

Confirmando as observações feitas no primeiro ensaio quanto à homeostase de Mg, a restrição dietética deste mineral também modificou a excreção urinária, provavelmente por conta da ligeira redução nas concentrações plasmáticas, de maneira semelhante àquela observada por Sales e colaboradores (2013).

Em indivíduos com excesso de peso, o consumo calórico elevado, decorrente, principalmente, da ingestão excessiva de lipídios, e a inadequação dietética de Mg; são frequentemente observados; estas duas condições nutricionais são associadas com o quadro inflamatório subclínico, frequentemente observado nesses indivíduos (CAHIL et al., 2013; JARVANDI et al., 2011; MOIZÉ et al., 2011; CAI et al., 2005; SHOELSON et al. 2007). A produção de hepcidina (via Stat3, estimulado por citocinas), descrita como principal fator responsável pelo controle da homeostase do ferro é também influenciada pela inflamação (HENTZ, et al., 2011).

Nas condições experimentais estudadas (Ensaio 2), foi observada redistribuição tecidual do Fe (menores concentrações no baço, $p=0,007$) que ocorreu independentemente da via da hepcidina. Ishizaki e colaboradores (2011) em modelo

experimental com restrição dietética maior de Mg (90% de restrição) observaram que o acúmulo de Fe hepático não foi induzido diretamente pelo aumento na expressão de hepcidina, mas pela via BMP6, regulador central da produção deste hormônio.

Em nosso estudo, foi observada redução na concentração de Fe no baço do grupo HF[Mg⁻], porém tanto a expressão hepática quanto as concentrações séricas de hepcidina não se alteraram. Estes resultados sugerem que as modificações na distribuição compartimental do Fe podem ser decorrentes de outro estímulo que não o da hepcidina. O fato de a expressão de Fpn da mucosa do duodeno não se alterar, corrobora esses resultados, uma vez que a hepcidina influencia o *pool* de Fe intracelular por se ligar a esta proteína e induzir sua degradação (PIETRANGELO et al., 2007).

Uma vez que a alteração na homeostase de ferro não é decorrente da produção aumentada de hepcidina, a hipótese seguinte é que seja consequência de maior demanda de Fe para formação medular de novos eritrócitos, uma vez que o baço é o órgão responsável pela reciclagem do Fe da hemoglobina (NEMETH & GANZ, 2006). Além disso, a restrição dietética de Mg, que sozinha não influenciou nenhum dos parâmetros hematológicos, levou à maior fragilidade osmótica do eritrócito quando associada à sobrecarga lipídica. No eritrócito, maior fragilidade osmótica, leva à hemólise intravascular (HAM e CASTEL, 1940) e, conseqüentemente, à redução do número de células. No presente estudo, o número de eritrócitos não diferiu entre os grupos, possivelmente pelo fato de ser necessário tempo de experimentação maior do que a meia-vida dessas células para que alguma diferença possa ser observada.

Um fato interessante é a capacidade total de ligação com o Fe ter sido maior nos animais do grupo HF em relação ao controle, o que demonstra desequilíbrio na razão de Fe sérico e ferritina e possível deficiência de Fe nestes animais. Esse fato é reforçado pela maior absorção de Fe neste grupo. É possível que o consumo em longo prazo, destas rações levasse a depleção dos estoques de Fe, como observados em outros estudos com animais *knockout* que são mais susceptíveis à obesidade (CHUNG, 2011).

Da mesma forma, acredita-se que esse consumo prolongado repercuta em disfunção no tecido adiposo, uma vez que a avaliação histopatológica revelou focos de esteatite, estruturas *crow-like* e presença de células inflamatórias no tecido adiposo branco (frações epididimal e retroperitoneal) dos animais dos grupos

hiperlipídicos. Essas alterações celulares no tecido adiposo são características de uma expansão saudável, com hipertrofia do adipócito e início do recrutamento de células do sistema imune, semelhante ao observado em estudos com humanos obesos e considerados “metabolicamente saudáveis” (FJELDBORG et al., 2014). Entretanto, esta expansão é limitada o consumo permanente deste tipo de ração pode levar à disfunção da expansão com vascularização inapropriada e inflamação (SUN et al., 2011).

Considerando que nestas condições experimentais o tecido adiposo apresentou maior expansão e alterações inflamatórias sutis, maior tempo de experimento e/ou restrição dietética maior poderiam exacerbar os efeitos da inflamação sobre a homeostase de Fe.

Estes resultados, compatíveis com o observado em estudo em humanos, permitem que investigações posteriores incluam um grupo que após período de restrição dietética receba suplementação deste mineral para avaliar o efeito protetor do Mg.

7 CONCLUSÃO

A restrição dietética de Mg isoladamente não teve influência no *status* em Fe; entretanto, os efeitos do consumo da ração hiperlipídica sobre o *status* em Fe foram agravados pela inadequação dietética de Mg. A redistribuição compartimental do Fe possivelmente decorre de maior demanda deste nutriente para a eritropoese e não da inflamação, como foi aventado inicialmente.

REFERÊNCIAS

- Adipose Tissue.** (2014). In Encyclopaedia Britannica. Retrieved from: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/5948/adipose-tissue>
- AIGNER, E.; THEURL, I.; HAUFE, H. et al. Copper availability contributes to iron perturbations in human nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**, v.135, 2008.
- ALBEIRT, K.G.; ZIMMET, P.; SHAW, J. The metabolic syndrome – a new worldwide definition. **Lancet**, v.366, 2005.
- ALEXANDER, R.T.; HOENDEROP, J.G.; BINDELS, R.J. Molecular determinants of magnesium homeostasis: insights from human disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.19, 2008.
- ARNAUD, M.J. Update on the assessment of magnesium status. **British Journal of Nutrition**, v.99 (Suppl.3), 2008.
- AYUK, J.; GITTOES, N.J. Treatment of hypomagnesemia. **American Journal of Kidney disease: the official journal of the National Kidney Foundation**, v.63, 2014.
- BADIN, P-M.; VILA, I.K.; LOUCHE, K.; MAIRAL, A.; MARQUES, M-A.; BOURLIER, V.; TAVERNIER, G.; LANGIN, D.; MORO, C. High-Fat Diet-Mediated Lipotoxicity and Insulin Resistance Is Related to Impaired Lipase Expression in Mouse Skeletal Muscle. **Endocrinology**, v.154, 2013.
- BARBAGALLO, M.; BELVEDERE, M; DOMINGUEZ, L.J. Magnesium homeostasis and aging. **Magnesium Research**, v. 22, n. 4, 2009.
- BEKRI, S.; GUAL, P.; ANTU, R.; LUCIANI, N.; DAHMAN, M.; RAMESH, B.; IANNELLI, A.; STACCINI-MYX, A.; CASANOVA, D.; BEN AMOR, I. et al. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. **Gastroenterology**, v.131, 2006.
- BELIN, R.J.; HE, K. Magnesium physiology and pathogenic mechanisms that contribute to the development of the metabolic syndrome. **Magnesium Research**, v.20, 2007.
- BES-RASTROLLO, M.; DAM, R.M.; MARTINEZ-GONZALES, M.A.; LI, T.Y.; SAMPSON, L.L.; HU, F.B. Prospective study of dietary energy density and weight gain in women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.88, 2008.
- BONORA, E.; MOGHETTI, P.; ZANCANARO, C.; CIGOLINI, M.; QUERENA, M.; CACCIATORI, V. Corgnati A, Muggeo M. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic hyperglycemic glucose clamp studies. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.**, v.68, 1989.
- BOURGEOIS, F.; ALEXIU, A.; LEMONTER, D. Dietary induced obesity: effect of dietary fats on adipose tissue cellularity in mice. **British Journal of Nutrition**, v.49, 1983.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **VIGITEL BRASIL 2012** – Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. Brasília, 2013.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. **Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009: Antropometria e Estado Nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil**. Rio de Janeiro: IBGE, 2010.

CAHILL, F.; SHAHIDI, M.; SHEA, J.; WADDEN, D.; GULLIVER, W.; RANDELL, E.; VASDEV, S.; SUN, G. High Dietary Magnesium Intake Is Associated with Low Insulin Resistance in the Newfoundland Population. **Plos One**, v.8, n.3, 2013.

CAI, D.; YUAN, M.; FRANTZ, D.F. *et al.* Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. **Nature Medicine**, v.11, 2005.

CANNON, B.; NEDERGAARD, F. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological significance. **Physiological Reviews**, v.84, 2004.

CARVALHO-FILHO, M.A.; UENO, M.; HIRABARA, S.M.; SEABRA, A.B.; CARVALHEIRA, J.B.; OLIVEIRA, M.G.; VELLOSO, L.A.; CURI, R.; SAAD, M.J. S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. **Diabetes**, v.54, 2005.

CHACKO, S.A.; SUL, J.; SONG, Y. ; LI, X. ; LEBLANC, J. ; YOU, Y. ; BUTCH, A. ; LIU, S. Magnesium supplementation, metabolic and inflammatory markers, and global genomic and proteomic profiling: a randomize, double-blind, controlled, crossover trial in overweight individuals. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.93, 2011.

CHANDRASEKARAN, N.C.; WEIR, C.; ALFRAJI, S.; GRICE, J.; ROBERTS, M.S.; BARNARD, R.T. Effects of magnesium deficiency – More than skin deep. **Experimental Biology and Medicine** (published online), 2014.

CORICA, F.; CORSONELLO, A.; IENTILE, R.; CUCINOTTA, D.; DI BENEDETTO, A.; PERTICONE, F.; DOMINGUEZ, L.J. BARBAGALLO, M. Serum ionized magnesium levels in relation to metabolic syndrome in type 2 diabetic patients. **Journal of the American College of Nutrition**, v.25, 2006.

DE CARLI, E.; LOBO, A.R.; SALES, C.H.; TEIXEIRA, P.D.S.; SALES, A.L.C.C.; COLLI, C. Short-term dietary magnesium restriction lowers spleen iron concentrations in growing rats fed a high-fat diet. **LWT- Food Science and Technology** (published online), 2014.

DIBABA, D.T.; XUN, P.; HE, K. Dietary magnesium intake is inversely associated with serum C-reactive protein levels: meta-analysis and systematic review. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.68, 2014.

DIVOUX, A.; MOUTEL, S.; POITOU, C.; LACASA, D.; VEYRIE, N.; AISSAT, A.; AROCK, M.; GUERRE-MILLO, M.; CLÉMENT, K. Mast cells in human adipose tissue: link with morbid obesity, inflammatory status, and diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.97, n.9, 2012.

FAUST, I.M.; JOHNSON, P.R.; STERN, J.S.; HIRSCH, J. Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. **American Journal of Physiology**, v.235, 1978.

FEILLET-COUDRAY, C.; COUDRAY, C.; BRÛLÉ, F.; GUEUX, E.; MAZUR, A.; ABRAMS, S.A.; RAYSSIGUIER, Y. Exchangeable magnesium pool masses reflect the magnesium status of rats. **Journal of Nutrition**, v.130, 2000.

FJELDBORG, K.; PEDERSEN, S.B.; MOLLER, H.J.; CHRISTIANSEN, T.; BENNETZEN, M.; RICHELSEN, B. Human Adipose Tissue Macrophages Are Enhanced but Changed to an Anti-Inflammatory Profile in Obesity. **Journal of Immunology Research**, 2014.

FRAZER, D.M.; WILKINS, S.J.; ANDERSON, G.J. Elevated iron absorption in the neonatal rat reflects high expression of iron transport genes in the distal alimentary tract. **American Journal of Physiology**, v.293, 2007.

GEALEKMAN, O.; GURAV, K.; CHOUINARD, M.; STRAUBHAAR, J.; THOMPSON, M.; MALKANI, S.; HARTIGAN, C.; CORVERA, S. Control of Adipose Tissue Expandability Response to High Fat Diet by the Insulin-like Growth Factor-binding Protein-4. **The Journal of Biological Chemistry**, v.289, 2014.

GUENHTER, M.; JAMES, R.; MARKS, J.; ZHAO, S.; SZABO, A.; KIDAMBI, S. Adiposity distribution influences circulating adiponectin levels. **Translational Research** (online published), 2014.

HAGITA, S.; OSAKA, M.; SHIMOKADO, K.; YOSHIDA, M. Adipose inflammation initiates recruitment of leukocytes to mouse femoral artery: role of adipo-vascular axis in chronic inflammation. **Plos One**, v.6, n.5, 2011.

HALBERG, N.; KHAN, T.; TRUIJILLO, M.E.; WERNSTEDT-ASTERHOLM, I.; ATTIE, A.D.; SHERGWANI, S.; WANG, Z.V.; LANDSKRONER-EIGER, S.; DINEEN, S.; MAGALANG, U.J.; BREKKEN, R.A.; SCHERER, P.E. Hypoxia-Inducible Factor 1 α Induces Fibrosis and Insulin Resistance in White Adipose Tissue. **Molecular Cell Biology**, v.29, 2009.

HALBERG, N.; WERNSTEDT-ASTERHOLM, I.; SCHERER, P.E. The adipocyte as an endocrine cell. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, v.37, 2008.

HAM, T.H.; CASTLE, W.B. Studies on destruction of red blood cells, **Proceedings of the American Philosophical Society**, v.82, 1940.

HE, K.; LIU, K.; DAVIGLUS, M.L.; MORRIS, S.J.; LORIA, C.M.; VAN HORN, L.; JACOBS, D.R. Jr; SAVAGE, P.J. Magnesium intake and incidence of metabolic syndrome among young adults. **Circulation**, v.113, 2006.

HENTZ, M.W.; MUCKENTHALER, M.U.; GALY, B.; CAMASCHELLA, C. Two to tango: Regulation of mammalian iron metabolism. **Cell**, v.142, 2010.

HSU, S. M.; RAINE, L. The use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.29, 1981.

ISHIZAKI, N.; KOTANI, M.; FUNABA, M.; MATSUI, T. Hecpudin expression. In the liver of rats fed a magnesium-deficient diet. **British Journal of Nutrition**, v.106, 2011.

JAHNEN-DECHENT, W.; KETTELER, M. Magnesium basics. **Clinical Kidney Journal**, v.5, 2012.

JARVANDI, S.; GOUGEON, R.; BADER, A.; DASGUPTA, K. Differences in food intake among obese and nonobese women and men with Type 2 Diabetes. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 30, n.4, 2011.

JO, J.; GAVRILOVA, O.; PACK, S.; JOU, W.; MULLEN, S.; SUMNER, A.E.; CUSHMAN, S.W.; PERIWAL, V. Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. **PLoS Computational Biology**, v.5, 2009.

KARALIS, K.P.; GIANNOGONAS, P.; KODELA, E.; KOUTMANI, Y.; ZOUMAKIS, M.; TELI, T. Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. **FEBS Journal**, v. 276, 2009.

KIM, K.H.; ISHIZAKI, N.; IGUCHI, E.; FUNABA, M.; MATSUI, T. Effect of Magnesium Deficiency on Various Mineral Concentrations in Rat Liver. **Biological Trace Element Research**, v.144, 2011.

KRUSZEWSKI, M. Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress, **Mutation Research**, v.531, 2003.

MARGOLIS, K.G.; GERSHON, M.D. Neuropeptides and inflammatory bowel disease. **Current Opinion in Gastroenterology**, v.25, 2009.

MATTHEWS, D.; HOSKER, J.; RUDENSKI, A.; NAYLOR, B.A.; TREACHER, D.F.; TURNER, R.C. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v.28, 1985.

MAZUR, A.; MAIER, J.A.M.; ROCK, E. ; GUEUX, E. ; NOWACKI, W. ; RAYSSIQUIER, Y. Magnesium and inflammatory response: potential physiopathological implications. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.458, 2007.

McCLUNG, J.P.; KARL, J.P. Iron deficiency and obesity: the contribution of inflammation and diminished iron absorption. **Nutrition Reviews**, v.67, 2009.

MOIZÉ, V.; DEULOFEU, R.; TORRES, F.; OSABA, J.M.; VIDAL, J. Nutritional intake and prevalence of nutritional deficiencies prior to surgery in a spanish morbidly obese population. **Obesity Surgery**, v. 21, 2011.

NASSIR, F.; MAZUR, A.; GIANNONI, F.; GUEUX, E.; DAVIDSON, N.O.; RAYSSIGUIER, Y. Magnesium deficiency modulates hepatic lipogenesis and apolipoprotein gene expression in the rat. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1257, 1995.

NEMETH, E.; GANZ, T. Regulation of iron metabolism by hepcidin. **Annual Review of Nutrition**, v.26, 2006.

NG, M.; FLEMING, T.; ROBINSON, M.; THOMSON, B.; GRAETZ, N.; MARGONO, C.; MULLANY, E.C. et al. Global, Regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980—2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet** (online publication), 2014.

OATES, P.S. The relevance of the intestinal crypt and enterocyte in regulating iron absorption, **European Journal of Physiology**, v.455, 2007.

OLEFSKY, M. ; GLASS, C.K. Macrophages, inflammation and insulin resistance. **Annual Review of Physiology**, v.72, 2010.

ORR, J.S.; KENNEDY, A.; ANDERSON-BAUCUM, E.K.; WEBB, C.D.; FORDAHL, S.C.; ERIKSON, K.M.; ZHANG, Y.; ETZERODT, A.; MOESTRUP, S.K.; HASTY, A.H. Obesity Alters Adipose Tissue Macrophage Iron Content and Tissue Iron Distribution. **Diabetes**, v.63, 2014.

OUCHI, N.; PARKER, J.; LUGUS, J.; WALSH, K. Adipokines in inflammation and metabolic disorders. **Nature reviews**, v.11, 2011.

PIETRANGELO, A.; DIERRSEN, U.; VALLI, L. *et al.* STAT3 is required for IL-6-GP130-dependent activation of hepcidin in vivo. **Gastroenterology**, v.132, 2007.

PIMENTEL, G.D.; LIRA, F.S.; ROSA, J.C.; CARIS, A.V.; PINHEIRO, F.; RIBEIRO, E.B.; NASCIMENTO, C.M.O.; OYAMA, L.M. Yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) attenuates both central and peripheral inflammatory effects of diet-induced obesity in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 2012.

PRIMEAV, V.; CODERRE, L.; KARELIS, A.D.; BROCHU, M.; LAVOIE, M.E.; MESSIER, V.; SLADER, R.; CABASA-LHORET, R. Characterizing the profile of obese patients who are metabolically healthy. **International Journal of Obesity**, v.35, 2011.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY Jr., G.C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* writing committee on reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v.123, 1993.

ROCHA, V.S.; LAVANDA, I.; NAKANO, E.Y.; RUANO, R.; ZUGAIB, M.; COLLI, C. Calcium and magnesium status is not impaired in pregnant woman. **Nutrition Research**, v.32, 2012.

RODRIGUEZ-MORAN, M.; GUERRERO-ROMERO, F. Elevated concentrations of TNF- α are related to low serum magnesium levels in obese subjects. **Magnesium Research**, v.17, 2004.

RUDE, R.K. Physiology of Magnesium Metabolism and the Important Role of Magnesium in Potassium Deficiency. **The American Journal of Cardiology**, v.63, 1989.

RUDE, R.K.; GRUBER, H.E. Magnesium deficiency and osteoporosis: animal and human observations. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.15, 2004.

SALES, C.H.; PEDROSA, L.F.C.; LIMA, J.G.; LEMOS, T.M.A.M.; COLLI, C. Influence of magnesium status and magnesium intake on the blood glucose control in patients with type 2 diabetes. **Clinical Nutrition**, v.30, 2012.

SALES, C.H.; SANTOS, A.R.; CINTRA, D.E.C.; COLLI, C. Magnesium-deficient high-fat diet: Effects on adiposity, lipid profile and insulin sensitivity in growing rats. **Clinical Nutrition**, 2013.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed., **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, 2001.

SANAD, M.; OSAMAN, M.; GHARIB, A. Obesity modulate serum hepcidin and treatment outcome of iron deficiency anemia in children: A case control study. **Italian Journal of Pediatrics**, v.37, n.34, 2011.

SANCHEZ-MORITO, N.; PLANELLS, E.; ARANDA, P.; LLOPIS, J. Influence of magnesium deficiency on the bioavailability and tissue distribution of iron in the rat. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.11, 2000.

SCHUMANN, K.; LEBEAU, A.; GRESSER, U.; GUNTHER, T.; VORMANN, J. On the origin of the increased tissue iron content in graded magnesium deficiency states in the rat. **British Journal of Nutrition**, v.77, 1997.

SELL, H.; ECKEL, J. Adipose tissue inflammation: novel insight into the role of macrophages and lymphocytes. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v.13, 2010.

SHAH, N.C.; SHAH, G.J.; LI, Z.; JIANG, X-C.; ALTURA, B.T.; ALTURA, B.M. Short-term magnesium deficiency downregulates telomerase, upregulates neutral sphingomyelinase and induces oxidative DNA damage in cardiovascular tissues: relevance to atherogenesis, cardiovascular diseases and aging. **International Journal Of Clinical and Experimental Medicine**, v.7, 2014.

SHOELSON S. E.; HERRERO, L.; NAAZ, A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. **Gastroenterology**, 132, 2007.

SONG, M.J.; KIM, K.H.; YOON, J.M. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. **Biochemistry and Biophysics Research**, v.346, 2006.

SONG, Y.; RIDKER, P.M.; MANSON, J.E. *et al.* Magnesium intake, C-reactive protein, and the prevalence of metabolic syndrome in middle-aged and older U.S. women. **Diabetes Care**, v.28, 2005.

SONNWEBER, T.; RESS, C.; NAIRZ, M.; THEURL, I.; SCHROLL, A.; MURPHY, A.T.; WROBLEWSKI, V.; WITCHER, D.R.; MOSER, P.; EBENBICHLER, C.F. *et al.* High-fat diet causes iron deficiency via hepcidin-independent reduction of duodenal iron absorption. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.23, 2012.

SUGANAMI, T.; OGAWA, Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. **Journal of Leukocyte Biology**, v.88, 2012.

TAN, M. The lipoprotein lipase system: new understandings. **Canadian Medical Association Journal**, v.118, 1978.

THEURL, I.; AIGNER, E.; THEURL, M.; NAIRZ, M.; SCROLL, A.; SONNWEBER, T.; EBERWEIN, L.; WITCHER, D.R.; MURPHY, A.T.; WROBLEWSKI, V.J; WURZ, E.; DATZ, C.; WEISS, G. Regulation of iron homeostasis in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: diagnostic and therapeutic implications. **Blood**, v.113, 2009.

WEISBERG, S.P.; McCANN, D.; DESAI, M. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in the adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v.112, 2003.

WEISS, G. Iron metabolism in the anemia of chronic disease. **Biochimica et. Biophysica Acta**, v.1790, 2009.

O'DELL, B.L.; BROWNING, J.D.; REEVES, P.G. Zinc deficiency increases the osmotic fragility of rat erythrocytes. **Journal of Nutrition**, v.117, 1987.

BRECHER, G. New methylene blue as a reticulocyte stain. **American Journal of Clinical Pathology**, v.19, 1949.

DRABKIN, D.L.; AUSTIN, J.H. Spectrophotometric Studies: II. Preparations from Washed Blood Cells; Nitric Oxide Hemoglobin and Sulfhemoglobin. **Journal of Biological Chemistry**, v.112, 1935.

ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/111/2012

São Paulo, 6 de novembro de 2012.

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Célia Colli
FBA

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da FCF/USP, em reunião realizada em 05 de novembro de 2012, **APROVOU** o projeto "Status de ferro em ratos alimentados com rações hiperlipídicas e deficientes em magnésio: contribuição do processo inflamatório no tecido adiposo" (Protocolo CEUA nº 371), apresentado por Vossa Senhoria, devendo apenas rever as doses de anestésicos, no item 15 do Formulário de Registro, sugerimos que seja 50mg/Kg de quetamina e 10mg/Kg de xilasina.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Jcilson de Oliveira Martins
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP