UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos
Área de Concentração – Nutrição Experimental

**Efeito da deficiência dietética de magnésio
na resistência insulínica e no *status*
inflamatório e oxidativo em ratos
alimentados com dieta hiperlipídica**

Cristiane Hermes Sales

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Célia Colli

SÃO PAULO
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos
Área de Concentração – Nutrição Experimental

**Efeito da deficiência dietética de magnésio
na resistência insulínica e no *status*
inflamatório e oxidativo em ratos
alimentados com dieta hiperlipídica**

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Cristiane Hermes Sales

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Célia Colli

SÃO PAULO
2013

Ficha Catalográfica

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

Sales, Cristiane Hermes

S163e Efeito da deficiência dietética de magnésio na resistência
insulínica e no *status* inflamatório e oxidativo em ratos
alimentados com dieta hiperlipídica / Cristiane Hermes Sales. --
São Paulo, 2013.
220p.

Tese (doutorado) - 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. Nutrição
clínica : Ciência dos alimentos I. T. II. Colli, Célia, orientador.

641.1 CDD

Cristiane Hermes Sales

**Efeito da deficiência dietética de magnésio na resistência
insulínica e no *status* inflamatório e oxidativo em ratos
alimentados com dieta hiperlipídica**

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profª Drª Célia Colli
Presidente

Profª Drª Ana Maria Pita Lotemberg
1º examinador

Profª Drª Nágila Raquel Teixeira Damasceno
2º examinador

Profª Drª Lígia Araújo Martini
3º examinador

Prof. Titular Fernando Salvador Moreno
4º examinador

São Paulo, 27 de junho de 2013

Ao meu baluarte:

*Edmilson Sales e Célia Hermes, meus exemplos e primeiros mestres,
Eudmilson Sales, que me ensina a cada dia com sua vivacidade, e
Marina Sales, ser encantador...*

AGRADECIMENTOS

Na busca de responder os por quês que surgem no nosso caminho, eis que emergem ideias a serem desenvolvidas longe do ostracismo, e pessoas acabam entrando na nossa vida, seja por uma “razão”, ou por uma “estação”, e alguns, decerto, mais que por uma razão, permanecerão para a vida inteira.

“Aqueles que passam por nós não se vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, e levam um pouco de nós. As tempestades, a bruma e a neve vão incomodá-lo algumas vezes. Pense, então, em todos aqueles que já passaram por isso e diga para si mesmo: o que eles conseguiram eu também posso conseguir. [...]

Quando trocamos viris apertos de mão, competimos em corridas, reunimo-nos para salvar um de nós que está em dificuldade, gritamos pedindo socorro na hora do perigo – só então aprendemos que não estamos sozinhos no mundo.”

Antoine de Saint-Exupéry

Agradeço a Deus, pela segurança do Seu amor e a certeza de que está comigo.

O meu agradecimento especial, ao meu alicerce, MINHA FAMÍLIA, pela essência que me deram, por me ensinarem a arte do (con)viver. Obrigada por compreenderem a minha ausência física, pela presença constante de vocês em todos os momentos, por me entusiasmarem e impulsionarem a seguir sempre em busca dos meus ideais, buscando aprender com TUDO, para alçar voos em busca das estrelas, mas sem esquecer o que é ter os pés no chão. Sem o auxílio de vocês, e sem as constantes palavras de incentivo, talvez não tivesse chegado aqui... Meu eterno agradecimento!

"Ninguém caminha sem aprender a caminhar, sem aprender a fazer o caminho caminhando, sem aprender a refazer, a retocar o sonho, por causa do qual a gente se pôs a caminhar."

Paulo Freire

À professora doutora Célia Colli, minha orientadora, obrigada pelo acolhimento em 2006, pela abertura que me foi dada em continuar no meu caminhar científico sobre as doenças crônicas não transmissíveis, e durante esses anos enveredarmos mais sobre o magnésio. Mais uma semente nossa aqui é lançada! Muito foi o aprendizado durante essa jornada. [...]

"Existem momentos na vida da gente, em que as palavras perdem o sentido ou parecem inúteis, e, por mais que a gente pense numa forma de empregá-las elas parecem não servir. Então a gente não diz, apenas sente."

Autor desconhecido

À professora *Lucia de Fátima Campos Pedrosa Schwarzschild*, que me iniciou cientificamente. Obrigada pelas palavras de incentivo, que em muitos momentos se tornaram impulsos para manter-me na reta. Liberou as asas do 'seu anjo', mas cuidou, ao seu modo, de manter vigília.

À hoje professora *Anna Cecília Queiroz de Medeiros*, que desde os tempos do ginásio participa da construção desta minha jornada científica e, principalmente, de vida. Eis uma amostra de que distância geográfica não é nada. Meu sincero agradecimento minha amiga.

"Um amigo é alguém que sabe a canção do seu coração,
e pode cantá-la quando você tiver esquecido a letra."

Autor desconhecido

Aos alunos e técnicos que trilharam no Laboratório de Nutrição (FBA/FCF-USP) durante o desenrolar desta tese, mesmo que por uma estação:

Adriana Rodrigues, Alexandre Lobo, Aline Nogueira, Ana Lina Sales, Beatriz Mastroeni, Camila Torreglosa, Cassiana Ganem, Edna Machado, Eduardo de Carli, Eduardo Gaievski, Fabiana Lima, Fernanda Brunacci, Isabela Saraiva, Ivana Lavanda, Jéssica Silva, Laila Santos, Luciana Setaro, Maria Izabel Giannichi, Natália Nadur, Pryscilla Teixeira, Renata Figueiredo, Renata Kanashiro, Tatiana Garofalo, Vivianne Rocha e William Latorre.

“Quem olha para fora, sonha; quem olha para dentro, desperta.”

Carl Jung

Aos colegas de outros laboratórios, que direta ou indiretamente me auxiliaram nesta jornada: Amanda Crisma, Ana Mara Silva, Claudimar de Oliveira, Emídio Matos, Janaína Lombello, Kaluce Gonçalves, Karina Nakashima, Kátia Callou, Leonardo Torres, Lucas Pantaleão, Marcelo Sousa, Michele Trindade e Tânia Shiga.

Agradeço especialmente as “estrelinhas” especiais providas dos mais sublimes sentimentos, que ao seu modo souberam compartilhar a sua luz. As verdadeiras estrelas encantam pelo seu brilho singelo e próprio, e não necessitam que eu as destaque aqui, pois tem seu espaço muito bem definido na constelação, e não carecem ofuscar para mostrarem o seu valor.

"As pessoas têm estrelas que não são as mesmas. Para uns, que viajam, as estrelas são guias. Para outros, elas não passam de pequenas luzes. Para outros, os sábios, são problemas. Para o meu negociante, eram ouro. Mas todas essas estrelas se calam. Tu, porém, terás estrelas como ninguém... Quando olhares o céu de noite, porque habitarei uma delas, porque numa delas estarei rindo, então será como se todas as estrelas te rissem! E tu terás estrelas que sabem rir! E quando te houveres consolado (a gente sempre se consola), tu te sentirás contente por me teres conhecido. Tu serás sempre meu amigo. Terás vontade de rir comigo. E abrirás às vezes a janela à toa, por gosto... E teus amigos ficarão espantados de ouvir-te rir olhando o céu. Tu explicarás então: 'Sim, as estrelas, elas sempre me fazem rir!' E eles te julgarão maluco. Será uma peça que te prego..."

Antoine de Saint-Exupéry

À Fátima Arantes Aparecida Sardinha, que se aventurou comigo para territórios longínquos para viver formalidades... Sua companhia fez toda diferença para um marco no meu caminhar. Obrigada por ter-se feito 'presente' em todos os seus significados, dedicando parte do seu precioso tempo comigo, e dando-me a oportunidade de conhecê-la.

À Andréa Martos Naccache, por todo apoio imprescindível! [...] E nas buscas do 'self' somos agraciados por almas perfumadas que encantam com sua singularidade, e nos sustentam nos despertares, ajustando a bússola quando não conseguimos mais entendê-la. Meu muito obrigada querida!

"Fazer o percurso que nos leva do sintoma ao sinthoma, passa por buscar nas sombras que nos movem as luzes que guiarão os nossos caminhos."

Maria Aparecida de Oliveira Ribeiro

Aos professores que compartilharam um pouquinho dos seus conhecimentos de sala de aula durante o meu estágio no programa de aperfeiçoamento de ensino – PAE: professor titular **Fernando Salvador Moreno**, professora titular **Sílvia Maria Franciscato Cozzolino** e professor doutor **Thomas Prates Ong**, junto a professora **Célia Colli** (supervisora e responsável pela disciplina).

À professora doutora **Júlia Maria Pavan Soller**, do IME-USP, por sua solicitude desprendida para minimizar nossas dúvidas estatísticas. Obrigada por mais esta contribuição!

À equipe do Laboratório de Sinalização Celular da UNICAMP, em nome do professor doutor **Dennys Esper Corrêa Cintra**, pela abertura concedida no laboratório de vocês, pela troca de conhecimentos essenciais e pelo auxílio no término das análises de 'western blotting'. Agradeço ainda a **Angélica Rossi Sartori Cintra**, **Erika Anne Roman**, **Nicole Corrêa Guimarães**, **Rafaela Benatti** e **Vanessa Oliveira Lázari**, pelo auxílio e troca de conhecimentos.

À professora associada **Inar Alves de Castro**, a técnica **Luciene Lauer** e a doutoranda **Patrícia Borges**, da FCF-USP, por todo auxílio prestado durante as análises de MDA.

À professora titular **Mari Cleide Sogayar** e sua equipe, do departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP, por compartilharem o conhecimento de vocês e me proporcionarem mergulhar um pouco no mundo das técnicas de biologia molecular. Obrigada pela inigualável atenção dispensada nos momentos que estive com vocês. Conviver com vocês foi um momento ímpar!

À professora associada **Rosa Maria Rodrigues Pereira** e a biomédica **Lilium Takayama**, do Laboratório de Metabolismo Ósseo da FMUSP, pelas análises de densidade óssea de um dos subprojetos desta tese.

Ao especialista de laboratório **Alexandre Mariani Rodrigues**, do Laboratório de Tecnologia de Alimentos da FCF-USP, pela assessoria nas análises de resistência óssea de um dos subprojetos desta tese.

À técnica **Ivanir Pires**, do laboratório de Bioquímica da Nutrição da FCF-USP, pela presteza ímpar em todos os momentos em que precisamos.

À técnica **Tatiana Garofalo** do Laboratório de Biotecnologia de Alimentos da FCF-USP, por viabilizar, junto ao professor **Flávio Finardi Filho**, o uso de uma das capelas do seu laboratório para análises de Soxhlet por praticamente um semestre inteiro...

Ao professor **Jorge Mancini Filho** e a técnica **MSc. Rosângela Pavan Torres**, do laboratório de Lípidos da FCF-USP, por possibilitar a análise do perfil de ácidos graxos do piloto.

Aos professores **Ana Campa**, **José Donato** e **Silvia Maria Franciscatto Cozzolino** pelas considerações feitas no exame de qualificação.

Aos que sempre nos auxiliam no dia a dia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, seja na parte burocrática ou para manter os nossos ambientes mais agradáveis: **Cleonice Estrela**, **Edilson Feitosa**, **Elaine Midori**, **Essy Naira**, **Joana Santos**, **Jorge de Lima**, **Maria de Lourdes Pedrosa**, **Mirian Lopes**, **Mônica Perussi** e **Roberta Uehara**.

Aos funcionários do Biotério de Experimentação Animal do Conjunto das Químicas, pelo zelo resguardado nas atividades que desempenham, especialmente à **Flávia de Moura Prates Ong**, pelos valiosos ensinamentos compartilhados.

Aos queridos amigos potiguares (legítimos ou de coração), que mesmo longe estão sempre presentes...

*Aos pequenos seres *Wistar* que involuntariamente se doaram em prol do conhecimento científico.*

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, por me proporcionar trilhar um pouco mais no mundo acadêmico.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de doutorado concedida (Processo: 2009/05624-7) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo auxílio à pesquisa (Processo: 480487/2009-0).

É difícil nominar a todos, mas, enfim, muitos foram os que entraram nesta jornada e deram sua parcela de contribuição nesta etapa em minha vida, seja tecnicamente, emocionalmente, afetivamente... Obrigada!

"A vida me ensinou a dizer adeus às pessoas que amo, sem tirá-las do meu coração."

Charles Chaplin

"and now the end is near; and so I face the final curtain..."

Frank Sinatra

“Todo cientista é eticamente responsável pelo avanço da ciência.”

FAPESP

*“Por tantas veredas caminhei,
entre flores coloridas e perfumadas,
colhidas logo cedo, ainda orvalhadas.*

*E as pedras encontradas no caminho,
não foram desprezadas, se tornando lição
meditada na derrama da noite em solidão.*

*Tudo valeu pela intensidade vivida,
por ter sempre um escudo amoroso,
na passagem do tempo, em cada pouso.*

*Eis-me aqui, alma em aprendizado,
cujo perfume ainda se revela inconstante,
em processo de metamorfose ambulante.*

*Mas haverá um tempo, não sei quando,
em que desvelada a sutil fragrância,
a alma vagará liberta de qualquer circunstância.”*

Guida Linhares

RESUMO

SALES, C.H. **Efeito da deficiência dietética de magnésio na resistência insulínica e no *status* inflamatório e oxidativo em ratos alimentados com dieta hiperlipídica.** 2013. 220 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O objetivo deste trabalho foi avaliar, em ratos, os efeitos do consumo, em curto prazo, de dieta hiperlipídica e deficiente em magnésio (Mg) na adiposidade, no *status* de Mg, na sensibilidade à insulina, e no *status* inflamatório e oxidativo. Foi inicialmente realizado um ensaio piloto (n = 12), de 24 dias, que permitiu avaliar o padrão alimentar dos animais. A dieta hiperlipídica testada teve sua composição em micronutrientes aumentada proporcionalmente à redução esperada de consumo. A partir desses resultados, delineou-se o ensaio principal, de 32 dias, com os animais alimentados com rações controle (*ad libitum* [CT; n = 8] e *pair-feeding* [PF; n = 16]), e hiperlipídica (adequada [HF; n = 12] e deficiente em Mg [HFMg⁻; n = 12]). Foram avaliados a adiposidade, o perfil lipídico, o *status* de Mg, a resistência insulínica (glicemia e insulinemia de jejum, teste de tolerância à insulina – TTI, fosforilação do receptor de insulina [IR-β], do substrato 1 do IR [IRS-1] e da proteína quinase B [Akt]), e marcadores de inflamação e de estresse oxidativo. O consumo de dieta HFMg⁻ e HF resultou em maior ganho de peso e adiposidade em relação ao PF. Da mesma forma os grupos HF e HFMg⁻ apresentaram concentrações séricas de colesterol total, VLDL-c e de triacilgliceróis mais elevadas em relação ao grupo PF. Como esperado, os animais HFMg⁻ apresentaram alterações no *status* de Mg, evidenciadas pela redução de suas concentrações no osso e na urina. Apesar de não terem sido observadas diferenças na glicemia e na insulinemia entre os grupos, a menor fosforilação das proteínas da via de sinalização de insulina comprovam que a deficiência de Mg agrava os efeitos da dieta hiperlipídica nesta via. Não foram observadas diferenças nos parâmetros de inflamação e de estresse oxidativo. No entanto, observou-se associação inversa do malondialdeído e do inibidor do ativador de plasminogênio-1 com o *status* de Mg. Os resultados do presente estudo reforçam a importância da análise de micronutrientes em dietas experimentais, a fim de se obter dados reprodutíveis. A utilização do grupo PF permitiu verificar que o consumo de dietas hiperlipídicas predispõem a maior adiposidade, resistência insulínica e dislipidemia, e que a deficiência de Mg pode piorar a resistência insulínica.

PALAVRAS-CHAVE: magnésio, dieta hiperlipídica, estresse oxidativo, inflamação, perfil lipídico, ratos, resistência insulínica

ABSTRACT

SALES, C.H. **Effect of dietary magnesium deficiency on insulin resistance and on inflammatory and oxidative status in rats fed with high-fat diet.** 2013. 220 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The aim of this study was to assess, in rats, the effects of high-fat and magnesium (Mg) deficient diet, in short-time, on adiposity, magnesium *status*, insulin sensitivity, and oxidative and inflammatory *status*. Firstly, it was realized a pilot study (n = 12), 24 days, which allowed to assess the dietary patterns of the animals. The high-fat diet tested had its micronutrient composition increased proportionally to the expected reduction in consumption. Based in these results, it was outlined the principal study, 32 days, with the animals fed with control diet (*ad libitum* [CT; n = 8] and *pair-feeding* [PF; n = 16]), and high-fat diet (adequate [HF; n = 12] and magnesium deficient [HFMg⁻; n = 12]). It was assessed the adiposity, serum lipid profile, Mg status, insulin resistance (fasting glucose and insulin, insulin tolerance test – ITT, phosphorylation of insulin receptor [IR-β], insulin receptor substrate 1 [IRS-1] and protein kinase B [Akt]), and markers of inflammation and oxidative stress. The consumption of HFMg⁻ and HF results in greater weight gain and adiposity compared to PF. Likewise, the high-fat groups showed serum total cholesterol, VLDL-c, and triglycerides higher than PF group. As expected, the animals showed changes in magnesium status, as evidenced by lower bone and urine levels. Although no differences were observed in blood glucose and serum insulin levels among the groups, the lowest phosphorylation of the insulin signaling pathway show that Mg deficiency intensifies the effects of high-fat diet in this pathway. No differences were observed in the inflammatory and oxidative stress parameters. However, it was observed an inverse association of malondialdehyde and plasminogen activator inhibitor-1 with Mg status. The results of this study support the importance of micronutrients analyzes in the experimental diets, in order to obtain reproducible data. With the PF group it was showed that high-fat diets predisposes to greater adiposity, dyslipidemia, insulin resistance, and that Mg deficiency can worse the effects on insulin resistance.

KEY WORDS: high-fat diet, inflammation, insulin resistance, lipid profile, magnesium, oxidative stress, rats

LISTA DE FIGURAS

Parte I

Figura I- 1 – Mecanismos celulares que predispõem a resistência insulínica na obesidade	38
Figura I- 2 - Participação do magnésio na ação da insulina: célula β pancreática e tecidos periféricos	45
Figura I- 3 - Inter-relações da obesidade com a deficiência de magnésio.....	51

Parte II

Figura II-1 - Curva de crescimento de ratos Wistar alimentados, durante 32 dias, com dieta controle, hiperlipídica ou hiperlipídica deficiente em magnésio.....	76
Figura II-2 - <i>Status</i> de magnésio de ratos <i>Wistar</i> alimentados, durante 32 dias, com dieta controle, hiperlipídica ou hiperlipídica deficiente em magnésio	78
Figura II-3 - Curva glicêmica durante teste de tolerância à insulina (A), constante do teste de tolerância à insulina (B), glicose sanguínea (C) e insulina sérica (D), HOMA-IR (E) e HOMA- β (F) de ratos <i>Wistar</i> alimentados, durante 32 dias, com dieta controle, hiperlipídica ou hiperlipídica deficiente em magnésio	80
Figura II-4 - Fosforilação da subunidade β do receptor de insulina – IR β (A), do substrato 1 do receptor de insulina – IRS-1 [Tyr895] (B) e da proteína quinase B – Akt [Ser473] (C) em extratos totais de fígado de ratos <i>Wistar</i> alimentados, durante 32 dias, com dieta controle, hiperlipídica ou hiperlipídica deficiente em magnésio.	81

Parte IV

Figura C-1 - Peso corpóreo (a), evolução do ganho de peso (b), ganho de peso (c), índice de adiposidade (d) e composição corpórea (e) de ratos <i>Wistar</i> alimentados, durante 24 dias, com dieta normolipídica ou hiperlipídica. Resultados expressos em média e desvio padrão (n = 6 animais/grupo)	153
Figura C-2 - <i>Status</i> de magnésio de ratos <i>Wistar</i> alimentados, durante 24 dias, com dieta normolipídica ou hiperlipídica. (n = 6 animais/grupo)	154
Figura C-3 - Curva glicêmica durante teste de tolerância à insulina (a), constante do teste de tolerância à insulina (b), e glicose sanguínea (c) e insulina sérica (d) de ratos <i>Wistar</i> alimentados, durante 24 dias, com dieta normolipídica ou hiperlipídica. (n = 6 animais/grupo)	155
Figura D-1 - Delineamento experimental: ENSAIO PILOTO	166
Figura D-2 - Delineamento experimental: ENSAIO PRINCIPAL	167
Figura D-3 - Fluxograma no dia da eutanásia	169

- Figura D-4** - Reação que ocorre entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o MDA, durante o aquecimento em meio contendo ácido ortofosfórico180
- Figura F-1** - Magnésio plasmático/sérico e eritrocitário de ratos *Wistar* (n = 9). Avaliação de uso de anticoagulantes. Médias $\pm$ DP ($p > 0,05$).189
- Figura G-1** - Cromatograma representativo do branco utilizado no método: todos os reagentes sem amostra e sem padrão interno194
- Figura G-2** - Cromatogramas representativos das análises do branco com padrão C_{13:0} (A) e das amostras de fígado de ratos *Wistar* (B)197
- Figura G-3** - Cromatograma representativo da análises do padrão *Lipid Standards: fatty acid methyl ester mixtures* (189-19) - Supelco®198

LISTA DE TABELAS

Parte I

Tabela I- 1 - Ingestão média de magnésio: estudos desenvolvidos no Brasil.....	42
Tabela I- 2 - Resultados de estudos experimentais que avaliam os efeitos da deficiência dietética de magnésio sobre alterações lipídicas	47

Parte II

Tabela II-1 - Formulação das dietas experimentais.....	68
Tabela II-2 - Composição química das dietas ofertadas durante o ensaio principal	74
Tabela II-3 - Consumo dietético e coeficiente de eficácia alimentar de ratos Wistar alimentados, durante 32 dias, com dieta controle, hiperlipídica ou hiperlipídica deficiente em magnésio	75
Tabela II-4 - Ganho de peso corpóreo, índice de adiposidade e composição corpórea de ratos Wistar alimentados, durante 32 dias, com dieta controle, hiperlipídica ou hiperlipídica deficiente em magnésio.....	76
Tabela II-5 - Perfil lipídico de ratos Wistar alimentados, durante 32 dias, com dieta controle, hiperlipídica ou hiperlipídica deficiente em magnésio	77
Tabela II-6 - Análise de regressão linear múltipla <i>stepwise</i> considerando os parâmetros de perfil lipídico, índice de adiposidade, <i>status</i> de magnésio e de glicemia como variáveis dependentes.....	82

Parte IV

Tabela C-1 - Formulação das dietas padrão AIN-93G e experimentais do ensaio piloto.....	147
Tabela C-2 - Composição química das dietas ofertadas durante o período experimental (dietas customizadas da Harlan Teklad Laboratories)	151
Tabela C-3 - Ingestão dietética de ratos <i>Wistar</i> alimentados, durante 24 dias, com dieta normolipídica ou hiperlipídica ^a	152
Tabela C-4 - Perfil de ácidos graxos no fígado, parâmetros glicêmicos, marcadores de estresse oxidativo e de inflamação de ratos <i>Wistar</i> alimentados, durante 24 dias, com dieta normolipídica ou hiperlipídica	155
Tabela D-1 - Formulação das dietas usadas no ensaio piloto	171
Tabela D-2 - Formulação das dietas usadas no ensaio principal	172
Tabela D-3 - Condições para quantificação de minerais em dietas em espectrofotômetro de absorção atômica Perkin Elmer AAnalyst 100 (Norwalk, CT, EUA)*	174

Tabela G-1 - Ácidos graxos quantificados nos brancos avaliados pelo método de hidrólise ácida durante a validação da extração de ácidos graxos em fígado de ratos <i>Wistar</i>	194
Tabela G-2 - Precisão intra- e inter-ensaio do método de extração e metilação de ácidos graxos por hidrólise ácida em amostras de fígado de ratos <i>Wistar</i> *	195
Tabela G-3 - Erro relativo do método de extração e metilação de ácidos graxos em fígados de ratos, por hidrólise ácida. Avaliação feita com padrão interno: triglicerídeo tritridecanoína (C _{13:0}) Sigma® (concentração esperada do padrão interno = 0,005 mg/mL)	195
Tabela G-4 - Comparação dos resultados obtidos experimentalmente com o valor do material certificado de referência*	196
Tabela J-1 - Perfil lipídico e <i>status</i> oxidativo e inflamatório de ratos <i>Wistar</i> alimentados, durante 32 dias, com dieta controle, hiperlipídica ou hiperlipídica deficiente em magnésio	203
Tabela J-2 - Análise de regressão linear múltipla <i>stepwise</i> considerando os parâmetros de peroxidação lipídica, estresse oxidativo e inflamação como variáveis dependentes	204

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	adenosina difosfato
AGL	ácidos graxos livres
AIN	<i>American Institute of Nutrition</i> (Instituto Americano de Nutrição)
AIN-93G	ração recomendada pela AIN para período de crescimento
AIN-93G-MX	mix mineral para ração AIN-93G
AIN-93G-VX	mix vitamínico para AIN-93G
Akt	proteína quinase B
AMP	adenosina 3',5'-monofosfato
ANOVA	análise de variância
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i> (Associação de Químicos Analíticos Oficial)
AP-1	proteína ativadora 1
aPKC	proteína quinase C atípica
ATP	adenosina trifosfato
BRAZOS	<i>the Brazilian osteoporosis study</i> (estudo brasileiro de osteoporose)
CAT	catalase
CEEA	comitê de ética em experimentação animal
CT	grupo controle
COX2	ciclo-oxigenase 2
DCNT	doenças crônicas não transmissíveis
EAA	espectrofotometria de absorção atômica
EAR	<i>estimated adequate intake</i> (ingestão adequada estimada)
ER-estresse	estresse de retículo endotelial
ERO	espécies reativas de oxigênio
FAS	<i>fatty acid sintase</i> (ácido graxo sintase)
FATP-1	<i>fatty acid transporter protein 1</i> (proteína transportadora de ácidos graxos 1)
GLC	glicose
GLUT	<i>glucose transporter</i> (transportador de glicose)
GSH-Px	glutathione peroxidase
GR	glutathione reductase
GSH	glutathione
GSSG	glutathione oxidada
HbA1c	hemoglobina glicada
HDL-c	<i>high density lipoprotein</i> (lipoproteína de alta densidade)
HF	grupo hiperlipídico
HFMg ⁻	grupo hiperlipídico deficiente em magnésio
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA
HOMA-IR	<i>homeostasis model assessment insulin resistance</i>
HOMA-β	<i>homeostasis model assessment β-cell function</i>
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
ICAM	molécula de adesão intracelular
IFN-γ	interferon gama
IgG	imunoglobulina G
IKK	inibidor do fator nuclear kappa B quinase
IL	interleucina

IMC	índice de massa corporal
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
IR	receptor de insulina
IRS	substrato do receptor de insulina
JNK	janus N-terminal quinase
K _{TTI}	constante da curva de glicose durante o teste de tolerância à insulina
LCCoA	acil coenzima A de cadeia longa
LDL	low density lipoprotein (lipoproteína de baixa densidade)
MCP	proteína quimioatrativa de monócitos
MDA	malondialdeído
MIP	proteína inflamatória dos macrófagos
MnSOD	mangânês superóxido dismutase
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
NADP ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NF	grupo normolipídico
NF-κB	fator nuclear kappa B
P	fosfato
PAI-1	inibidor do ativador de plasminogênio 1
PBS	<i>protein bovine serum</i>
PCR	proteína C reativa
PI3-q	fosfatidil inositol 3 quinase
PF	grupo <i>pair-feeding</i>
PKC	proteína quinase C
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PGF1 _α	prostaglandina F1 alfa
PKR	proteína quinase R
R24h	recordatório alimentar de 24 h
RA	registro alimentar
RDA	<i>recommended dietary assessment</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGF	fator transformador de crescimento
TGRLP	lipoproteína rica em triacilglicerol
TLR	<i>toll like receptor</i>
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
TTI	teste de tolerância à insulina
TxB ₂	troboxano B ₂
UCP	<i>uncoupling protein</i> (proteína desacopladora)
VCAM	molécula de adesão da célula vascular
VCT	valor calórico total
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

♀	feminino
♂	masculino
↓	diminuição
↑	aumento
%	porcento
a	anos
BCA	ácido bicincônico
BF ₃	trifluoreto de boro
°C	graus Celsius
Ca	cálcio
CaCl ₂	cloreto de cálcio
cm	centímetro
CuCl ₂	cloreto de cobre
d	dia
dL	decilitro
EC	<i>enzyme code</i> (código da enzima)
FeCl ₃	cloreto de ferro
FNa	fluoreto de sódio
g	gramas
h	hora
H ₂ O	água
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HCL	ácido clorídrico
HNO ₃	ácido nítrico
K	potássio
kcal	quilocalorias
kg	quilograma
L	litro
La ₂ O ₃	óxido de lantânio
Mg	magnésio
Mg ²⁺	magnésio
mg	miligramas
MgCl ₂	cloreto de magnésio
min	minuto
mL	mililitros
mmol	milimol
n	número
μg	micrograma
μmol	micromol
μU	microunidades
N	nitrogênio
NaCl	cloreto de sódio
Na ₄ P ₂ O ₇	pirofosfato de sódio
Na ₃ VO ₄	ortovanadato de sódio
ng	nanograma

nm	nanometro
nmol	nanomol
pg	picograma
pH	potencial hidrogeniônico
p/v	peso/volume
rpm	rotações por minuto
s	segundos
sem	semanas
U	unidade
UI	unidades internacionais
v/v	volume/volume
ZnCl ₂	cloreto de zinco

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vii
RESUMO	xix
ABSTRACT	xx
LISTA DE FIGURAS	xxi
LISTA DE TABELAS	xxiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xxv
LISTA DE SÍMBOLOS	xxvii
APRESENTAÇÃO	31
PARTE I	
FUNDAMENTO TEÓRICO	33
1 Introdução	35
2 Obesidade: caminho para a resistência insulínica	36
3 Magnésio e fatores associados à obesidade e a síndrome metabólica	40
4 Evidências do papel do magnésio nos fatores associados à obesidade	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
PARTE II	
TRABALHO EXPERIMENTAL	59
Considerações iniciais	59
Artigo	
Resumo	64
1 Introdução	65
2 Material e métodos	66
2.1 Animais e delineamento experimental	66
2.1.1 Tamanho amostral	67
2.2 Dietas experimentais	68
2.3 Composição corporal e índice de adiposidade	69
2.4 Perfil lipídico	69
2.5 Status de magnésio	69
2.6 Teste de tolerância à insulina	70
2.7 Glicemia e insulinemia de jejum	70

2.8 Fosforilação de proteínas da via de sinalização de insulina	72
2.9 Análise estatística	72
3 Resultados.....	74
4 Discussão	83
Referências.....	88
PARTE III	
Considerações finais.....	95
PARTE IV	
APÊNDICES.....	97
PARTE V	
ANEXOS.....	207

APRESENTAÇÃO

Um dos fatores que motivaram o desenvolvimento deste trabalho experimental foram as controvérsias sobre a associação entre o baixo consumo dietético de magnésio (frequente na população) e o risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). O magnésio está envolvido em alterações metabólicas associadas à obesidade e à síndrome metabólica. Por exemplo, indivíduos com diabetes tipo 2 e hipertensão arterial sistêmica frequentemente apresentam alterações no status do mineral. Além disso, complicações crônicas dessas morbidades também estão associadas à deficiência de magnésio.

Estudo anterior, realizado em nosso laboratório, com pacientes com diabetes tipo 2, mostrou que o baixo consumo de magnésio e alterações no status do mineral associaram-se tanto ao pior controle glicêmico quanto à obesidade.¹

Diante disso, a hipótese desse trabalho foi que ratos jovens alimentados com dietas hiperlipídicas podem ter a resistência insulínica, a inflamação e o estresse oxidativo agravados quando ingerem dieta deficiente em magnésio, e assim tem aumentado o risco do surgimento de DCNT mais precocemente.

O trabalho aqui apresentado foi dividido em cinco partes: **I**- revisão da literatura que fundamenta a hipótese; **II**- trabalho experimental (ensaio principal); **III**- considerações finais; **IV**- apêndices, em que são apresentados trabalhos e dados complementares à tese; e **V**- anexos.

¹ SALES, C.H. **Avaliação do status de magnésio em pacientes com diabetes mellitus tipo 2**. 2008. 180 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

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. **Clin Nutr**, v. 30, p. 359-364, 2011.

FUNDAMENTO TEÓRICO²

“Um novo olhar sobre o papel do magnésio na gênese da obesidade”

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que
ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

² Nos Apêndices A e B estão disponíveis dois capítulos sobre magnésio, elaborados em paralelo a esta tese, e que complementam o conteúdo aqui abordado.

1 Introdução

O sobrepeso e a obesidade são o quinto maior fator de risco para morte na população mundial, tendo em vista que, tanto em adultos quanto em crianças, a presença do acúmulo excessivo de tecido adiposo, característico da obesidade, aumenta o risco de alterações metabólicas como resistência periférica à insulina, dislipidemias e aumento dos níveis pressóricos. Essas alterações podem ter como desfechos outras doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como o diabetes tipo 2, hipertensão, doenças cardiovasculares e alguns cânceres (mama, endométrio e cólon), doenças estas igualmente tidas como problemas de saúde pública (WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, 2011).

Fato que chama atenção é o crescente número de casos de obesidade infantil nos países em desenvolvimento (GUPTA, 2012; 2013) e, no mundo, de diabetes tipo 2 infantil (KADIKI; REDDY; MARZOUK, 1996; GABBAY; CESARINI; DIB, 2003; KIESS *et al.*, 2003; LIBMAN; ARSLANIAN, 2003; GUPTA, 2012).

A obesidade resulta principalmente do desequilíbrio entre o consumo e o gasto de energia, consequência da ingestão de dietas com alta densidade energética e sedentarismo, interagindo com fatores ambientais, biológicos e genéticos. Nesse panorama nutricional, o excesso de ingestão de lipídios e de açúcares, frequentemente vem atrelado ao baixo consumo de micronutrientes, devido às escolhas alimentares, e pode levar indivíduos obesos e com sobrepeso a déficits nutricionais (KAIDAR-PERSON *et al.*, 2008).

A baixa ingestão de magnésio vem sendo positivamente associada ao maior risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (HE *et al.*, 2006; MORRELL *et al.*, 2012; COLLI; SALES; ROCHA, 2013), e, alterações na sua distribuição no organismo, associadas ao maior risco de complicações de algumas morbidades (GUERRERO-ROMERO; RODRÍGUEZ-MORÁN, 2002a; 2002b; GUERRERO-ROMERO; RODRÍGUEZ-MORÁN, 2006; GUERRERO-ROMERO; BERMUDEZ-PEÑA;

RODRÍGUEZ-MORÁN, 2011), especialmente o diabetes tipo 2 (SALES *et al.*, 2011; LECUBE *et al.*, 2012).

Diante dessas considerações, buscou-se, através dessa revisão, compreender melhor os mecanismos que estão envolvidos com a predisposição a doenças crônicas não transmissíveis e sua relação com o magnésio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTURA, B.M.; KOSTELLOW, A.B.; ZHANG, A.; LI, W.; MORRILL, G.A.; GUPTA, R.K.; ALTURA, B.T. Expression of the nuclear factor- κ B and proto-oncogenes c-fos and c-jun are induced by low extracellular Mg^{2+} in aortic and cerebral vascular smooth muscle cells: possible links to hypertension, atherogenesis, and stroke. **Am J Hypertens**, v. 16, p. 701-707, 2003.
- ARAUJO, M.C.; BEZERRA, I.N.; BARBOSA, F.S.; JUNGER, W.L.; YOKOO, E.M.; PEREIRA, R.A.; SICHIERI, R. Macronutrient consumption and inadequate micronutrient intake in adults. **Rev Saúde Pública**, v. 47, p. 177S-89S, 2013 (Supl 1).
- BANAS, S.M.; ROUCH, C.; KASSIS, N.; MARKAKI, E.M.; GEROZISSIS, K. A dietary fat excess alters metabolic and neuroendocrine responses before the onset of metabolic diseases. **Cell Mol Neurobiol**, v. 29, p. 157-168, 2009.
- BARNES, P.J.; KARIN, M. Nuclear factor- κ B – a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N Engl J Med**, v. 336, n. 15, p. 1066-1071, 1997.
- BELIN, R.J.; HE, K. Magnesium physiology and pathogenic mechanisms that contribute to the development of the metabolic syndrome. **Magn Res**, v. 20, p. 107-129, 2007.
- BLACHE, D.; DEVAUX, S.; JOUBERT, O.; LOREAU, N.; M., S.; DURAND, P.; *et al.* Long-term moderate magnesium-deficient diet shows relationships between blood pressure, inflammation and oxidant stress defense in aging rats. **Free Rad Biol Med**, v. 41, n. 2, p. 277-284, 2006.
- BOPARAI, R.K.; KIRAN, R.; BANSAL, D.D. Insinuation of exacerbated oxidative stress in sucrose-fed rats with a low dietary intake of magnesium: evidence of oxidative damage to proteins. **Free Radic Res**, v. 41, n. 9, p. 981-9, 2007.
- BRIAUD, I.; KELPE, C.L.; JOHNSON, L.M.; TRAN, P.O.; POITOUT, V. Differential effects of hyperlipidemia on insulin secretion in islets of Langerhans from hyperglycemic versus normoglycemic rats. **Diabetes**, v. 51, p. 662– 668, 2002.
- BUETTNER, R.; PARHOFER, K.G.; WOENCKHAUS, M.; WREDE, C.E.; KUNZ-SCHUGHART, L.A.; SCHÖLMEICH, J.; BOLLHEIMER, J.C. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. **J Mol Endocrinol**, v. 36, p. 485-501, 2006.
- BUSSEROLLES, J.; GUEUX, E.; ROCK, E.; MAZUR, A.; RAYSSIGUIER, Y. High fructose feeding of magnesium deficient rats is associated with increased plasma triglyceride concentration and increased oxidative stress. **Magn Res**, v. 16, n. 1, p. 7-12, 2003.
- CAMPANHOLO, J.M. **Efeito da suplementação com magnésio sobre o desempenho em jogadores de futebol**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- ÇELİK, N.; ANDIRAN, N.; YILMAZ, A.E. The relationship between serum magnesium levels with childhood obesity and insulin resistance: a review of the literature. **J Pediatr Endocr Met**, v. 24, n. 9-10, p. 675-678, 2011.
- CHAUDHARY, D.P.; BOPARAI, R.K.; SHARMA, R.; BANSAL, D.D. Studies on the development of an insulin resistant rat model by chronic feeding of low magnesium high sucrose diet. **Magn Res**, v. 17, n. 4, p. 293-300, 2004.
- CHAUDHARY, D.D., BOPARAI, R.K., BANSAL, D.D. Effect of a low magnesium diet on in vitro glucose uptake in sucrose fed rats. **Magn Res**, v. 20, n. 3, p. 187-195, 2007.
- CINTRA, D.E.; ROPELLE, E.R.; PAULI, J.R. **Obesidade e diabetes: fisiopatologia e sinalização celular**. São Paulo: Sarvier, 2011. 405p.

CONG, P.; ZHONG, J.; ZHANG, J.; SUN, J.; LI, L. Effects of magnesium intake on expression of insulin receptor in type 2 diabetes rats. **Wei Sheng Yan Jiu**, v. 41, n. 2, p. 264-7, 2012.

COLLI, C.; SALES, C.H.; ROCHA, V.S. Assessment of magnesium status. In: BERHARDT, L.V. (Org.). **Advances in medicine and biology**. Hauppauge: Nova Science Publishers Inc, 2013. v. 40, p. 191-216.

CORICA, F.; CORSONELLO, A.; IENTILE, R.; CUCINOTTA, D.; BENEDETTO, A.D.; PERTICONE, F.; DOMINGUEZ, L.J.; BARBAGALLO, M. Serum ionized magnesium level in relation to metabolic syndrome in type 2 diabetic patients. **J Am Coll Nutr**, v. 25, n. 3, p. 210-215, 2006.

CUNNANE, S.C.; SOMA, M.; MCADOO, K.R.; HORROBIN, D.F. Magnesium deficiency in the rat increases tissue levels of docosahexaenoic acid. **J Nutr**, v. 115, p. 1498-503, 1985.

EVANGELOPOULOS, A.A.; VALLIANOU, N.G.; PANAGIOTAKOS, D.B.; GEORGIU, A.; ZACHARIAS, G.A.; ALEVRA, A.N.; ZALOKOSTA, G.J.; VOGIATZAKIS, E.D.; AVGERINOS, P.C. An inverse relationship between cumulating components of the metabolic syndrome and serum magnesium levels. **Nutr Res**, v. 28, p. 659-663, 2008.

FEROLLA, S.M.; FERRARI, T.C.A.; LIMA, M.L.P.; REIS, T.O.; TAVARES Jr., W.C.; COUTO, O.F.M.; VIDIGAL, P.V.T.; FAUSTO, M.A.; COUTO, C.A. Dietary patterns in Brazilian patients with non alcoholic fatty liver disease: a cross-sectional study. **Clinics** v. 68, n. 1, p. 11-17, 2013.

FOOD AND NUTRITION BOARD; INSTITUTE OF MEDICINE. Magnesium. In: _____. Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride. Washington, DC: National Academy Press, 1997. Cap. 6, p. 190-249.

FORD, E.S.; MOKDAD, A.H. Dietary magnesium intake in a national sample of U.S. adults. **J Nutr**, v. 133, p. 2879-2882, 2003.

GABBAY, M.; CESARINI, P.R.; DIB, S.A. Diabetes melito do tipo 2 na infância e adolescência: revisão da literatura. **J Pediatr** 2003;79(3):201-8.

GALANTE, A.P. **Desenvolvimento e validação de um método computadorizado para avaliação do consumo alimentar, preenchido por indivíduos adultos utilizando a web**. 2007. 114 f. Tese (Doutorado em Nutrição Humana Aplicada) – FSP/FCF/FEA, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

GOTTSCHALL, C.B.A.; ÁLVARES-DA-SILVA, M.R.; CAMARGO, A.C.R.; BURTETT, R.M.; da SILVEIRA, T.R. Avaliação nutricional de pacientes com cirrose pelo vírus da hepatite C: a aplicação da calorimetria indireta. **Arq Gastroenterol**, v. 41, n. 4, p. 22, 2004.

GUERRERO-ROMERO, F.; RODRÍGUEZ-MORÁN, M. Relationship between serum magnesium levels and C-reactive protein concentration, in non-diabetic, non-hypertensive obese subjects. **Int J Obes**, v. 26, p. 469-474, 2002.

GUERRERO-ROMERO, F.; RODRÍGUEZ-MORÁN, M. Low serum magnesium levels and metabolic syndrome. **Acta Diabetol**, v. 39, p. 209-213, 2002.

GUERRERO-ROMERO, F.; RODRÍGUEZ-MORÁN, M. Hypomagnesemia, oxidative stress, inflammation, and metabolic síndrome. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 22, n. 6, p. 471-476, 2006.

GUERRERO-ROMERO, F.; BERMUDEZ-PEÑA, C.; RODRÍGUEZ-MORÁN, M. Severe hypomagnesemia and low-grade inflammation in metabolic síndrome. **Magnes Res**, v. 24, n. 2, p. 45-53, 2011.

- GUEUX, E.; MAZUR, A.; CARDOT, P.; RAYSSIGUIER, Y. Magnesium deficiency affects plasma lipoprotein composition in rats. **J Nutr**, v. 121, p. 1222-7, 1991.
- GUPTA, N.; GOEL, K.; SHAH, P.; MISRA, A. Childhood obesity in developing countries: epidemiology, determinants, and prevention. **Endocr Rev** 33: 48–70, 2012.
- GUPTA, N.; GOEL, K.; SHAH, P.; MISRA, A. Childhood obesity and the metabolic syndrome in developing countries. **Indian J Pediatr**, v. 80, p. S28-37, 2013. (Suppl 1)
- HAFFNER, S.M. Abdominal obesity, insulin resistance, and cardiovascular risk in pre-diabetes and type 2 diabetes. **Eur Heart J Supp**, v. 8, p. B20-B25, 2006.
- HANS, C., CHAUDHARY, D., BANSAL, D. Magnesium deficiency increases oxidative stress in rats. **India J Exp Biol**, v. 40, n. 11, p. 1275-1279, 2002.
- HE, K.; LIU, K.; DAVIGLUS, M.L.; MORRIS, S.J.; LORIA, C.M.; HORN, L.V.; JACOBS, D.R.; SAVAGE, P.J. Magnesium intake and incidence of metabolic syndrome among young adults. **Circulation**, v. 113, p. 1675-1682, 2006.
- HIROSUMI, J.; TUNCMAN, G.; CHANG, L.; GÖRGÜN, C.Z.; UYSAL, K.T.; MAEDA, K.; KARIN, M.; HOTAMISLIGIL, G.S. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature**, v. 420, p. 333-336, 2002.
- HOTMAMISLIGIL, G.S.; SHARGILL, N.S.; SPIEGELMAN, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, p. 87-91, 1993.
- HUERTA, M.G.; ROEMMICH, J.N.; KINGTON, M.L.; BOVBJERG, V.E.; WELTMAN, A.L.; HOLMES, V.F.; PATRIE, J.T.; ROGOL, A.D.; NADLER, J.L. Magnesium deficiency is associated with insulin resistance in obese children. **Diabetes Care**, v. 28, p. 1175-1181, 2005.
- HUMMASTI, S.; HOTAMISLIGIL, G.S. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. **Circ Res**, v. 107, p. 579-591, 2010.
- ITANI, S.I.; RUDERMAN, N.B.; SCHMIEDER, F.; BODEN, G. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B- β . **Diabetes**, v. 51, p. 2005-2011, 2002.
- KADIKI, O.A.; REDDY, M.R.S.; MARZOUK, A.A. Incidence of insulin-dependent diabetes (IDDM) and non-insulin-dependent diabetes (NIDDM) (0-34 years at onset) in Benghazi, Libya. **Diabetes Res Clin Pract** v. 32, p. 165- 17, 1996.
- KAIDAR-PERSON, O.; PERSON, B.; SZOMSTEIN, S.; ROSENTHAL, R.J. Nutritional deficiencies in morbidly obese patients: a new form of malnutrition? Part B: minerals. **Obes Surg**, v. 18, p. 1028-1034, 2008.
- KALUPAHANA, N.S.; CLAYCOMBE, K.J.; MOUSTAID-MOUSSA, N. (n-3) fatty acids alleviate adipose tissue inflammation and insulin resistance: mechanistic insights. **Adv Nutr**, v. 2, p. 304-316, 2011.
- KASUGA, M. Insulin resistance and pancreatic β cell failure. **J Clin Invest**, v. 116, p. 1756-1760, 2006.
- KIESS, W.; BÖTTNER, A.; RAILE, K.; KAPELLEN, T.; MÜLLER, G.; GALLER, A.; PASCHKE, R.; WABITSCH, M. Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents: a review from a Europe perspectives. **Horm Res**, v. 59, p. 77-84, 2003. (suppl 1)

KIM, D.J.; XUN, P.; LIU, K.; LORIA, C.; YOKOTA, K.; JACOBS-JR, D.R.; HE, K. Magnesium intake in relation to systemic inflammation, insulin resistance, and the incidence of diabetes. **Diabetes Care**, v. 33, p. 2604-2610, 2010.

KIRII, K.; ISO, H.; DATE, C.; FUKUI, M.; TAMAKOSHI, S.; JACC STUDY GROUP. Magnesium intake and risk of self-reported type 2 diabetes among Japanese. **J Am Coll Nutr**, v. 29, 99-106, 2010.

LA FLEUR, S.E.; VANDERSCHUREN, L.J.M.J.; LUIJENDIJK, M.C.; KLOEZE, B.M.; TIESJEMA, B.; ADAN, R.A.H. A reciprocal interaction between food-motivated behavior and diet-induced obesity. **Internat J Obes**, v. 31, p. 1286–1294, 2007.

LECUBE, A.; BAENA-FUSTEGUERAS, J.A.; FORT, J.M.; PELEGRÍ, D.; HERNÁNDEZ, C.; SIMÓ, R. Diabetes is the main factor accounting for hypomagnesemia in obese subjects. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e30599, 2012.

LEE, Y.S.; LI, P.; HUH, J.Y.; HWANG, I.J.; LU, M.; KIM, J.I.; HAM, M.; TALUKDAR, S.; CHEN, A.; LU, W.J.; BANDYOPADHYAY, G.K.; SCHWENDENER, R.; OLEFSKY, J.; KIM, J.B. Inflammation is necessary for long-term but not short-term high-fat diet – induced insulin resistance. **Diabetes**, v. 60, p. 2474-2483, 2011.

LERMA, A.; PLANELLS, E.; ARANDA, P.; LLOPIS, J. Effect of magnesium deficiency on fatty acid composition of the erythrocyte membrane and plasma lipid concentration in rats. **J Nutr Biochem**, v. 6, p. 577-81, 1995.

LIBMAN, I.; ARSLANIAN, S. Type 2 diabetes in childhood: the American perspective. **Horm Res**, v. 59, p. 69-76, 2003.

LIMA, M.L.; CRUZ, T.; RODRIGUES, L.E.; BOMFIM, O.; MELO, J.; CORREIA, R.; PORTO, M.; CEDRO, A.; VICENTE, E. Serum and intracellular magnesium deficiency in patients with metabolic syndrome – evidences for its relation to insulin resistance. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 83, n. 2, p. 257-262, 2009.

LIN, Y.; SUN, Z. Current views on type 2 diabetes. **J Endocrinol**, v. 204, n.1, p. 1-11, 2010.

LOURENÇO, B.H.; VIEIRA L.P.; MACEDO, A.; NAKASATO, M.; MARUCCI, M.F.; BOCCHI, E.A. Nutritional status and adequacy of energy and nutrient intakes among heart failure patients. **Arq Bras Cardiol**, v. 93, n. 5, p. 501-7, 2009.

MAHFOUZ, M.M.; KUMMEROW, F.A. Effect of magnesium deficiency on $\Delta 6$ desaturase activity and fatty acid composition of rat liver microsomes. **Lipids**, v. 24, p. 727-32, 1989.

MAK, I.T.; DICKENS, B.F.; KOMAROV, A.M.; WAGNER, T.L.; PHILLIPS, T.M.; WEGGLICKI, W.B. Activation of the neutrophils and loss of plasma glutathione during Mg-deficiency – modulation by nitric oxide synthase inhibition. **Mol Cell Biochem**, v. 176, p. 35-39, 1997.

MARI, E.T.L. **Análises uni e multivariada na avaliação do estado nutricional de atletas de pólo aquático feminino: enfoque em minerais**. 97 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana Aplicada) - FCF/FEA/FSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MAZUR, A.; MAIER, J.A.M.; ROCK, E.; GUEUX, E.; NOWACKI, W. RAYSSINGUIER, Y. Magnesium and the inflammatory response: potential physiopathological implications. **Arch Biochem Biophys**, v. 458, p. 48-56, 2007.

MOLES, K.W.; MCMULLEN, J.K. Insulin resistance and hypomagnesaemia: case report. **Brit Med J**, v. 285, p. 262, 1982.

MORRELL, J.S.; LOFGREN, I.E.; BURKE, J.D.; REILLY, R.A. Metabolic syndrome, obesity, and related risk factors among college men and women. **J Am Coll Health**, v. 60, n. 1, p. 82-89, 2012.

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. **Biochim Biophys Acta**, v. 1257, p. 125-32, 1995.

PICKERING, C.; ALSIÖ, J.; HULTING, A.L.; SCHIÖTH, H.B. Withdrawal from free-choice high-fat high-sugar craving only in obesity-prone animals. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 204, n. 3, p. 431-443, 2009.

PINHEIRO, M.M.; SCHUCH, N.J.; GENARO, P.S.; CICONELLI, R.M.; FERRAZ, M.B.; MARTINI, L.A. Nutrient intakes related to osteoporotic fractures in men and women - The Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). **Nutr J**, v. 8, n. 6, 2009. doi:10.1186/1475-2891-8-6.

RAYSSIGUIER, Y.; GUEUX, E.; WEISER, D. Effect of magnesium deficiency on lipid metabolism in rats fed a high carbohydrate diet. **J Nutr**, v. 111, p. 1876-83, 1981.

RAYSSIGUIER, Y.; GUEUX, E.; NOWACKI, W.; ROCK, E.; MAZUR, A. High fructose consumption combined with low dietary magnesium intake may increase the incidence of the metabolic syndrome by inducing inflammation. **Magnes Res**, v. 19, n. 4, p. 237-243, 2006.

RIBEIRO FILHO, F.F.; MARIOSA, L.S.; FERREIRA, S.R.G.; ZANELLA, M.T. Gordura visceral e síndrome metabólica: mais que uma simples associação. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 50, n. 2, p. 230-238, 2006.

RIBEIRO, B.G.; SOARES, E.A. Avaliação do estado nutricional de atletas de ginástica olímpica do Rio de Janeiro e São Paulo. **Rev Nutr**, v. 15, n. 2, p. 181-91, 2002.

RODEN, M. How free fatty acids inhibit glucose utilization in human skeletal muscle. **News Physiol Sci**, v. 19, p. 92-96, 2003.

ROCHA, V.S.; LAVANDA, I. NAKANO, E.Y.; RUANO, R.; ZUGAIB, M.; COLLI, C. Calcium and magnesium status is not impaired in pregnant women. **Nutr Res**, v. 32, n. 7, p. 542-6, 2012.

ROSANOFF, A.; SEELING, M.S. Comparison of mechanism and functional effects of magnesium and statin pharmaceuticals. **J Am Coll Nutr**, v. 23, n. 5, p. 501S-505S, 2004.

SAJAN, M.P.; FARESE, R.V. Insulin signaling in hepatocytes of humans with type 2 diabetes: excessive production and activity of protein kinase C- α (PKC- α) and dependent processes and reversal by PKC- α inhibitors. **Diabetologia**, v. 55, n. 5, p. 1446-57, 2012.

SALES, C.H. **Avaliação do status de magnésio em pacientes com diabetes mellitus tipo 2**. 2008. 180 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SALES, C.H.; PEDROSA, L.F.C. Magnesium and diabetes mellitus: their relation. **Clin Nutr**, v. 25, p. 554-62, 2006.

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. **Clin Nutr**, v. 30, p. 359-364, 2011.

SAM, S.; HAFFNER, S.; DAVIDSON, M.H.; DAVIDSON, M.H.; D'AGOSTINO, R.B.; FEINSTEIN, S.; KONDOS, G.; PEREZ, A.; MAZZONE, T. Relation of abdominal fat depots to systemic markers of inflammation in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 32, p. 932-937, 2009.

SARIS, N.E.L.; MERVAALA, E.; KARPPANEM, H.; KHAWAJA, J.A.; LEWENSTAM, A. Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects. **Clin Chim Acta**, v.294, p. 1-26, 2000.

SETARO, L. **Efeito da suplementação com magnésio no desempenho físico em atletas de voleibol profissional**. 95 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – FCF/FEA/FSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SMITH, J.D.; BOREL, A.L.; NAZARE, J.A.; HAFFNER, S.M.; BALKAU, B.; ROSS, R.; MASSIEN, C.; ALMÉRAS, N.; DESPRÉS, J.P. Visceral adipose tissue indicates the severity of cardiometabolic risk in patients with and without type 2 diabetes: results from the INSPIRE ME IAA study. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 97, n. 5, p. 1517-25, 2012.

SOLINAS, G.; KARIN, M. JNK1 and IKK β : molecular links between obesity and metabolic dysfunction. **FASEB J**, v. 24, p. 2596-2611, 2010.

SOMA, M.; CUNNANE S.C.; HORROBIN, D.F.; MANKU, M.S.; HONDA, M.; HATANO, M. Effects of low magnesium diet on the vascular prostaglandin and fatty acid metabolism in rats. **Prostaglandins**, v. 36, n. 4, p. 431-41, 1988.

SONG, Y.; RIDKER, P.M.; MANSON, J.E.; COOK, N.R.; BURING, J.E.; LIU, S. Syndrome in middle-aged and older U.S. women. **Diabetes Care**, v. 28, p. 1438-1444, 2005.

SUÁREZ, A.; PULIDO, N.; CASLA, A.; CASANOVA, B.; ARRIETA, F.J.; ROVIRA, A. Impaired tyrosine-kinase activity of muscle insulin receptors from hypomagnesemic rats. **Diabetologia**, v. 38, p. 1262-70, 1995.

TAKAYA, J.; HIGASHINO, H.; KOBAYASHI, Y. Intracellular magnesium and insulin resistance. **Magnes Res**, v. 17, n. 2, p. 126-136, 2004.

VASKONEN, T. Dietary minerals and modification of cardiovascular risk factors. **J Nutr Biochem**, v. 14, n. 9, p. 492-506, 2003.

VENU, L.; HARISHANKAR, N.; KRISHNA, T.P.; RAGHUNATH, M. Does maternal dietary mineral restriction per se predispose the offspring to insulin resistance? **Eur J Endocrinol**, v. 151, p. 287-294, 2004.

VENU, L.; KISHORE, Y.D.; RAGHUNATH, M. Maternal and perinatal magnesium restriction predisposes rat pups to insulin resistance and glucose intolerance. **J Nutr**, v. 135, p. 1353-1358, 2005.

VENU, L.; PADMACATHI, I.J.N.; KISHIRE, Y.D.; BHANU, N.V.; RAO, K.R.; SAINATH, P.B.; GANESHAN, M.; RAGHUNATH, M. Long-term effects of maternal magnesium restriction on adiposity and insulin resistance in rat pups. **Obesity**, v. 16, p. 1270-1276, 2008.

WITHERS, D.J.; GUTIERREZ, J.S.; TOWERY, H.; BURKS, D.J.; REN, J.M.; PREVIS, S.; ZHANG, Y.; BERNAL, D.; PONS, S.; SHULMAN, G.L.; BONNER-WEIR, S.; WHITE, M.F. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. **Nature**, v. 391, p. 900-904, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity and overweight**. Genebra, 2011. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Acesso em: 18 jan 2012

TRABALHO EXPERIMENTAL

ENSAIO PRINCIPAL

“El deseo de aliviar o prevenir los males á que está sujeto el hombre desde que nace, ha creado el arte por el cual se conocen en la naturaleza las sustancias que simples o mezcladas, puras o modificadas pueden servir de remedio.”

Charles Louis Cadet de Gassicourt

Considerações iniciais

Após realização de ensaio piloto (**Apêndice C**), desenvolvido no intuito de avaliar os efeitos de uma ração comercial obesogênica (hiperlipídica), neste ensaio introduzimos em nossos experimentos a deficiência de magnésio, cerne desse trabalho, com o objetivo de avaliar, em ratos *Wistar* em crescimento, os efeitos do consumo da dieta hiperlipídica e deficiente em magnésio sobre o *status* deste mineral, a resistência insulínica, o perfil lipídico e o *status* inflamatório e oxidativo.

Com base nos resultados do ensaio piloto, em que o ajuste de nutrientes da dieta resultou em consumo de minerais superior ao esperado, optou-se por trabalhar com grupos controle *pair-feeding* aos hiperlipídicos para equiparar o consumo de proteína e de micronutrientes, como uma forma de melhor controlar o ensaio. A princípio haviam sido delimitados dois grupos *pair-feeding* para cada grupo hiperlipídico, porque a deficiência de magnésio poderia levar a maiores restrições de consumo; no entanto, como não foram observadas diferenças estatísticas entre os controles *pair-feeding* nos parâmetros avaliados, agruparam-se os animais dos dois grupos *pair-feeding* em um só grupo.

Os dados deste ensaio são apresentados na forma de artigo, segundo as normas da revista *Clinical Nutrition*. No **Apêndice D** é apresentada a metodologia usada com mais detalhes, e nos **Apêndices H, I e J** são apresentados resultados complementares.

Dieta hiperlipídica e deficiente em magnésio: efeito na adiposidade, no perfil lipídico e na sensibilidade à insulina de ratos em crescimento

Título curto: dieta hiperlipídica e deficiente em magnésio

Referências

1. Suárez A, Pulido N, Casla A, Casanova B, Arrieta FJ, Rovira A. Impaired tyrosine-kinase activity of muscle insulin receptors from hypomagnesemic rats. *Diabetologia* 1995; 38: 1262-70.
2. Chaudhary DP, Boparai RK, Sharma R, Bansal DD. Studies on the development of an insulin resistant rat model by chronic feeding of low magnesium high sucrose diet. *Magnes Res* 2004; 17(4): 293-300.
3. Venu L, Harishankar N, Krishna TP, Raghunath M. Does maternal dietary mineral restriction *per se* predispose the offspring to insulin resistance? *Eur J Endocrinol* 2004; 151: 287-94.
4. Sales CH, Pedrosa LFC, Lima JG, Lemos TMAM, Colli C. Influence of magnesium status and magnesium intake on the blood glucose control in patients with type 2 diabetes. *Clin Nutr* 2011; 30: 359-64.
5. Nielsen FH, Milne DB, Klevay LM, Gallagher S, Johnson L. Dietary magnesium deficiency induces heart rhythm changes, impairs glucose tolerance, and decreases serum cholesterol in post menopausal women. *J Am Coll Nutr* 2007; 26(2): 121-32.
6. Huerta MG, Roemmich JN, Kington ML, Bovbjerg VE, Weltman AL, Holmes VF, Patrie JT, Rogol AD, Nadler JL. Magnesium deficiency is associated with insulin resistance in obese children. *Diabetes Care* 2005; 28: 1175-81.
7. Takaya J, Higashino H, Kotera F, Kobayashi Y. Intracellular magnesium of platelets in children with diabetes and obesity. *Metabolism* 2003; 52(4): 468-71.
8. Takaya J, Yamato F, Kuroyanagi Y, Higashino H, Kaneko K. Intracellular magnesium of obese and type 2 diabetes mellitus children. *Diabetes Ther* 2010; 1(1): 25-31.
9. Çelik N, Andiran N, Yilmaz AE. The relationship between serum magnesium levels with childhood obesity and insulin resistance: a review of the literature. *J Pediatr Endocr Met* 2011; 24(9-10): 675-8.

10. Rosanoff A, Weaver CM, Rude R. Suboptimal magnesium status in the United States: are the health consequences underestimated? *Nutr Rev* 2012; 70(3):153-64.
11. Colli C, Sales CH, Rocha VS. Assessment of magnesium status. In: Berhardt LV. Ed. *Advances in medicine and biology*. Hauppauge: Nova Science Publishers Inc, 2013; 40: 191-216.
12. Pham PC, Pham PM, Pham PT, Pham SV, Pham PA, Pham PT. The link between lower serum magnesium and kidney function in patients with diabetes mellitus type 2 deserves a closer look. *Clin Nephrol* 2009; 71: 375-9.
13. Chaudhary DP, Boparai RK, Bansal DD. Effect of a low magnesium diet on in vitro glucose uptake in sucrose fed rats. *Magnes Res* 2007; 20 (3): 187-95.
14. Boparai RK, Kiran R, Bansal DD. Insinuation of exacerbated oxidative stress in sucrose-fed rats with a low dietary intake of magnesium: evidence of oxidative damage to proteins. *Free Radic Res*. 2007; 41(9): 981-9. doi: 10.1080/10715760701447892
15. Rayssiguier Y, Gueux E, Weiser D. Effect of magnesium deficiency on lipid metabolism in rats fed a high carbohydrate diet. *J Nutr* 1981; 111: 1876-83.
16. Venu L, Kishore YD, Raghunath M. Maternal and perinatal magnesium restriction predisposes rat pups to insulin resistance and glucose intolerance. *J Nutr* 2005; 135: 1353-8.
17. Venu L, Padmavathi IJN, Kishore YD, Bhanu NV, Rao KR, Sainath PB, Ganeshan M, Raghunath M. Long-term effects of maternal magnesium restriction on adiposity and insulin resistance in rat pups. *Obesity* 2008; 16: 1270-6.
18. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer C. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity* 2007; 15(4): 708-808.
19. Cintra DE, Ropelle ER, Moraes KC, Pauli JR, Morari J, De Souza CT, Grimaldi R, Stahl M, Carnevalheira JB, Saad MJ, Velloso LA. Unsaturated fatty acids revert diet-

induced hypothalamic inflammation in obesity. Plos One 2012; 7(1): e30571.

doi:10.1371/journal.pone.0030571

20. Blaedel M, Raun K, Boonen HCM, Sheykhzade M, Sams A. Early onset inflammation in pre-insulin-resistant diet-induced obese rats does not affect the vasoreactivity of isolated small mesenteric arteries. Pharmacology. 2012; 90(3-4): 125-32.
21. de Moura LP, Dalia RA, de Araújo MB, Sponton ACS, Pauli JR, Moura RF, *et al.* Alterações bioquímicas e hepáticas em ratos submetidos à uma dieta hiperlipídica/hiperenergética. Rev Nutr 2012; 25(6): 685-93.
22. Neter, J.; Kutner, M.; Nachtsheim, C.J.; Li, W. Applied linear statistical models. 5th edn. New York: McGraw-Hill/Irwin, 2004.
23. Reeves P, Nielsen F, Fahey Jr G. 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. J Nutr 1993; 123(2): 1939-51.
24. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists. 18th edn. Maryland: Current through Revision 1, 2006.
25. Fiske CH, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. J Biol Chem 1925; 66: 375-400.
26. Donato Jr J, Pedrosa RG, Cruzat VF, Pires ISO, Chem B, Tirapegui J. Effects of leucine supplementation on the body composition and protein status of rats submitted to food restriction. Nutr 2006; 22: 520-7.
27. Matthews D, Hosker J, Rudenski A, Naylor B, Treacher D, Turner R. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia 1985; 28: 412-9.

28. Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Schölmerich J, Bollheimer LC. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol* 2006; 36:485-501.
29. Legrand C, Okitolonda W, Pottier AM, Lederer J, Henquin JC. Glucose homeostasis in magnesium-deficient rats. *Metabolism* 1987; 36(2): 160-4.
30. Malpuech-Brugère C, Nowacki W, Daveau M, Gueux E, Linard C, Rock E, *et al.* Inflammatory response following acute magnesium deficiency in the rat. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1501(2-3): 91-8.
31. Dourmashkin JT, Chang GQ, Gayles EC, Hill JO, Fried SK, Julien C, Leibowitz SF. Different forms of obesity as a function of diet composition. *Int J Obes* 2005; 29:1368-78.
32. Mazur A, Maier JAM, Rock E, Gueux E, Nowacki W, Rayssiguier Y. Magnesium and the inflammatory response: potential physiopathological implications. *Arch Biochem Biophys* 2007; 458: 48-56.
33. Tadayyon B, Lutwak L. Interrelationship of triglycerides with calcium, magnesium and phosphorus in the rat. *J Nutr* 1969; 97:246-54.
34. Nielsen FH. Dietary fatty acid composition alters magnesium metabolism, distribution, and marginal deficiency response in rats. *Magnes Res* 2009; 22(4):280-8.
35. Wells IC. Evidence that the etiology of the syndrome containing type 2 diabetes mellitus results from abnormal magnesium metabolism. *Can J Physiol Pharmacol* 2008; 86:16-24.
36. Lartigue G, de la Serre CB, Espero E, Lee J, Raybould HE. Leptin resistance in vagal afferent neurons inhibits cholecystokinin signaling and satiation in diet induced obese rats. *Plos One* 2012; 7(3): e32967. doi:10.1371/journal.pone.0032967
37. Pantaleão LC, Teodoro GFR, Torres-Leal FL, Vianna D, de Paula TD, de Matos-Neto EM, *et al.* Maternal postnatal high-fat diet, rather than gestational diet, affects

morphology and mTOR pathway in skeletal muscle of weaning rat. J Nutr Biochem 2013.

38. Zecchin HG, Carvalhera JBC, Saad MJA. Mecanismos moleculares de resistência à insulina na síndrome metabólica. Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo 2004; 14(4): 574-89.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Que sigamos buscando os efeitos do 'pó do conde de Palma'!

Considerações finais

O ensaio piloto serviu para definirmos melhor o delineamento do ensaio principal, e, por outro lado, reforçou a importância de se avaliar as dietas experimentais, a fim de se obter resultados reprodutíveis e confiáveis.

No ensaio principal pudemos inferir que a presença da deficiência de magnésio associada à dieta hiperlipídica, a qual é tida como uma dieta obesogênica, pode anteceder eventos comuns à obesidade e a síndrome metabólica, especificamente na via de sinalização de insulina, e assim piorar a resistência insulínica, e aumentar o risco de morbidades.

O fato de não ter havido alteração no *status* inflamatório e oxidativo, que eventualmente se deu pelo curto período de tempo do ensaio, que simula algo mais agudo, não nos permite afirmar que não estejam havendo alterações em nível molecular que modulem a inflamação e o estresse (supressão ou ativação de proteínas e/ou da expressão gênica), e que possam contribuir para a menor sensibilidade à insulina, identificada em nível molecular nos animais dos grupos hiperlipídicos.

O laboratório atualmente tem o propósito de seguir investigando os efeitos da deficiência de magnésio na gênese de processos envolvidos na obesidade (síndrome metabólica), em diferentes modelos experimentais, e sua associação com outros minerais, como o ferro.

A avaliação *in vitro* dos efeitos da deficiência e da suplementação de magnésio em adipócitos e em células β -pancreáticas podem dar maior suporte as hipóteses aqui testadas, podendo ser avaliados mecanismos que auxiliem na compreensão das alterações que ocorrem nestas síndromes – obesidade e síndrome metabólica –, e dar mais ferramentas que possam subsidiar estudos em humanos, bem como a aplicação desse conhecimento na prática clínica e em nível de saúde pública.

A ação do magnésio vem despertando cada vez mais interesse na comunidade científica, e, por outro lado, não se tem tanto embasamento de como está o consumo deste mineral em alguns países. No Brasil, estudos pontuais apontam que o nosso panorama não difere muito dos demais países, cuja baixa ingestão de magnésio já é considerada um problema, e um possível fator associado ao aumento de doenças crônicas não transmissíveis.

Com nosso primeiro trabalho no âmbito da avaliação do status de magnésio em pacientes com diabetes tipo 2, já tivemos a oportunidade de apresentar as autoridades públicas e a comunidade científica um problema que pode ser recorrente aqui no Brasil, e que pode estar contribuindo para as morbidades e mortalidades constatadas em nosso país. Esperamos continuar avançando nessa área de conhecimento, para, quem sabe, ver sua aplicação prática, e, assim, o objetivo maior deste trabalho foi cumprido.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Capítulo publicado no livro *Advances in medicine and biology* (v. 40), organizado por Leon V. Berhardt. p. 191-216.

APÊNDICE B - Capítulo publicado no livro *Bioquímica da nutrição, nas diferentes fases da vida, na saúde e na doença*, organizado por Cristiane Cominetti e Silvia Maria Franciscato Cozzolino. Cap. 9, p. 213-227.

APÊNDICE C - Ensaio piloto.

Artigo escrito segundo as normas da revista *Biological Trace Element Research*

Efeito em curto tempo do consumo de dieta hiperlipídica comercial no *status* de magnésio e na sensibilidade insulínica de ratos Wistar em crescimentos: estudo piloto

Título curto: Consumo de dieta hiperlipídica e status de magnésio

Apresentação em conferência

Parte deste estudo foi apresentada no 11th *European Nutrition Conference* - FENS (Madri, Espanha, outubro de 2011).

SALES, C.H.; GAIEVSKI, E.H.S.; LOBO, A.R.; SANTOS, L.A.S.; COLLI, C. Effects of high-fat diet on magnesium status and insulin sensitivity in rats. In: 11th European Nutrition Conference FENS, 2011, Madri. **Annals of Nutrition & Metabolism**. Basel: Karger Medical and Scientific Publishers, 2011. v. 58. p. 82-83.

Referências bibliográficas

1. Kiess W, Böttner A, Raile K, Kapellen T, Müller G, Galler A, Paschke R, Wabitsch M (2003) Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents: a review from a Europe perspectives. *Horm Res* 59:77-84. (suppl 1)
2. Libman I, Arslanian S (2003) Type 2 diabetes in childhood: the American perspective. *Horm Res* 59:69-76.
3. Kaidar-Person O, Person B, Szomstein S, Rosenthal RJ (2008) Nutritional deficiencies in morbidly obese patients: a new form of malnutrition? Part B: minerals. *Obes Surg* 18:1028-34.
4. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer C (2007) High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity* 15(4):708-808.
5. Speakman J, Hambly C, Mitchell S, Król E. The contribution of animal models to the study of obesity. *Lab Anim*. 2008 Oct;42(4):413-32
6. Suárez A, Pulido N, Casla A, Casanova B, Arrieta FJ, Rovira A (1995) Impaired tyrosine kinase activity of muscle insulin receptors from hypomagnesaemic rats. *Diabetologia* 38:1262-70.
7. Chaudhary DP, Boparai RK, Bansal DD. Effect of a low magnesium diet on in vitro glucose uptake in sucrose fed rats. *Magnes Res* 2007; 20 (3): 187-95.
8. Colli C, Sales CH, Rocha VS (2013) Assessment of magnesium status. In: Berhardt LV (ed) *Advances in medicine and biology*. Nova Science Publishers Inc, Hauppauge, v.40, pp 191-216.
9. Smith GP (2000) The controls of eating: a shift from nutritional homeostasis to behavioral neuroscience. *Nutr* 16:814-20.
10. Mazur A, Maier JAM, Rock E, Gueux E, Nowacki, W (2007) Rayssinguier, Y. Magnesium and the inflammatory response: potential physiopathological implications. *Arch Biochem Biophys* 458:48-56.

11. Tadayyon B, Lutwak L (1969) Interrelationship of triglycerides with calcium, magnesium and phosphorus in the rat. *J Nutr* 97:246-54.
12. Nielsen FH (2009) Dietary fatty acid composition alters magnesium metabolism, distribution, and marginal deficiency response in rats. *Magnes Res* 22(4):280-8.
13. Wells IC (2008) Evidence that the etiology of the syndrome containing type 2 diabetes mellitus results from abnormal magnesium metabolism. *Can J Physiol Pharmacol* 86:16-24.
14. Reeves P, Nielsen F, Fahey Jr G (1993) 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. *J Nutr* 123(2):1939-51.
15. Association of Official Analytical Chemists (2006) Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists. 18. ed. Maryland, Current through Revision 1.
16. Donato Jr J, Pedrosa RG, Cruzat VF, Pires ISO, Chem B, Tirapegui J (2006) Effects of leucine supplementation on the body composition and protein status of rats submitted to food restriction. *Nutr* 22:520-7.
17. Cintra DE, Ropelle ER, Moraes KC, Pauli JR, Morari J, De Souza CT, Grimaldi R, Stahl M, Carnevali JB, Saad MJ, Velloso LA (2012) Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *Plos One* 7(1):e30571.
18. Lundbaek K (1962) Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. *Br Med J* 3:1507-13.
19. Ward WE, Kim S, Bruce WR (2003) A western-style diet reduces bone mass and biomechanical bone strength to a greater extent in male compared with female rats during development. *Brit J Nutr* 90:589-95.
20. Xu RY, Wan YP, Tang QY, Wu J, Cai W (2008) The effects of high fat on central appetite genes in *Wistar* rats: a microarray analysis. *Clin Chim Acta* 397:96-100.

21. Banas SM, Rouch C, Kassis N, Markaki EM, Gerozissis K (2009) A dietary fat excess alters metabolic and neuroendocrine responses before the onset of metabolic diseases. *Cell Mol Neurobiol* 29:157-168.
22. Jacqmain M, Doucet E, Després JP, Bouchard C, Tremblay A (2003) Calcium intake, body composition, and lipoprotein-lipid concentrations in adults. *Am J Clin Nutr* 77:1448-1452.
23. Parikh SJ, Yanovski JA (2003) Calcium intake and adiposity. *Am J Clin Nutr* 77:281-7.
24. Dos Santos LC, Cintra IP, Fisberg M, Martini LA (2008) Calcium intake and its relationship with adiposity and insulin resistance in post-pubertal adolescents. *J Hum Nutr Diet* 21:109-16.
25. Loss RJF, Rankinen T, Leon AS, Skinner KS, Wilmore JH, Rao DC, Bouchard C (2004) Calcium intake is associated with adiposity in black and white men and women of the HERITAGE family study. *J Nutr* 134(7):1772-8.
26. Yanovski JA, Parikh SJ, Yanoff LB, Denkinger BI, Calis KA, Reynolds JC, Sebring NG, Mchugh T (2009) Effects of calcium supplementation on body weight and adiposity in overweight and obese adults. A randomized trial. *Ann Intern Med* 150:821-99.
27. Renaud S, Ciavatti M, Thevenon C, Ripoll JP (1983) Protective effects of dietary calcium and magnesium on platelet function and atherosclerosis in rabbits fed saturated fat. *Atherosclerosis* 47:187-98.
28. Scholz-Ahrens Ke, Schrezenmeir J (2006) Milk minerals and the metabolic syndrome. *Int Dairy J* 16:1399-407.
29. Zemel MB, Shi H, Greer B, Dirienzo D, Zemel PC (2000) Regulation of adiposity by dietary calcium. *FASEB J* 14:1132-8.
30. Vaskonen T (2003) Dietary minerals and modification of cardiovascular risk factors. *J Nutr Biochem* 14(9):492-506.
31. Mccarty MF (2005) Magnesium may mediate the favorable impact of whole grains on insulin sensitivity by acting as a mild calcium antagonist. *Med Hypotheses* 64:619-27.

32. Parra P, Bruni G, Palou A, Serra F (2008) Dietary calcium attenuation of body fat gain during high-fat feeding in mice. *J Nutr Biochem* 19:109-17.
33. Pérez-Gallardo L, Gómez M, Parra P, Sánchez J, Palou A, Serra F (2009) Effect of calcium-enriched high-fat diet on calcium, magnesium and zinc retention in mice. *Brit J Nutr* 101:1463-6.
34. Ferrari G, Lambertini P, Manzini D, Marchetti A, Sighinolfi S, Della Casa G (2007) Evaluation of the oxidation state and metal concentration in the adipose tissue of Parma ham. *Meat Sci* 75:337-42.
35. Dourmashkin JT, Chang GQ, Gayles EC, Hill JO, Fried SK, Julien C, Leibowitz SF (2005) Different forms of obesity as a function of diet composition. *Int J Obes* 29:1368-78.
36. Takaya J, Higashino H, Kobayashi Y (2004) Intracellular magnesium and insulin resistance. *Magnes Res* 17(2):126-36.
37. Storlien LH, Kriketos AD, Jenkins AB, Baur LA, Pan DA, Tapsell LC, Calvert GD (1997) Does dietary fat influence insulin action? *Ann N Y Acad Sci* 827:287-301.
38. Wilkes JJ, Bonen A, Bell RC (1998) A modified high-fat diet induces insulin resistance in rat skeletal muscle but not adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 275:E679-86.
39. Briaud I, Kelpie CL, Johnson LM, Tran PO, Poitout V (2002) Differential effects of hyperlipidemia on insulin secretion in islets of Langerhans from hyperglycemic versus normoglycemic rats. *Diabetes* 51:662-8.
40. La Fleur S, Vanderschuren LJMJ, Luijendick MC, Loeze BM, Tiesjema B, Adan RAH (2007) A reciprocal interaction between food-motivated behavior and diet-induced obesity. *Intern J Obes* 31:1286-94.
41. Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Schölmerich J, Bollheimer JC (2006) Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol* 36:485-501.

42. Pickering C, Alsiö J, Hulting AL, Schiöth HB (2009) Withdrawal from free-choice high-fat high-sugar craving only in obesity-prone animals. *Psychopharmacology (Berl)* 204(3):431-43.
43. Roden M (2003) How free fatty acids inhibit glucose utilization in human skeletal muscle. *News Physiol Sci* 19:92-96.
44. Morrell JS, Lofgren IE, Burke JD, Reilly RA (2012) Metabolic syndrome, obesity, and related risk factors among college men and women. *J Am Coll Health* 60(1): 82-9.

APÊNDICE D - Detalhamento da metodologia utilizada na execução da tese

1 Material e métodos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (Protocolo CEEA nº 2009/221)³, e seguiu os princípios adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

A princípio foi realizado um ensaio piloto para avaliar a resposta dos animais a ração hiperlipídica formulada, e em seguida foi realizado o ensaio principal, em que a redução da oferta de magnésio foi associada à dieta hiperlipídica, e se incluiu um grupo *pair feeding*.

1.1 Animais e delineamento experimental

Ratos (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*) machos da linhagem *Wistar Hannover*, heterogênicos, recém desmamados, pesando cerca de 50 g ($48,3 \pm 7,6$ g: ensaio piloto; $52,0 \pm 3,6$ g: ensaio principal), provenientes do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo – USP, foram agrupados, aleatoriamente, após aclimação de 7 dias, em grupos experimentais: 1) *ENSAIO PILOTO* – controle (n = 6) e hiperlipídico (n = 6) (**Figura D- 1**); 2) *ENSAIO PRINCIPAL* – controle *ad libitum* (G1, n = 8), controle com alimentação pareada em gramas aos hiperlipídicos [controle *pair feeding*] (G2, n = 16)⁴, hiperlipídico (G3, n = 12) e hiperlipídico deficiente em magnésio (G4, n = 12) (**Figura D-2**). Os animais foram alojados individualmente, em gaiolas semimetabólicas de aço inoxidável e mantidos a 22 ± 2 °C, com 50 a 60 % de umidade, e ciclo claro de 7 as 19 h. Ração e água desmineralizada foram ofertadas *ad libitum*, sendo realizado o monitoramento diário, e os animais pesados a cada dois dias. Diariamente se observou ainda se os animais apresentavam algum sinal relacionado à deficiência de magnésio, como

³ Aprovação no **Anexo A**.

⁴ A princípio havia sido estabelecido um grupo pareado para cada grupo hiperlipídico, uma vez que a deficiência de magnésio poderia alterar o consumo, mas em virtude de não ter havido diferença entre o consumo de ração e água entre os grupos pareados, e entre os grupos hiperlipídicos, agrupou-se os animais dos grupos pareados em um único grupo pareado.

presença de hiperemia das orelhas e pés, hiperirritabilidade, convulsão, alopecia, lesões na pele e edema.⁵

Parâmetros avaliados antes* e após as eutanásias:

Resistência insulínica: <ul style="list-style-type: none"> - teste de tolerância à insulina* - insulina sérica - glicose sérica 	Peroxidação lipídica / estresse oxidativo / perfil lipídico: <ul style="list-style-type: none"> - malondialdeído hepático - atividade da glutathione peroxidase - perfil de ácidos graxos hepáticos
Obesidade: <ul style="list-style-type: none"> - peso* - % de gordura corporal 	Magnésio: <ul style="list-style-type: none"> - Mg ósseo - Mg muscular - Mg plasmático - Mg eritrocitário - Mg urinário* - Mg fecal*
Lipídios fecais	Marcadores séricos de inflamação: <ul style="list-style-type: none"> - interleucina 6 - interleucina 1β - fator de necrose tumoral α - inibidor do ativador de plasminogênio 1 total - proteína C reativa

Figura D- 1 - Delineamento experimental: ENSAIO PILOTO

⁵ Formulário usado consta no **Apêndice E**

Figura D- 2 - Delineamento experimental: ENSAIO PRINCIPAL

Na semana anterior às eutanásias, foi realizado o teste de tolerância à insulina, e os animais transferidos para gaioleiros metabólicos, durante 24 h, para coleta de urina e de fezes, para dosagem de magnésio. No ensaio piloto, os animais foram mantidos por quatro dias nos gaioleiros metabólicos para avaliação do balanço mineral. Durante o períodos em que os animais ficaram nas gaiolas metabólicas, diariamente foi avaliado o volume urinário, separado alíquota para dosagem de creatinina, e o restante da urina foi acidificado (pH 1 a 2) com ácido clorídrico (HCl) 3 mol/L e posteriormente armazenado a -

80 °C. As amostras de fezes foram separadas de qualquer conteúdo de pelo ou ração eventualmente presentes, e armazenadas a -20 °C, até análise.

Concluídos os períodos experimentais, após jejum de 12 a 14 h, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal, com dose de 0,2 mL/kg de peso corporal de solução anestésica de – xilazina (25 mg/kg; Virbaxil 2 %, Virbac, São Paulo, Brasil) e quetamina (10 mg/kg; Vetaset, Fort Dodge, Iowa, EUA) (1:2; v/v). Na ausência de reflexo de pinçamento plantar, o abdômen foi aberto por incisão na linha média, cortados um fragmento de fígado para quantificação das proteínas IR, IRS-1 e Akt, os quais foram colocados imediatamente em nitrogênio líquido. Para análise da ativação dessas mesmas proteínas, administrou-se, pela veia cava, 0,75 U de insulina/kg de peso corporal e, após 30 s, foi coletado outro fragmento de fígado. O sangue foi coletado pela veia porta, e distribuído em tubos com anticoagulante⁶, para quantificação de magnésio, e sem anticoagulante, para as demais dosagens (**Figura D-3**).

Após esses procedimentos, os órgãos foram perfundidos por via intracardiaca com solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,85 % até total exsanguinação. Em seguida, foram dissecados o fígado, os fêmures, as tíbias, os músculos gastrocnêmios, rins e os depósitos adiposos epididimal direito e retroperitoneal direito. Os órgãos dissecados foram removidos de qualquer tecido aderente, pesados, colocados em nitrogênio líquido e depois acondicionados a -80 °C. Ao final, foi feita a limpeza do trato gastrointestinal, que foi devolvido, junto com os depósitos adiposos, ao restante da carcaça, armazenada a -20 °C até análise da composição corporal (**Figura D-3**).

1.1.1 *Tamanho amostral*

A definição do tamanho da amostra baseou-se no estudo de probabilidades de erros envolvidos em testes de hipóteses para comparar as médias dos grupos para uma

⁶ *ENSAIO PILOTO*: 50 UI de heparina sódica/mL de sangue, *ENSAIO PRINCIPAL*: 10 µL de citrato de sódio 30 %/mL de sangue. Não utilizamos o mesmo anticoagulante porque não havia mais disponível para comercialização. Antes da decisão fizemos alguns testes para verificar possíveis diferenças com o uso destes anticoagulantes, não sendo verificadas diferenças nos parâmetros de magnésio. Dados apresentados no **Apêndice F**.

variável de interesse, considerando quatro grupos, e valores de delta e estimativas de desvio padrão (NETER *et al.*, 2004). Para os grupos em que se supôs que poderia haver maior variabilidade, e eventualmente morte de animais, o n foi aumentado. O tamanho amostral foi definido utilizando como variável de interesse a sensibilidade à insulina, e assumindo poder de 80 % e alfa de 5 %.

Figura D- 3 - Fluxograma no dia da eutanásia

1.2 Dietas experimentais

- ENSAIO PILOTO

Durante o período de aclimação foi ofertado dieta controle padrão AIN-93G peletizada (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993), preparada em nosso laboratório. Durante o período experimental foram ofertadas dietas customizadas da empresa *Harlan Teklad Laboratories* (Madison, WI, EUA), as quais eram semipurificadas e peletizadas (**Tabela D-1**). Ambas as dietas foram acondicionadas sob refrigeração (~ 4 °C). As dietas experimentais adquiridas da Harlan, normolipídica (TD.06416) e hiperlipídica (TD.06414), tem como ponto de referência para sua formulação o padrão sugerido pelo AIN (*American Institute of Nutrition*), e são indicadas para estudos de indução de obesidade e síndrome metabólica.

Assumindo-se que o consumo de ração é menor nos grupos que consomem dietas com maior densidade energética, as dietas são formuladas, pela empresa, com maior concentração de nutrientes (proteínas, minerais, vitaminas) para garantir o consumo igual ao do grupo normolipídica, sendo o ajuste feito pela energia.

Tabela D- 1 - Formulação das dietas usadas no ensaio piloto⁷

Ingredientes	Aclimação Padrão AIN 93G*	Dietas Experimentais [†]	
		Normolipídica	Hiperlipídica
caseína [‡] (g/100 g da dieta)	20,00	21,0	26,5
L-cistina (g/100 g da dieta)	0,30	0,30	0,40
amido de milho (g/100 g da dieta)	52,95	28,0	-
maltodextrina (g/100 g da dieta)	-	5,00	16,00
sacarose (g/100 g da dieta)	10,00	32,5	9,00
celulose (g/100 g da dieta)	5,00	3,72	6,50
óleo de soja (g/100 g da dieta)	7,00	2,00	3,00
banha (g/100 g da dieta)	-	2,00	31,00
mistura salina [§] (g/100 g da dieta)	3,50	3,50	4,80
fosfato de cálcio dibásico (g/100 g dieta)	-	0,20	0,34
mistura vitamínica (g/100 g da dieta)	1,00	1,50	2,10
bitartarato de colina [#] (g/100 g da dieta)	0,25	0,28	0,30
antioxidante terc-butil hidroquinona (g/100 g da dieta)	0,0014	-	-

* Dieta formulada em nosso laboratório, utilizada no período de aclimação dos animais

[†] Controle (TD.06416 – adjusted calories diet (10/fat), *Harlan Teklad Laboratories*); hiperlipídica (TD.06414 – adjusted calories diet (60/fat), *Harlan Teklad Laboratories*)

[§] Formulação baseada na AIN-93G-MX (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) sem modificações, sendo feito ajuste na dieta hiperlipídica

^{||} Formulação baseada na AIN-93G-VX (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) sem modificações, sendo feito ajuste na dieta hiperlipídica

- ENSAIO PRINCIPAL

As dietas experimentais usadas no ensaio principal, semipurificadas e peletizadas, foram elaboradas pela empresa *Harlan Teklad Laboratories* (Madison, WI, EUA), de acordo com nossas recomendações, e acondicionadas sob-refrigeração (~ 4 °C) (**Tabela D-2**). Suas formulações também se basearam no padrão sugerido pela AIN (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993), com modificações nas concentrações de lipídios nas dietas hiperlipídicas, em que foi acrescida banha às expensas de amido, adicionado menor quantidade de óxido de magnésio na mistura mineral da dieta hiperlipídica deficiente em magnésio. A mistura mineral adicionada nas dietas foi elaborada sem magnésio, de maneira que o sal foi adicionado posteriormente de acordo com a concentração esperada para cada dieta.

⁷ Ficha de dados das rações experimentais no **Anexo B**.

Tabela D- 2 - Formulação das dietas usadas no ensaio principal⁸

Ingredientes	Dietas experimentais*		
	Controle	Hiperlipídica	Hiperlip def Mg
caseína [†] (g/100 g da dieta)	20,00	20,0	20,0
L-cistina (g/100 g da dieta)	0,30	0,30	0,30
amido de milho (g/100 g da dieta)	39,66	7,86	7,92
maltodextrina (g/100 g da dieta)	13,20	20,00	20,00
sacarose (g/100 g da dieta)	10,00	10,0	10,0
celulose (g/100 g da dieta)	5,00	5,00	5,00
óleo de soja (g/100 g da dieta)	7,00	7,00	7,00
banha (g/100 g da dieta)	-	25,00	25,00
mistura salina [‡] (g/100 g da dieta)	3,50	3,50	3,50
óxido de magnésio (g/100 g dieta)	0,085	0,085	0,026
mistura vitamínica [§] (g/100 g da dieta)	1,00	1,00	1,00
bitartarato de colina (g/100 g da dieta)	0,25	0,25	0,25
antioxidante terc-butil hidroquinona (g/100 g da dieta)	0,0014	0,0014	0,0014

* Controle (TD. – 7 % *soybean oil diet* (500 Mg), *Harlan Teklad Laboratories*); hiperlipídica (TD.110297 – 25% *lard*, 7 % *soybean oil diet* (500 Mg), *Harlan Teklad Laboratories*); hiperlipídica deficiente em magnésio (TD.110299 – 25 % *lard*, 7 % *soybean oil diet* (150 Mg), *Harlan Teklad Laboratories*)

[†] Formulação baseada na AIN-93G-MX (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) com modificações apenas no magnésio, o qual foi adicionado posteriormente de acordo com o esperado para cada dieta

[§] Formulação baseada na AIN-93G-VX (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) sem modificações

No ensaio principal preferiu-se não realizar o ajuste de nutrientes (proteína, vitaminas e minerais), como nas dietas usadas no ensaio piloto, e optou-se por incluir um grupo *pair-feeding* aos hiperlipídicos, cujo pareamento foi feito diariamente pelo consumo da dieta em gramas, para equiparar o consumo de proteínas, minerais e vitaminas.

1.1.2 Definição do tempo e das concentrações de magnésio e de lipídios das dietas experimentais

Uma vez que o desenvolvimento de doenças crônicas vem ocorrendo cada vez mais precocemente, em diferentes grupos populacionais (FORD e MOKDAD, 2003; KIM *et al.*, 2010; KIRII *et al.*, 2010; SALES *et al.*, 2011) optou-se por avaliar os efeitos do consumo de dietas hiperlipídicas e deficientes em magnésio por cerca de 30 dias, nos ratos com cerca de 60 dias de idade, período no qual estão sexualmente maduros (ADAMS; BOICE, 1983).

⁸ Ficha de dados das rações experimentais no **Anexo C**

Estima-se que ratos, tanto em período de crescimento quanto adultos (não gestantes), tenham necessidade dietética de magnésio de 7,5 mg Mg/d, o que equivale, para a dieta AIN 93G, a aproximadamente 500 mg/kg de ração (REEVES, NIELSEN, FAHEY, 1993; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1995). Esse valor foi adotado para as dietas controle e hiperlipídica do presente estudo.

Já para a dieta hiperlipídica deficiente em magnésio, embora aquém do que é observado na população adulta (FORD e MOKDAD, 2003; KIM *et al.*, 2010; KIRII *et al.*, 2010; SALES *et al.*, 2011), optou-se por ofertar 150 mg Mg/g dieta aos animais do grupo deficiente, que equivale a aproximadamente 2,3 mg Mg/d (30 % recomendação). Este valor, de acordo com a literatura, equivale ao que seria uma dieta marginalmente deficiente neste mineral para modelos animais (FEILLET-COUDRAY *et al.*, 2000), e foi adotada para que fosse possível avaliar melhor os efeitos do baixo consumo dietético de magnésio em curto espaço de tempo, associado a dieta hiperlipídica, uma vez que percentuais por volta de 60 % da RDA do rato nem sempre é responsivo a maioria dos parâmetros de magnésio em estudos com animais (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1995), por representar uma deficiência leve.

Por outro lado, o percentual de lipídios das dietas hiperlipídicas baseou-se especialmente em estudos desenvolvidos com ratos *Wistar* alimentados com banha, no intuito de desenvolver obesidade e fatores relacionados a esta síndrome (GUSTAFSON *et al.*, 2002; BUETTNER *et al.*, 2006; BANAS *et al.*, 2009; PICKERING *et al.*, 2009; SOGAWA *et al.*, 2009).

1.1.3 Composição química das dietas experimentais

Foram determinadas as concentrações de umidade [estufa 105 °C], lipídios totais [Soxhlet], proteína [micro-Kjeldahl], minerais e cinzas (AOAC, 2006). Os minerais foram analisados por espectrofotometria de absorção atômica (*Perkin Elmer AAnalyst 100* – Norwalk, CT, EUA), após digestão por via úmida (HNO₃:H₂O₂, 5:1; v/v) e diluição com

HNO₃ a 1 % (v/v), nas condições apresentadas na **Tabela D-3**. Para análise de cálcio e de magnésio foi adicionada, às amostras, ao final das diluições, solução de óxido de lantânio a 5 %, como La₂O₃·7H₂O (Merck, Darmstadt, Alemanha), de modo a se obter concentração final de lantânio de 0,1 % (p/v). Foram preparadas curvas padrão a partir das soluções padrão de CaCl₂, MgCl₂, FeCl₃, ZnCl₂ e CuCl₂ (Titrisol, Merck, Darmstadt, Alemanha). O fósforo foi analisado pelo método de Fiske e Subarrow (1925) em espectrofotômetro Genesys 10 Vis (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA).

Tabela D- 3 - Condições para quantificação de minerais em dietas em espectrofotômetro de absorção atômica Perkin Elmer AAnalyst 100 (Norwalk, CT, EUA)*

Mineral	Comprimento de onda (nm)	Fenda (nm)	Limite de quantificação (µg/mL)
cálcio	422,7	0,7	1,301
magnésio	202,6	0,7	1,919
ferro	248,3	0,2	0,458
zinco	213,9	0,7	0,694
cobre	324,8	0,7	0,000

* Em todos os métodos foram usados lâmpada de catodo oco e chama oxidante de ar-acetileno

1.1 Composição corporal e índice de adiposidade

A avaliação da composição corporal dos animais (umidade, gordura, proteína e resíduo fixo [cinzas]) foi determinada por análise química das carcaças como descrito por DONATO Jr. *et al.* (2006). Inicialmente as carcaças dos animais foram desidratadas (60 °C, estufa ventilada), desengorduradas [Soxhlet], e moídas (moinho Ika M20 grinder, Labortechnik, Wasserburg, Alemanha). Após remoção dos pelos, removidos no intuito de melhorar a homogeneidade do pó da carcaça, a porcentagem de proteína [Kjeldahl] (N × 6,25) e de cinzas (mufla, 540 °C) foram determinadas. A massa livre de gordura foi calculada por diferença.

O índice de adiposidade foi calculado pela relação da soma dos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal pelo peso corporal final, em gramas, e este valor foi multiplicado por 100.

$$\text{Índice de adiposidade (\%)} = \frac{\text{tec. adiposo epididimal (g)} + \text{tec. adiposo retroperitoneal (g)}}{\text{peso corporal final (g)}} \times 100$$

1.1.4 Lipídios fecais⁹

As amostras de fezes foram secas em estufa a 105 °C por 12 h, moídas e os lipídios totais foram determinados pelo método Soxhlet (AOAC, 2006). A absorção aparente de lipídios da dieta foi calculada pela relação a seguir:

$$\text{Absorção (\%)} = \frac{\text{ingestão (mg/d)} - \text{excreção fecal (mg/d)}}{\text{ingestão (mg/d)}} \times 100$$

1.1.5 Status de magnésio

O *status* de magnésio foi avaliado pela quantificação do mineral por espectrofotometria de absorção atômica – EAA (Perkin Elmer AAnalyst 100, EUA) no plasma, eritrócitos, urina (por método direto – SALES *et al.* [artigo em tramitação]) e nas fezes, músculo gastrocnêmio, tíbia e fêmur nas amostras desidratadas e abertas com HNO₃:H₂O₂ (5:1). A curva padrão foi preparada com MgCl₂ Titrisol (Merck, Darmstadt, Alemanha). Óxido de lantânio foi acrescentado de modo a se ter concentração final de 0,1 % de lantânio.

Toda a vidraria usada para análise de minerais foi previamente desmineralizada, e a precisão e exatidão dos métodos verificada usando padrões certificados (*trace elements serum L-I e urine blank*; Seronorm, Billingstad, Norway) e padrões secundários (*pool* de plasma, eritrócitos, urina e AIN-93G para as amostras que foram digeridas), sendo verificadas precisões de 96 a 100 % e exatidões de 95 a 103 %.

A absorção aparente⁶ de magnésio da dieta foi calculada pela mesma relação mencionada para lipídios, e o balanço de magnésio calculado pela relação a seguir.

⁹ Avaliação feita apenas no ENSAIO PILOTO

$$\text{Balanço (mg/d)} = \frac{(\text{ingestão (mg/d)} - \text{excreção fecal (mg/d)}) - \text{excreção urinária (mg/d)}}{\text{ingestão (mg/d)}}$$

1.3 Resistência insulínica

1.3.1 Teste de tolerância à insulina

O teste de tolerância à insulina curto (TTI) foi realizado seis dias antes da eutanásia. Após 4 h de jejum, solução de insulina recombinante humana (0,75 U/kg; *Humulin R*; Lilly Elly, Indianapolis, EUA) foi injetada, por via intraperitoneal. Amostras de sangue foram colhidas, após pequena secção da cauda, nos tempos 0, 4, 8, 12 e 16 min. A glicose foi mensurada utilizando-se glicosímetro portátil (Accu-Chek® Performa, Roche diagnóstica Ltda, São Paulo, Brasil) (CINTRA *et al.*, 2012). A sensibilidade à insulina foi estimada pela constante K_{ITT} , da equação exponencial $y = y_0 \cdot e^{-kt}$, em que y é a concentração de glicose e t o tempo em minutos (LUNDBAEK, 1962).

1.3.2 Glicemia e insulinemia de jejum

Antes da eutanásia foram determinadas a glicemia de jejum (Accu-Chek® Performa, Roche diagnóstica Ltda, São Paulo, Brasil) por incisão na ponta da cauda, e a insulina sérica (kit para multiplex rat serum adipokine - Cat. n° RADPK-81K, Millipore Corporation; Billerica, MA, EUA) com o sangue coletado durante a eutanásia.

Com os dados de glicose e de insulina foram aplicadas as fórmulas empíricas dos índices HOMA-IR (*homeostasis model assessment insulin resistance*) e HOMA- β (*homeostasis model assessment β -cell function*), que predizem, respectivamente, a sensibilidade à insulina e a função das células β pancreáticas: $\text{HOMA-IR} = \text{insulina de jejum } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glicemia de jejum (mmol/L)} / 22,5$; $\text{HOMA-}\beta = 20 \times \text{insulina de jejum } (\mu\text{U/mL}) / (\text{glicemia de jejum (mmol/L)} - 3,5)$ (MATTHEWS *et al.*, 1985).

1.3.3 Fosforilação de proteínas da via de sinalização de insulina¹⁰

No intuito de avaliar alguns passos da sinalização da insulina, foram avaliadas, por *western blotting*, a expressão, no fígado, do receptor de insulina (IR- β), do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) e da proteína quinase B (Akt).

Aos fragmentos de fígado foi adicionado tampão específico para extração de proteína total (3,2 mM FNa, 0,5 mM Na₄P₂O₇, 0,3 mM Na₃VO₄, 1:100 *protease inhibitor cocktail* [Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA] e T-PER *tissue protein* [Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA]), sendo os tecidos homogeneizados com auxílio de homogeneizador polytron à velocidade máxima, por 20 segundos. Após centrifugação (40 min, 4° C, 1200 rpm), foi retirada uma alíquota do sobrenadante para determinação da concentração de proteína (BCA protein assay kit, Pierce, Cat. nº 23225, Rockford, IL, EUA), e alíquotas armazenadas a -80 °C até determinação do extrato total com anticorpo específico. No momento do uso foi adicionado a cada alíquota tampão *Laemmli* 4x, e submetido a banho-maria por 5 min.

Amostras contendo 50 µg de extratos protéicos totais foram submetidos à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE, bis-acrilamida 8 %) em aparato MiniProtean da Bio-Rad (Hercules, CA, EUA) e transferidos em célula de transferência semi-seca – 25 V, 20 min (BioRad; Hercules, CA, EUA), para membranas de nitrocelulose (Whatman Schleicher & Schuell Protran Nitrocellulose Transfer Membrane, Dassel, Germany). O bloqueio das membranas foi feito durante 2 h com solução de leite em pó desnatado a 0,5 %, em solução salina tamponada com fosfato pH 7,3. Em seguida, foram incubadas *overnight*, a 4 °C, com anticorpos primários para anti-IR (1:500; *insulin receptor β -subunit* [C-19; nº SC-711]; 1:500; *phospho-insulin receptor β -subunit* [10C3; nº SC-81500] – Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA)), 1:1000; anti-IRS-1 (IRS-1 [nº 2382]; 1:1000; *phospho-IRS-1* [Tyr895; nº 3070] – Cell

¹⁰ Análise realizada apenas nas amostras do *ENSAIO PRINCIPAL*. Amostras do piloto foram usadas apenas para padronizações.

Signaling Technology, Beverly, MA, EUA), e anti-Akt (1:500; Akt1 [C-20; nº SC-1618]; 1:500; *anti-phospho* [Ser473, nº sc-7985-R] – Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA)), e, posteriormente, incubados (2 h) com anticorpos secundários adequados para cada anticorpo primário (1:6667; *anti-rabbit* ou *anti-mouse* IgG-horseradish peroxidase, GE Healthcare Lifesciences, Freiburg, Alemanha). Os complexos antígeno-anticorpo foram identificados utilizando substrato quimioluminescente para a enzima peroxidase (SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate – Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA) e detectados com filme fotossensível (Kodak XAR - Rochester, NY). Após densitometria utilizando um scanner (HP 3400) e o programa Scion Image V. Alpha 4.0.3.2 (Scion Corporation, Frederick, MD, USA), as proteínas fosforiladas foram normalizadas pelo conteúdo de proteína total.

1.4 Lipídios

1.4.1 Perfil de ácidos graxos no fígado¹¹

Cerca de 1,25 g do fígado (50 mg de gordura), foi submetido à hidrólise ácida, sendo adicionado o ácido pirogálico para minimizar a degradação oxidativa dos ácidos graxos durante a análise. Os lipídios foram extraídos com éter etílico, e então metilados para ésteres metílicos de ácidos graxos, com trifluoreto de boro (BF₃) em metanol (7 %). Após remoção do solvente sob fluxo de nitrogênio (N₂), os ácidos graxos metilados foram ressuspensos em clorofórmio e injetados em cromatógrafo a gás CG17A (Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com detector de ionização de chama ligado a um processador-integrador C-30021 (CG Instrumentos Científicos Ltda, São Paulo, Brasil), nas seguintes condições: coluna cromatográfica de sílica fundida – Supelcowax 10 de 30 m x 0,25 mm de diâmetro e 0,2 µm de espessura da fase estacionária (Supelco Park, Bellefonte, Palo Alto, CA, EUA); gás de arraste: hélio (1 mL/min); programação de temperatura da coluna: aquecimento a 1 °C/min de 170 °C até 225 °C, permanecendo nesta temperatura por 10

¹¹ Avaliação feita apenas no *ENSAIO PILOTO*. No **Apêndice G** consta a validação feita para este método.

min; temperatura do vaporizador: 250 °C; temperatura do detector: 270 °C; tempo total de análise: 65 min; razão de divisão da amostra no injetor de 1/100.

A identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi realizada comparando-se os tempos de retenção das amostras com os de padrões de ácidos graxos (mistura de padrões Sigma – Cat. nº 189.19). Relacionaram-se as áreas dos picos e a área total, e os valores foram expressos em percentual de ácidos graxos (AOAC, 2006).

1.4.2 Perfil lipídico¹²

Para avaliação do perfil lipídico determinou-se, no soro, o colesterol total pela reação de Trinder (colesterol oxidase), a lipoproteína de alta densidade (HDL-c) pela precipitação com fosfotungstato-magnésio, e os triacilgliceróis pela reação glicerol fosfato oxidase, todos se utilizando de reagentes da Labtest Diagnóstica (Lagoa Santa, MG, Brasil).

1.5 Estresse oxidativo

1.5.1 Malondialdeído

A peroxidação lipídica foi avaliada pela quantificação da concentração de malondialdeído (MDA) no fígado, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Agilent Technologies 1200 series – Santa Clara, EUA). No método usado, durante o aquecimento em meio ácido, o MDA é liberado do peróxido do lipídio, e um mol deste composto reage com dois moles de ácido tiobarbitúrico (TBA-MDA), formando um complexo cromogênio (TBA-MDA – **Figura D-4**) que é detectado a 532 nm (LÄRSTAD *et al.*, 2001; CHENG; WU; HUANG, 2008).

¹² Análise realizada apenas no *ENSAIO PRINCIPAL*

Figura D- 4 - Reação que ocorre entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o MDA, durante o aquecimento em meio contendo ácido ortofosfórico

Para leitura, o cromatógrafo foi equipado com coluna reversa Phenomenex C18 de 250 mm x 4,6 mm com partículas de 5 μ m (Phenomenex, Torrance, EUA) e pré-coluna Phenomenex LC8-D8 AJ0-1287 (Phenomenex, Torrance, EUA), e mantido nas seguintes condições: temperatura do mostrador de 4 $^{\circ}$ C; temperatura da coluna de 25 $^{\circ}$ C; fase móvel de 60 % de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 6,0) e 40 % de metanol; volume de injeção de 20 μ L; taxa de fluxo de 1 mL/min; tempo de corrida de 10 min, mais 10 min para limpeza da coluna com acetonitrila e água e 5 min de pós-corrida. A detecção foi realizada fluorimetricamente a excitação de 515 nm e emissão de 543 nm. O tempo de retenção do MDA foi aproximadamente de 8,5 min. A concentração de MDA foi calculada a partir da equação da reta gerada pela curva de calibração, cujas concentrações variaram de 0,5 a 10 μ mol/L.

1.5.2 Atividade da glutathiona peroxidase

No método usado a atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px) é indiretamente medida por reação atrelada com a glutathiona redutase (GR), em que a glutathiona oxidada (GSSG), produzida com a redução de hidroperóxidos (terc-butil hidroperóxido) pela GPx, é reciclada para o seu estado reduzido (GSH) pela GR e NADPH (SIES *et al.*, 1979; FLOHÉ; GUNZLER, 1984; TORRES, 2009).

A atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px) foi determinada, a partir de amostras de fígado, homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 0,1 M + EDTA 0,1

M, pH 7,0, na proporção de 1:4. Após centrifugação a 10.000 rpm, durante 15 min, a 4 °C, o sobrenadante foi separado e novamente diluído (1:10).

Em microplacas, acrescentou-se em cada poço 30 µL do homogenato de fígado (1:10) e 160 µL de meio de reação (tampão fosfato 0,1M pH 7,0; glutathiona redutase 0,08M; glutathiona oxidase 9,6 U/mL; NADPH 1,2mM). A placa foi incubada a 30 °C por 5 min, e em seguida foi feita uma leitura prévia ($\lambda = 340 \text{ nm}$, 30 °C, 6 min, sob agitação) para se certificar de que as concentrações das amostras estavam adequadas ($\Delta\text{ABS}/\text{min}$ deve estar entre 0,02 e 0,135/min) e não havia oxidação não específica do NADPH. Após essa certificação foi pipetado rapidamente 10 µL de solução de terc-butil 0,46 % a cada poço, e realizada de imediato nova leitura. A atividade da GSH-Px foi medida pela quantidade da enzima que causou a oxidação de 1 nmol de NADPH para NADP^+ por minuto à 30 °C. A oxidação do NADPH a NADP^+ foi monitorada durante 6 min, no comprimento de onda de 340 nm, e a atividade da GSH-Px determinada pela equação a seguir, derivada da lei de Lambert e Beer:

$$\text{atividade da GSH-Px (nmol/min/mL)} = \frac{k}{\xi \times b} \times \frac{0,2 \text{ mL}}{Y \text{ mL}} \times \text{diluição da amostra}$$

onde,

k = inclinação da curva de crescimento

b = caminho óptico da placa de Elisa $\therefore 0,524 \text{ (cm)}$

$\xi_{\text{NADPH}^+} = 0,00622 \text{ (}\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}\text{)}$, que corresponde ao coeficiente de extinção do NADPH

Y = volume de amostra adicionada

Para expressar os resultados em mg de proteína do tecido, determinou-se a concentração de proteína nos homogenatos usando-se o kit BCA protein assay da Pierce (Cat. nº 23225, Rockford, IL, EUA).

1.5.3 Atividade da catalase¹³

A atividade da catalase foi determinada em amostras de fígado homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 0,1 M + EDTA 0,1 M, pH 7,0, na proporção de 1:5. Após centrifugação a 10.000 rpm, durante 15 min, a 4 °C, o sobrenadante foi separado e novamente diluído (1:10).

Em microplacas foi adicionado 20 µL do homogenato de fígado (1:50) em cada poço, e pipetado 180 µL de meio reacional (tris-HCl 1M, EDTA 5 mM, pH 8,0 e peróxido de hidrogênio 30 mM). Em seguida a placa foi lida imediatamente (6 min, a 30 °C e a 230 nm), sendo verificada a decomposição do peróxido de hidrogênio pela catalase (BEUTLER, 1975). Sua atividade foi determinada pela equação a seguir, derivada da lei de Lambert e Beer:

$$\text{atividade da CAT (nmol/min/mL)} = \frac{k}{\xi \times b} \times \frac{0,2 \text{ mL}}{Y \text{ mL}} \times \text{diluição da amostra}$$

onde,

k = inclinação da curva de crescimento

b = caminho óptico da placa de Elisa $\therefore$ 0,524 (cm)

$\xi_{\text{H}_2\text{O}_2} = 0,071 \text{ (}\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}\text{)}$, que corresponde ao coeficiente de extinção do H_2O_2

Y = volume de amostra adicionada

Para expressar os resultados em mg de proteína do tecido, determinou-se a concentração de proteína do homogenato de fígado usando-se o kit BCA protein assay da Pierce (Cat. nº 23225, Rockford, IL, EUA).

1.6 Status inflamatório

Foram dosados no soro dos animais as interleucinas 6 e 1 β , o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), o fator ativador do plasminogênio 1 (PAI-1 total) e a proteína C reativa (PCR). Estas análises foram realizadas utilizando-se o kit *rat serum adipokine*

¹³ Análise realizada apenas no ENSAIO PRINCIPAL

(Cat. n° RADPK-81K, Millipore Corporation; Billerica, MA, EUA), por multiplex, e *rat C-reactive protein* (Cat. n° CYT294, Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA), por ELISA. Foi dosado ainda o TNF- α no fígado, utilizando-se o kit Rat TNF- α Immunoassay (Cat. n° RTA00, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA).

1.9 Análise estatística

Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. A normalidade dos dados foi testada usando o teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Levene. Assumidas as condições para aplicação de testes estatísticos paramétricos, as médias dos grupos do *ENSAIO PILOTO* foram comparadas pelo teste t-Student e do *ENSAIO PRINCIPAL* foram comparadas pela análise de variância unidimensional (one-way ANOVA) seguido do teste de Tukey. Quando não foi observada distribuição normal, e principalmente homogeneidade de variâncias, as medianas foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney (*ENSAIO PILOTO*) ou pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de Games-Howell (*ENSAIO PRINCIPAL*).

Para comparação das médias dos dados de *western blotting*, além da normalidade, verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, verificou-se a esfericidade dos dados nos diferentes grupos pelo teste de Mauchly. Quando esse pressuposto não foi atendido ($p < 0,05$) foi utilizado o fator de correção Huynh-Feldt. As médias dos dados foram comparadas pelo teste ANOVA em dois fatores: estímulo com insulina (negativo e positivo) e grupo (CT, PF, HF, HFMg⁻), com medidas repetidas em um fator (grupo). As diferenças entre os grupos foram verificadas pelo ajuste de Bonferroni. Para esses dados o *software* Statistical Package for the Social Sciences (SPSS – Chicago, IL, EUA), versão 15.0 foi utilizado e a significância considerada foi de α de 5 %.

A análise de regressão linear múltipla *stepwise* foi feita para avaliar a relação entre o perfil glicídico e lipídico com o *status* de magnésio, o consumo de magnésio e de lipídios e o índice de adiposidade. Para isso, foram definidas como variáveis dependentes os parâmetros usados para avaliar a homeostase da glicose (glicemia, insulinemia e K_{ITT}),

perfil lipídico (triacilgliceróis, colesterol total, HDL-c, VLDL), *status* oxidativo (MDA, GSH-Px) e inflamatório (IL-1 β , TNF- α , PAI-1 e PCR), e como variáveis independentes: magnésio plasmático, magnésio eritrocitário, magnésio urinário, magnésio muscular, magnésio ósseo, consumo de magnésio e de lipídios e índice de adiposidade. Foi testado ainda o efeito do índice de adiposidade e do consumo de lipídios e de magnésio (variáveis independentes) sobre o *status* de magnésio (variável dependente), e do consumo de lipídios e do *status* de magnésio (variáveis independentes) no índice de adiposidade (variável dependente). Os valores iniciais incluíram todas as variáveis independentes, e a seleção *stepwise* foi usada subsequentemente para adicionar ou remover as variáveis. Os modelos finais retiveram apenas aquelas variáveis que mantinham associação com as variáveis dependentes com nível de significância menor do que 5 %.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, N.; BOICE, R. A longitudinal study of dominance in an outdoor colony of domestic rats. **J Comp Psychol**, v. 97, n. 1, p. 24-33, 1983.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. . In: Horwitz W, editor. **Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists**. 18th. ed. Maryland: AOAC International, 2006. [Current through revision 1]
- BANAS, S.M.; ROUCH, C.; KASSIS, N.; MARKAKI, E.M.; GEROZISSIS, K. A dietary fat excess alters metabolic and neuroendocrine responses before the onset of metabolic diseases. **Cell Mol Neurobiol**, v. 29, p. 157-168, 2009.
- BEUTLER, E. **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. 2. ed. Nova Iorque: Grune & Stratton, 1975.
- BUETTNER, R.; PARHOFER, K.G.; WOENCKHAUS, M.; WREDE, C.E.; KUNZ-SCHUGHART, L.A.; SCHÖLMERICH, J.; BOLLHEIMER, J.C. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. **J Mol Endocrinol**, v. 36, p. 485-501, 2006.
- CHENG G-W., WU H-L., HUANG Y-L. Simultaneous determination of malondialdehyde and ofloxacin in plasma using an isocratic high-performance liquid chromatography/fluorescence detection system. **Anal Chim Acta**, v. 616, p.230, 2008.
- CINTRA, D.E.; ROPELLE, E.R.; MORAES, K.C.; PAULI, J.R.; MORARI, J.; DE SOUZA, C.T.; GRIMALDI, R.; STAHL, M.; CARVALHEIRA, J.B.; SAAD, M.J.; VELLOSO, L.A. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. **Plos One**, v. 7, n. 1, p.e30571, 2012.

- DONATO Jr., J.; PEDROSA, R.G.; CRUZAT, V.F.; PIRES, I.S.O.; CHEM, B.; TIRAPEGUI, J. Effects of leucine supplementation on the body composition and protein status of rats submitted to food restriction. **Nutr**, v. 22, p. 520-527, 2006.
- 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. **J Nutr**, v. 130, p. 2306–2311, 2000.
- FISKE, C. H.; SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **J Biol Chem**, v. 66, p. 375-400, 1925.
- FLOHÉ, L.; GUNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 114-21, 1984.
- FORD, E.S.; MOKDAD, A.H. Dietary magnesium intake in a national sample of U.S. adults. **J Nutr**, v. 133, p. 2879–2882, 2003.
- GUSTAFSON, L.A.; KUIPERS, F.; WIEGMAN, C.; SAUERWEIN, H.P.; ROMIJN, J.A.; MEIJER, A.J. Clofibrate improves glucose tolerance in fat-fed rats but decreases hepatic glucose consumption capacity. **J Hepatol**, v. 37, p. 425–431, 2002.
- KIM, D.J.; XUN, P.; LIU, K.; LORIA, C.; YOKOTA, K.; JACOBS-JR, D.R.; HE, K. Magnesium intake in relation to systemic inflammation, insulin resistance, and the incidence of diabetes. **Diabetes Care**, v. 33, p. 2604-2610, 2010.
- KIRII, K.; ISO, H.; DATE, C.; FUKUI, M.; TAMAKOSHI, S.; JACC STUDY GROUP. Magnesium intake and risk of self-reported type 2 diabetes among Japanese. **J Am Coll Nutr**, v. 29, 99-106, 2010.
- LÄRSTAD M., LJUNGKVIST G., OLIN A-C., TORÉN K. Determination of malondialdehyde in breath condensate by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **J Chromat B**, v.766, p.107, 2001.
- LUNDBAEK, K. Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. **Br Med J**, v. 3, p. 1507-1513, 1962.
- MATTHEWS, D.; HOSKER, J.; RUDENSKI, A.; NAYLOR, B.; TREACHER, D.; TURNER, R. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, p. 412-9, 1985.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. BOARD ON AGRICULTURE. COMMITTEE ON ANIMAL NUTRITION. SUBCOMMITTEE ON LABORATORY ANIMAL NUTRITION. Nutrient requirements of the laboratory rat. In: _____. **Nutrient requirements of laboratory animals**. 4. ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 1995. Cap. 2, p. 11-79.
- NETER, J.; KUTNER, M.; NACHTSHEIM, C.J.; LI, W. **Applied linear statistical models**. 5. Ed. New York: McGraw-Hill/Irwin, 2004.
- PICKERING, C.; ALSIÖ, J.; HULTING, A.L.; SCHIÖTH, H.B. Withdrawal from free-choice high-fat high-sugar craving only in obesity-prone animals. **Psychopharmacology**, v. 204, n. 3, p. 431-443, 2009.
- REEVES, P.; NIELSEN, F.; FAHEY Jr., G. 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. **J Nutr**, v. 123, n. 2, p. 1939-1951, 1993.
- 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. **Clin Nutr**, v. 30, p.359-64, 2011.

SIES, H.; KOCH, O.R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. Increased billiary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **Febs Letters**, v. 23, n. 2, p. 287-90, 1979.

SOGAWA, M.; SEURA, T.; KOHNO, S.; HIRASAKA, K.; YAMAGUSHI, Y.; TAKAGAKI, R.; HARADA, A.; OKUMURA, Y.; YAMAMOTO, S.; KISHI, K.; NIKAWA, T. Awa (Tokushima) lactate-fermented tea as well as green tea enhance the effect of diet restriction on obesity in rats. **J Med Invest**. v. 56, n. 1-2, p. 42-48, 2009.

TORRES, L.H.L. **Efeitos da inalação da fumaça do cigarro no estresse oxidativo do sistema nervoso central de camundongos jovens**. 2009. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. São Paulo, 2009.

APÊNDICE E - Formulário para observação de sinais de deficiência de magnésio

Sinais

ANEXO 8

Animal: _____ Grupo: _____ Data da observação: ____/____/____

Sinais		Observações
()	presença de hiperemia das orelhas e pés	
()	hiperirritabilidade	
()	convulsão	
()	tremores	
()	alopecia	
()	lesões na pele	
()	edema	
()	gengivas hipertróficas	

Responsável pela observação:

O animal permaneceu apresentado o(s) sinal(is) descrito? Fazer evolução caso haja alguma modificação.

APÊNDICE F - Comparação dos resultados de determinação de magnésio plasmático e em amostras de sangue colhidas com citrato de sódio e heparina sódica

Para esta avaliação foi colhido sangue de nove ratos *Wistar Hannover*, provenientes do Biotério de Produção e Experimentação do Conjunto das Químicas da USP. Após anestesia por via intraperitoneal com solução de xilazina e quetamina (1:2, v/v), o sangue foi colhido, pela veia porta, e distribuído em três tubos: um contendo citrato de sódio (Synth[®], São Paulo, Brasil) a 30 % (10 µg citrato/mL de sangue), outro contendo heparina sódica (50 UI heparina/mL de sangue) e outro sem anticoagulante. Este último tubo foi utilizado para obtenção de soro.

Os resultados foram submetidos à ANOVA seguido do *post-hoc* de *Tukey* para plasma/soro, e pelo teste *t-Student* pareado para eritrócitos

Resultados

Não houve diferenças estatísticas nos resultados de magnésio plasmático/sérico e eritrocitário quando o sangue foi colhido nas condições mencionadas (**Figura F-1**). No entanto, optou-se por usar heparina sódica como anticoagulante para as amostras para análises de magnésio, por ser o mais utilizado em estudos com animais.

Figura F- 1 - Magnésio plasmático/sérico e eritrocitário de ratos *Wistar* (n = 9). Avaliação de uso de anticoagulantes. Médias ± DP (p > 0,05).

APÊNDICE G - Validação do método de determinação de ácidos graxos em fígados**Responsáveis pelos procedimentos:**

Cassiana Ganem Achtschin e Cristiane Hermes Sales

Auxílio técnico: Rosângela Pavan Torres

Método

O método envolve a extração de lipídios (totais, saturados e insaturados) com éter após hidrólise ácida, e determinação por cromatografia a gás.

Foi preparado um homogenato de *pool* de fígados de ratos e feita a hidrólise ácida dos lipídios com o ácido pirogálico para minimizar a degradação oxidativa dos ácidos graxos (AG) durante a análise. Os lipídios foram extraídos com éter, e então metilados para ésteres metílicos de AG, usando trifluoreto de boro (BF₃) em metanol (7 %). Após remoção do solvente sobre fluxo de nitrogênio (N₂), os ésteres metílicos foram ressuspensos em clorofórmio e injetados em cromatógrafo a gás CG17A (Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com detector de ionização de chama ligado a um processador-integrador C-30021 (CG Instrumentos Científicos Ltda, São Paulo, Brasil), nas seguintes condições de análise:

- Coluna cromatográfica de sílica fundida – Supelcowax 10 de 30 m x 0,25 mm de diâmetro e 0,2 µm de espessura da fase estacionária (Supelco Park, Bellefonte, Palo Alto, CA, EUA)
- Gás de arraste: hélio (1 mL/min)
- Programação de temperatura da coluna: aquecimento a 1 °C/min de 170 °C até 225 °C, permanecendo nesta temperatura por 10 min
- Temperatura do vaporizador: 250 °C
- Temperatura do detector: 270 °C
- Tempo total de análise: 65 min
- Razão de divisão da amostra no injetor: 1/100

A identificação dos ésteres metílicos dos AG foi realizada comparando os tempos de retenção dos ésteres das amostras com os dos ácidos graxos padrão (mistura de

padrões Sigma 189.19). A quantificação foi realizada relacionando a área dos picos com a área total (ácidos graxos totais foram fixados em 100 %), de acordo com a recomendação da AOAC (2006). Os valores foram expressos em percentual de AG.

O Procedimento Operacional Padrão – POP formulado para este método baseou-se no método proposto pela AOAC (2006), com algumas modificações para adequar a quantidade de lipídios presente nessas amostras.

Validação da extração

A **sensibilidade** do método foi avaliada a partir da determinação dos **limites de detecção** (LD) e **de quantificação** (LQ). Para cálculo destes limites foram analisados 10 brancos sem amostra e sem padrão interno.

O LD foi calculado pela média obtida na leitura dos 10 brancos, somado ao produto da multiplicação do $t_{(n-1, 1-\alpha)}$ (sinal/ruído) pelo desvio padrão de 10 leituras do branco. O LQ foi obtido da mesma forma, mas considerando a relação sinal/ruído de 10:1 (equações abaixo).

$$LD = \text{média dos 10 brancos} + (t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot \text{desvio padrão dos 10 brancos})$$

Onde, t = distribuição de *Student*, dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança, neste caso, com 10 amostras, ou seja, com o grau de liberdade igual a nove e considerando limite de confiança 99 %, o sinal/ruído é de 2,821:1.

$$LQ = \text{média dos 10 brancos} + (10 \cdot \text{desvio padrão dos 10 brancos})$$

A **precisão** foi calculada em termos de repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados. Para esta avaliação foram realizadas, em três dias diferentes, a extração e metilação de cinco amostras do homogenato do *pool* de fígados, conforme recomendado no método, ou seja, usando o padrão interno C_{13:0} (triglicerídeo tritridecanoína – C_{13:0}, Sigma®).

A **precisão intra-ensaio** foi avaliada pelo resultado das cinco determinações feitas no *pool*, em um mesmo ensaio. A **reprodutibilidade inter-ensaio** foi avaliada pela dispersão dos resultados das análises feitas em três dias distintos.

$$\text{Precisão (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{desvio padrão}}{\text{concentração média determinada}} \times 100 \right)$$

A exatidão foi avaliada através do erro relativo (ER), que é calculado através da equação abaixo, considerando a concentração obtida do padrão interno empregado no método (triglicerídeo tritridecanoína – C_{13:0}, Sigma®) acrescentado nas amostras usadas para avaliar a precisão e no branco com padrão C_{13:0}, e considerando os resultados obtidos do padrão *Lipid Standards: fatty acid methyl ester mixtures* (189-19) - Supelco®.

$$\text{ER} = \frac{X_{\text{lab}} - X_v}{X_v} \times 100$$

Onde: X_{lab} = média aritmética dos valores obtidos

X_v = valor aceito como verdadeiro

Resultados

☒ Sensibilidade do método

O limite de detecção do método foi de 249,7 e o de quantificação de 885,3. Estes foram calculados com base nas áreas do AG palmítico (16:0), representado na **Figura G-1**. O AG palmítico foi escolhido entre os que foram detectados por ter sido identificado em todas as replicatas feitas do branco, e por suas áreas diferirem do branco (zero), diferente do AG mirístico, que também identificado, e com maior coeficiente de variação em relação ao palmítico (**Tabela G-1**).

Figura G- 1 - Cromatograma representativo do branco utilizado no método: todos os reagentes sem amostra e sem padrão interno

Tabela G- 1 - Ácidos graxos quantificados nos brancos avaliados pelo método de hidrólise ácida durante a validação da extração de ácidos graxos em fígado de ratos *Wistar*

Variável	Branco	Ácido mirístico	Ácido palmítico	p
Área do pico	0,00 ± 0,00 ^a	46,8 ± 12,9 ^a	452,4 ± 88,5 ^b	0,000

☒ Precisão e exatidão

O método de extração apresentou boa precisão (**Tabela G-2**). Apesar disto, especialmente para os ácidos graxos capróico, pentadecanóico e oléico, ele não foi tão exato quanto desejável (**Tabela G-1**). Nas **figuras G-2** e **G-3** são apresentados cromatogramas representativos das análises do branco com padrão C_{13:0}, do fígado e do padrão certificado 198.19.

Tabela G- 2 - Precisões intra- e inter-ensaio do método de extração e metilação de ácidos graxos por hidrólise ácida em amostras de fígado de ratos *Wistar**

Ácidos graxos (%)		Precisão inter-ensaio	Precisão intra-ensaio
Totais		99,84 - 99,98	99,89
Saturados		99,83 - 99,98	99,89
Monossaturados		99,87 - 99,97	99,90
Poli-insaturados		99,83 - 99,98	99,89
palmitico	16:0	99,85 - 99,98	99,89
esteárico	18:0	99,82 - 99,99	99,89
palmitoléico	18:1, cis-9	99,88 - 99,96	99,92
vacênico	18:1 cis-11	99,85 - 99,98	99,88
linoléico	18:2, cis-9,12	99,85 - 99,98	99,90
eicosadienóico	20:2, cis-11,14	99,84 - 99,97	99,90
araquidônico	20:4, cis-5,8,11,14	99,82 - 99,99	99,88
docosapentaenóico	22:5	99,82 - 99,99	99,88
docosahexaenóico	22:6, cis-4,7,10,13,16,19	99,80 - 99,98	99,86

* análises realizadas em três dias diferentes (n = 5 replicatas/d)

Tabela G- 3 - Erro relativo do método de extração e metilação de ácidos graxos em fígados de ratos, por hidrólise ácida. Avaliação feita com padrão interno: triglicerídeo tritridecanoína (C_{13:0}) Sigma® (concentração esperada do padrão interno = 0,005 mg/mL)

	Concentração recuperada (mg/mL)	Erro relativo (%)*
branco com padrão interno	0,0046	-8,36(0,06)
1º dia	0,0046	-8,12(0,05)
2º dia	0,0046	-8,42(0,03)
3º dia	0,0046	-8,54(0,14)
Média		-8,36
DP		0,18
CV (%)		-2,12

*Resultados em média(desvio padrão)

Tabela G- 4 - Comparação dos resultados obtidos experimentalmente com o valor do material certificado de referência*

Ácido graxo		Valor obtido (%)			Valor certificado (%)	Erro relativo
		média	SD	CV (%)		
Gordura saturada						
butírico ou butanóico	04:0	-	-	-	4	-
capróico	06:0	1,56	0,82	52,54	4	-61,01
caprílico	08:0	3,33	0,18	5,31	4	-16,77
cáprico	10:0	4,09	0,08	1,89	4	2,36
undecanóico	11:0	2,07	0,03	1,62	2	3,71
láurico	12:0	4,33	0,06	1,34	4	8,33
tridecanóico	13:0	2,18	0,03	1,53	2	8,88
mirístico	14:0	4,40	0,06	1,39	4	10,08
pentadecanóico	15:0	2,18	0,04	1,65	4	-45,42
palmitico	16:0	6,85	0,10	1,41	6	14,13
heptadecanóico	17:0	1,55	0,03	1,65	2	-22,65
esteárico	18:0	4,52	0,06	1,32	4	13,04
araquídico	20:0	4,47	0,07	1,46	4	11,84
heneicosanóico	21:0	2,25	0,03	1,53	2	12,36
beénico	22:0	4,55	0,08	1,72	4	13,65
tricosanóico	23:0	2,32	0,04	1,75	2	15,75
lignocérico	24:0	4,70	0,09	1,83	4	17,39
TOTAL		55,17	0,61	1,10	60	-8,04
Gordura monossaturada						
miristoléico	14:1, cis-9	2,23	0,03	1,22	2	11,30
pentadecenóico	15:1, cis-10	2,19	0,03	1,32	2	9,69
palmitoléico	16:1, cis-9	2,23	0,03	1,19	2	11,52
heptadecenóico	17:1, cis-10	2,25	0,03	1,28	2	12,71
oléico	18:1, cis-9	7,03	0,09	1,31	4	75,84
eicosenóico	20:1, cis-11	2,30	0,03	1,35	2	14,92
erúcico	22:1, cis-13	2,30	0,04	1,68	2	15,01
nervônico	24:1, cis-15	2,40	0,05	2,00	2	20,13
TOTAL		22,94	0,31	1,35	18	27,44
Gordura poli-insaturada						
linoléico	18:2, cis-9,12	2,15	0,02	0,97	2	7,73
γ-linolênico	18:3, cis-6,9,12	1,99	0,03	1,46	2	-0,71
linolênico	18:3, cis-9,12,15	1,99	0,02	1,24	2	-0,52
eicosadienóico	20:2, cis-11,14	2,14	0,02	1,05	2	7,19
eicosatrienóico	20:3, cis-11,14,17 (n-3)	1,87	0,03	1,36	2	-6,53
eicosatrienóico	20:3, cis-8,11,14 (n-6)	1,90	0,02	1,17	2	-4,78
araquidônico	20:4, cis-5,8,11,14	1,84	0,03	1,42	2	-8,20
eicosapentaenóico	20:5, cis-5,8,11,14,17	1,69	0,02	1,43	2	-15,72
docosadienóico	22:2, cis-13,16	2,17	0,03	1,49	2	8,34
docosahexaenóico	22:6, cis-4,7,10,13,16,19	1,50	0,03	1,72	2	-24,84
TOTAL		17,33	2,20	12,67	20	-13,36
Gordura trans						
elaídico	18:1, trans-9	-	-	-	2	-
linolelaídico	18:2, trans-9,12	2,22	0,02	0,79	2	11,09
TOTAL		2,22	0,02	0,79	4	-44,5

* padrão *Lipid Standards: fatty acid methyl ester mixtures* (189-19) – Supelco®

Figura G- 2 - Cromatogramas representativos das análises do branco com padrão C_{13:0} (A) e das amostras de fígado de ratos *Wistar* (B)

Figura G- 3 - Cromatograma representativo da análises do padrão *Lipid Standards: fatty acid methyl ester mixtures* (189-19) - Supelco®

REFERÊNCIAS CONSULTADAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists**. 18. ed. Maryland: Current through Revision 1, 2006, Cap. 41, p. 20-25.

GUIMARÃES, A.R.P.; KUGA, E.; TORRES, R.P.; COLQUHOUN, A.; CURI, R.; MANCINI FILHO, J. Composition of fatty acids in the liver and lymphoid organs of rats fed fatty acids-rich diets. **Biochem Mol Biol Int**, v. 36, p. 451–461, 1995.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. **DOQ-CGCRE-008. Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Revisão 03. Fevereiro de 2010. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf. Acesso em: 31 maio de 2010.

APÊNDICE H - Representação da perda de pelos em estágio mais avançado, sem lesões, em animais do grupo hiperlipídico deficiente em magnésio. Estágio observado ao final do experimento. Do lado esquerdo temos um animal do grupo pareado.

APÊNDICE I - Lesão apresentada por um animal do grupo hiperlipídico deficiente em magnésio

APÊNDICE J – Resultados de estresse oxidativo e inflamação obtidos no ensaio principal, e que não foram explorados no artigo apresentado na Parte II

Tabela J- 1 - *Status* oxidativo e inflamatório de ratos *Wistar* alimentados, durante 32 dias, com dieta controle, hiperlipídica ou hiperlipídica deficiente em magnésio

Parâmetros	CT (n = 8)	PF (n = 16)	HF (n = 12)	HFMg ⁻ (n = 12)	p ^a
<i>Status oxidativo</i>					
Malondialdeído (μmol/mg proteína)	17,9±9,03 ^a	20,8±13,1 ^a	25,1±13,1 ^a	26,0±21,4 ^a	0,590
Atividade da GSH-Px (U/mg proteína)	1,07±0,41 ^a	0,96±0,38 ^a	1,03±0,58 ^a	1,23±0,49 ^a	0,513
Atividade da CAT (U/mg proteína)	1,85±0,67 ^a	2,37±1,10 ^a	2,08±1,10 ^a	2,41±1,19 ^a	0,610
<i>Status inflamatório</i>					
interleucina 6 sérica (pg/mL)	ND	ND	ND	ND	-
interleucina 1β sérica (pg/mL)	22,6±24,1 ^a	21,0±31,5 ^a	28,8±33,0 ^a	13,1±6,9 ^a	0,368 ^b
TNF-α sérico (pg/mL)	2,06±3,16 ^a	2,07±4,60 ^a	0,50±0,56 ^a	3,04±7,21 ^a	0,929 ^b
PAI-1 total sérico (pg/mL)	112±70,6 ^a	71,6±75,3 ^a	67,0±117 ^a	46,7±63,5 ^a	0,226
proteína C reativa (ng/mL)	483±110 ^a	567±74 ^a	478±107 ^a	502±156 ^a	0,191
TNF-α hepático	0,80±0,32 ^a	0,70±0,16 ^a	0,86±0,37 ^a	0,80±0,38 ^a	0,777

Resultados expressos em média±desvio padrão

CT: grupo controle ad libitum; PF: grupo controle com alimentação pareada em gramas aos hiperlipídicos; HF: grupo hiperlipídico; HFMg⁻: grupo hiperlipídico e deficiente em magnésio; GSH-Px: glutathiona peroxidase; CAT: catalase; TNF: fator de necrose tumoral; PAI: inibidor do ativador de plasminogênio; ND: não determinado

^a comparação das médias dos grupos feita pelo teste one-way ANOVA, seguido de *post-hoc* de Tukey. Letras diferentes na mesma linha correspondem a médias diferentes.

^b comparação das medianas dos grupos feita pelo teste Kruskal-Wallis

Tabela J- 2 - Análise de regressão linear múltipla *stepwise* considerando os parâmetros de peroxidação lipídica, estresse oxidativo e inflamação como variáveis dependentes

Variáveis dependentes ^a	Variáveis independentes ^b	B±SE	p	R ²
Malondialdeído (μmol/mg proteína)	Mg eritrocitário (mmol/L)	-18,81±8,73	0,037	0,095
	Constante	65,92±20,04	0,002	
PAI-1 total (pg/mL)	Mg eritrocitário (mmol/L)	-110,6±50,64	0,034	0,100
	Constante	321,3±115,7	0,008	
Interleucina 1β (pg/mL)	Mg plasmático (mmol/L)	53,38±17,79	89,255	0,173
	Constante	-33,33±18,07	4,106	

B: coeficiente de regressão não padronizado; SE: erro padrão; p: probabilidade; R²: coeficiente de determinação; Mg: magnésio

^a variáveis independentes incluídas no modelo inicial: magnésio plasmático, magnésio eritrocitário, magnésio urinário, magnésio muscular, magnésio ósseo, consumo de magnésio, consumo de lipídios e índice de adiposidade.

Apesar de a peroxidação lipídica, o estresse oxidativo e a inflamação serem considerados fatores que podem ser influenciados pela deficiência de magnésio (RAYSSIGUIER *et al.*, 2006; NIELSEN *et al.*, 2007; BOPARAI *et al.*, 2007; MAZUR *et al.*, 2007), a ausência de alterações nestes parâmetros no presente estudo [ENSAIO PRINCIPAL] (**Tabela J-1**) indica que a influencia desse mineral possa ser posterior, considerando o nível de restrição de magnésio que foi imposto (66 % da recomendação). Por outro lado, é possível que os parâmetros usados para avaliação do *status* oxidativo e inflamatório não reflitam de forma evidentes alterações que possam estar ocorrendo, possivelmente por tratar-se de um evento inicial.

Embora fraca, a associação inversa do MDA com o magnésio eritrocitário (**Tabela J-2**), indica que as concentrações intracelulares de magnésio influenciam na peroxidação lipídica, e provavelmente não se alteraram pelo controle das enzimas antioxidantes, que se mantiveram adequadas (**Tabela J-1**). Relata-se a deficiência de magnésio também pode induzir a peroxidação lipídica (BOPARAI *et al.*, 2007), cuja indução seria, em parte, atribuída a redução do magnésio intracelular e aumento do cálcio citosólico, desencadeados por alterações na permeabilidade da membrana celular. Essas alterações iônicas induzem ao aumento da xantina oxidase e da hipoxantina dentro da célula, que quando não encontram concentrações adequadas de enzimas antioxidantes,

permeiam que ocorra o acúmulo de H_2O_2 e O_2 , e assim induzem ao estresse e a peroxidação lipídica (MALPUECH-BRUGÈRE *et al.*, 2000).

A inflamação também pareceu ter influencia das concentrações de magnésio. A relação inversa do magnésio eritrocitário como o PAI-1 total pode indicar que as concentrações intracelulares desse mineral podem influenciar na maior propensão a disfunção endotelial e maior agregação plaquetária, e assim propiciar a inflamação (RAYSSIGUIER *et al.*, 2006; MAZUR *et al.*, 2007). Por outro lado, a associação positiva da IL-1 β com o magnésio plasmático não ficou muito clara. Contudo, existem relatos de que diante da modificação da resposta fagocítica das células, o organismo modifica a sua compartimentalização e induz ao aumento do magnésio plasmático para se proteger dos efeitos adversos da inflamação (MALPUECH-BRUGÈRE *et al.*, 2000). É possível que isso ocorra como uma resposta inicial do organismo na tentativa de se defender, e possivelmente pode mudar ao longo do tempo.

Referências

- Boparai RK, Kiran R, Bansal DD. Insinuation of exacerbated oxidative stress in sucrose-fed rats with a low dietary intake of magnesium: evidence of oxidative damage to proteins. **Free Radic Res.** 2007; 41(9): 981-9. doi: 10.1080/10715760701447892
- Mahfouz MM, Kummerow FA. Effect of magnesium deficiency on $\Delta 6$ desaturase activity and fatty acid composition of rat liver microsomes. **Lipids** 1989; 24: 727-32.
- Malpuech-Brugère C, Nowacki W, Daveau M, Gueux E, Linard C, Rock E, *et al.* Inflammatory response following acute magnesium deficiency in the rat. **Biochim Biophys Acta** 2000; 1501(2-3): 91-8.
- Mazur A, Maier JAM, Rock E, Gueux E, Nowacki W, Rayssiguier Y. Magnesium and the inflammatory response: potential physiopathological implications. **Arch Biochem Biophys** 2007; 458: 48-56.
- Nielsen FH, Milne DB, Klevay LM, Gallagher S, Johnson L. Dietary magnesium deficiency induces heart rhythm changes, impairs glucose tolerance, and decreases serum cholesterol in post menopausal women. **J Am Coll Nutr** 2007; 26(2): 121-32.
- Rayssiguier Y, Gueux E, Nowacki W, Rock E, Mazur A. High fructose consumption combined with low dietary magnesium intake may increase the incidence of the metabolic syndrome by inducing inflammation. **Magnes Res** 2006; 19(4): 237-43.

ANEXOS

ANEXO A - Aprovação do comitê de ética em experimentação animal **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**
Comissão de Ética em Experimentação Animal1934 | 2009
USP/50 ANOS

Ofício CEEA/FCF/ 31 /2009

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"Efeito da deficiência dietética de magnésio na resistência insulínica e na resposta inflamatória em ratos alimentados com dieta hiperlipídica"** (Protocolo nº 221), de responsabilidade da pesquisadora **Cristiane Hermes Sales** sob a orientação da Profa. Dra. Célia Colli, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal – CEEA, desta Faculdade, em 11 de maio de 2009.

São Paulo, 12 de maio de 2009.

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal
CEEA/FCF/USP

ANEXO B - Rações experimentais usadas no ensaio piloto

Teklad Custom Research Diet Data Sheet

TD.06416 Adjusted Calories Diet (10/Fat)	
Formula	g/Kg
Casein	210.0
L-Cystine	3.0
Corn Starch	280.0
Maltodextrin	50.0
Lard	20.0
Soybean Oil	20.0
Cellulose	37.15
Sucrose	325.0
Mineral Mix, AIN-93G-MX (94046)	35.0
Calcium Phosphate, dibasic	2.0
Vitamin Mix, AIN-93-VX (94047)	15.0
Choline Bitartrate	2.75
Yellow Food Color	0.1

Key Features

- Purified Diet
- Diet Induced Obesity
- Control

Key Planning Information

- Products are made fresh to order
- Store product at 4°C or lower
- Use within 6 months (applicable to most diets)
- Box labeled with product name, manufacturing date, and lot number
- Replace diet at minimum once per week
More frequent replacement may be advised
- Lead time:
 - 2 weeks non-irradiated
 - 4 weeks irradiated

Product Specific Information

- 1/2" Pellet or Powder (free flowing)
- Minimum order 3 Kg
- Irradiation available upon request

Options (Fees Will Apply)

- Rush order (pending availability)
- Irradiation (see Product Specific Information)
- Vacuum packaging (1 and 2 Kg)

International Inquiry

- Outside U.S.A. or Canada
- askanutritionist@harlan.com

Place Your Order (U.S.A. & Canada)

- Place Order · Obtain Pricing · Check Order Status ·
- (800) 483-5523
- (608) 277-2066 facsimile
- tekladinfo@harlan.com

Helping you do research better

Footnote

Approx. 10% of total calories come from fat. Designed with similarities to Research Diets, Inc. formula D12450B. For the series TD 06414-TD 06416. Approximate fatty acid profile (% of total fat): 29% saturated, 37% monounsaturated, 34% polyunsaturated.

Selected Nutrient Information ¹		
	% by weight	% kcal from
Protein	18.6	20.1
Carbohydrate	64.7	69.8
Fat	4.2	10.2
Kcal/g	3.7	

¹ Values are calculated from ingredient analysis or manufacturer data

Teklad Diets are designed & manufactured for research purposes only.

Speak With A Nutritionist

- (800) 483-5523
- askanutritionist@harlan.com

Harlan Laboratories · PO Box 44220 · Madison, WI 53744-4220
www.harlan.com

harlan™

Harlan, Harlan Laboratories, Helping you do research better, and the Harlan logo are trademarks and trade names of Harlan Laboratories, Inc.
© 2008 Harlan Laboratories, Inc.

02/12/09

Teklad Custom Research Diet Data Sheet

TD.06414 Adjusted Calories Diet (60/Fat)

Formula	g/Kg
Casein	265.0
L-Cystine	4.0
Maltodextrin	160.0
Sucrose	90.0
Lard	310.0
Soybean Oil	30.0
Cellulose	65.5
Mineral Mix, AIN-93G-MX (94046)	48.0
Calcium Phosphate, dibasic	3.4
Vitamin Mix, AIN-93-VX (94047)	21.0
Choline Bitartrate	3.0
Blue Food Color	0.1

Footnote

Approx. 60% of total calories come from fat. Designed with similarities to Research Diets, Inc. formula D12492. For the series TD 06414-TD 06416. Approximate fatty acid profile (% of total fat): 37% saturated, 47% monounsaturated, 16% polyunsaturated.

Selected Nutrient Information¹

	% by weight	% kcal from
Protein	23.5	18.4
Carbohydrate	27.3	21.3
Fat	34.3	60.3

Kcal/g 5.1¹ Values are calculated from ingredient analysis or manufacturer data*Teklad Diets are designed & manufactured for research purposes only.***Speak With A Nutritionist**

- (800) 483-5523
- askanutritionist@harlan.com

Harlan Laboratories · PO Box 44220 · Madison, WI 53744-4220
www.harlan.com

Key Features

- Purified Diet
- Diet Induced Obesity
- High Fat

Key Planning Information

- Products are made fresh to order
- Store product at 4°C or lower
- Use within 6 months (applicable to most diets)
- Box labeled with product name, manufacturing date, and lot number
- Replace diet at minimum once per week
More frequent replacement may be advised
- Lead time:
 - 2 weeks non-irradiated
 - 4 weeks irradiated

Product Specific Information

- 1/2" Pellet or Powder (free flowing)
- Minimum order 3 Kg
- Irradiation available upon request

Options (Fees Will Apply)

- Rush order (pending availability)
- Irradiation (see Product Specific Information)
- Vacuum packaging (1 and 2 Kg)

International Inquiry

- Outside U.S.A. or Canada ·
- askanutritionist@harlan.com

Place Your Order (U.S.A. & Canada)

- Place Order · Obtain Pricing ·
- Check Order Status ·
- (800) 483-5523
- (608) 277-2066 facsimile
- tekladinfo@harlan.com

Helping you do research better

ANEXO C - Rações experimentais usadas no ensaio principal

Teklad Custom Research Diet Data Sheet

TD.110294 7% Soybean Oil Diet (500 Mg)

Formula	g/Kg
Casein	200.0
L-Cystine	3.0
Corn Starch	396.636
Maltodextrin	132.0
Sucrose	100.0
Soybean Oil	70.0
Cellulose	50.0
Mineral Mix (Mg Deficient) (05090)	35.0
Magnesium Oxide	0.85
Vitamin Mix, AIN-93-VX (94047)	10.0
Choline Bitartrate	2.5
TBHQ, antioxidant	0.014

Footnote

Diet is essentially AIN-93G, but uses a mineral mix without Mg and then adds Mg back to level of approximately 500 mg/kg. Series TD.110294-TD.110299.

Selected Nutrient Information¹

	% by weight	% kcal from
Protein	17.7	18.8
Carbohydrate	60.1	63.9
Fat	7.2	17.2

Kcal/g 3.8

¹Values are calculated from ingredient analysis or manufacturer data

Teklad Diets are designed & manufactured for research purposes only.

Speak With A Nutritionist

- (800) 483-5523
- askanutritionist@harlan.com

Harlan Laboratories · PO Box 44220 · Madison, WI 53744-4220
www.harlan.com

Key Features

- Purified Diet
- AIN-93G Modification
- Magnesium Adjusted
- Series

Key Planning Information

- Products are made fresh to order
- Store product at 4°C or lower
- Use within 6 months (applicable to most diets)
- Box labeled with product name, manufacturing date, and lot number
- Replace diet at minimum once per week
More frequent replacement may be advised
- Lead time:
 - 2 weeks non-irradiated
 - 4 weeks irradiated

Product Specific Information

- 1/2" Pellet or Powder (free flowing)
- Minimum order 3 Kg
- Irradiation not advised
 - Contact a nutritionist for recommendations

Options (Fees Will Apply)

- Rush order (pending availability)
- Irradiation (see Product Specific Information)
- Vacuum packaging (1 and 2 Kg)

International Inquiry

- Outside U.S.A. or Canada ·
- askanutritionist@harlan.com

Place Your Order (U.S.A. & Canada)

- Place Order · Obtain Pricing ·
- Check Order Status ·

- (800) 483-5523
- (608) 277-2066 facsimile
- tekladinfo@harlan.com

Helping you do research better

Teklad Custom Research Diet Data Sheet

TD.110297 25% Lard, 7% SBO Diet (500 Mg)

Formula	g/Kg
Casein	200.0
L-Cystine	3.0
Corn Starch	78.636
Maltodextrin	200.0
Sucrose	100.0
Lard	250.0
Soybean Oil	70.0
Cellulose	50.0
Mineral Mix (Mg Deficient) (05090)	35.0
Magnesium Oxide	0.85
Vitamin Mix, AIN-93-VX (94047)	10.0
Choline Bitartrate	2.5
TBHQ, antioxidant	0.014

Footnote

Modification of AIN-93G with 25% lard added at the expense of starch. Uses a mineral mix without Mg and then adds Mg back to level of approximately 500 mg/kg. No adjustment is made to make protein, vitamins, or mineral levels proportional to kcal density. Series TD.110294-TD.110299.

Selected Nutrient Information¹

	% by weight	% kcal from
Protein	17.7	13.8
Carbohydrate	37.9	29.6
Fat	32.2	56.6

Kcal/g 5.1

¹ Values are calculated from ingredient analysis or manufacturer data

Teklad Diets are designed & manufactured for research purposes only.

Speak With A Nutritionist

- (800) 483-5523
- askanutritionist@harlan.com

Harlan Laboratories · PO Box 44220 · Madison, WI 53744-4220
www.harlan.com

Key Features

- Purified Diet
- AIN-93G Modification
- High Fat - Lard
- Series

Key Planning Information

- Products are made fresh to order
- Store product at 4°C or lower
- Use within 6 months (applicable to most diets)
- Box labeled with product name, manufacturing date, and lot number
- Replace diet at minimum once per week

More frequent replacement may be advised

- Lead time:
 - 2 weeks non-irradiated
 - 4 weeks irradiated

Product Specific Information

- 1/2" Pellet or Powder (free flowing)
- Minimum order 3 Kg
- Irradiation not advised
 - Contact a nutritionist for recommendations

Options (Fees Will Apply)

- Rush order (pending availability)
- Irradiation (see Product Specific Information)
- Vacuum packaging (1 and 2 Kg)

International Inquiry

- Outside U.S.A. or Canada ·
- askanutritionist@harlan.com

Place Your Order (U.S.A. & Canada)

- Place Order · Obtain Pricing ·
- Check Order Status ·

- (800) 483-5523
- (608) 277-2066 facsimile
- tekladinfo@harlan.com

Helping you do research better

TD.110299 25% Lard, 7% SBO Diet (150 Mg)

Formula	g/Kg
Casein	200.0
L-Cystine	3.0
Corn Starch	79.226
Maltodextrin	200.0
Sucrose	100.0
Lard	250.0
Soybean Oil	70.0
Cellulose	50.0
Mineral Mix (Mg Deficient) (05090)	35.0
Magnesium Oxide	0.26
Vitamin Mix, AIN-93-VX (94047)	10.0
Choline Bitartrate	2.5
TBHQ, antioxidant	0.014

Footnote

Modification of AIN-93G with 25% lard added at the expense of starch. Uses a mineral mix without Mg and then adds Mg back to level of approximately 150 mg/kg. No adjustment is made to make protein, vitamins, or mineral levels proportional to kcal density. Series TD.110294-TD.110299.

Selected Nutrient Information¹

	% by weight	% kcal from
Protein	17.7	13.8
Carbohydrate	38.0	29.7
Fat	32.2	56.5

Kcal/g 5.1

¹ Values are calculated from ingredient analysis or manufacturer data

Teklad Diets are designed & manufactured for research purposes only.

Speak With A Nutritionist

- (800) 483-5523
- askanutritionist@harlan.com

Harlan Laboratories · PO Box 44220 · Madison, WI 53744-4220
www.harlan.com

Harlan, Harlan Laboratories, Helping you do research better,
 and the Harlan logo are trademarks and trade names of Harlan Laboratories, Inc.
 © 2006 Harlan Laboratories, Inc.

Key Features

- Purified Diet
- AIN-93G Modification
- High Fat - Lard
- Series

Key Planning Information

- Products are made fresh to order
- Store product at 4°C or lower
- Use within 6 months (applicable to most diets)
- Box labeled with product name, manufacturing date, and lot number
- Replace diet at minimum once per week
More frequent replacement may be advised
- Lead time:
 - 2 weeks non-irradiated
 - 4 weeks irradiated

Product Specific Information

- 1/2" Pellet or Powder (free flowing)
- Minimum order 3 Kg
- Irradiation not advised
 - Contact a nutritionist for recommendations

Options (Fees Will Apply)

- Rush order (pending availability)
- Irradiation (see Product Specific Information)
- Vacuum packaging (1 and 2 Kg)

International Inquiry

- Outside U.S.A. or Canada ·
- askanutritionist@harlan.com

Place Your Order (U.S.A. & Canada)

- Place Order · Obtain Pricing ·
- Check Order Status ·

- (800) 483-5523
- (608) 277-2066 facsimile
- tekladinfo@harlan.com

Helping you do research better

ANEXO D - Informações do programa de pós-graduação para os membros julgadores **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

Secretaria de Pós-Graduação

**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de 30 minutos.
2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de 30 minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de 30 minutos para sua resposta.
 - 2.1. Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até 60 minutos por examinador.
 - 2.2. Tempo máximo total de arguição: 3 horas para o mestrado e 5 horas para o doutorado.
3. A sessão de defesa será aberta ao público.
4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.
 - 4.1. Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.
 - 4.2. Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.
5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 26 de maio de 2011.

Prof^a. Dr^a. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO E - Ficha do aluno

Ficha do Aluno

<https://uspdigital.usp.br/janus/alunoGeral/ficha/fichaDoAlunoParaImp...>

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9132 - 5763435/2 - Cristiane Hermes Sales

Email:

Data de Nascimento:

Cédula de Identidade:

Local de Nascimento:

Nacionalidade:

Graduação:

Nutricionista - Universidade Federal do Rio Grande do Norte - Rio Grande do Norte - Brasil - 2005

Mestrado:

Mestre em Ciência dos Alimentos - Área: Nutrição Experimental - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2008

Curso:

Doutorado

Programa:

Ciência dos Alimentos

Área:

Nutrição Experimental

Data de Matrícula:

23/03/2009

Início da Contagem de Prazo:

23/03/2009

Data Limite:

25/03/2013

Orientador:

Prof(a). Dr(a). Celia Colli - 23/03/2009 até o presente.

Proficiência em Línguas:

Inglês, Aprovado em 23/03/2009

Data de Aprovação no Exame de Qualificação:

Aprovado em 04/06/2012

Data do Depósito do Trabalho:

Título do Trabalho:

Data Máxima para Aprovação da Banca:

Data de Aprovação da Banca:

Data Máxima para Defesa:

Data da Defesa:

Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências:

Ingressou no Doutorado em 23/03/2009

Matrícula de Acompanhamento em 18/02/2013

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/02/2013

Impresso em: 24/02/13 11:16:16