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

Restrição dietética de magnésio associada à dieta hiperlipídica: implicações sobre a homeostase do mineral e sensibilidade à insulina

AMANDA BATISTA DA ROCHA ROMERO

Tese para obtenção do título de
DOUTOR

Orientadora: Profª Drª Célia Colli

São Paulo
2018

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

Restrição dietética de magnésio associada à dieta hiperlipídica: implicações sobre a homeostase do mineral e sensibilidade à insulina

AMANDA BATISTA DA ROCHA ROMERO

Versão Original

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de DOUTOR.

São Paulo
2018

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

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

R763r

Romero, Amanda Batista da Rocha
Restrição dietética de magnésio associada à dieta hiperlipídica: implicações sobre a homeostase do mineral e sensibilidade à insulina / Amanda Batista da Rocha Romero. - São Paulo, 2018.
88 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Colli, Celia

1. Obesidade. 2. Resistência à insulina. 3. Magnésio . 4. TRPM6. 5. TRPM7. I. T. II. Colli, Celia , orientador.

AMANDA BATISTA DA ROCHA ROMERO

Restrição dietética de magnésio associada à dieta hiperlipídica: implicações sobre a homeostase do mineral e sensibilidade à insulina

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do título de DOUTOR

_____

Orientadora/Presidente

_____

1º Examinador

_____

2º Examinador

_____

3º Examinador

São Paulo, ___ de _____ de 2018.

Aos meus pais: minha fortaleza,
Às minhas irmãs e sobrinhos: minha alegria e esperança
Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, toda honra e glória a **Deus**, que guia meus passos e me leva sempre pelo caminho mais seguro. Foram inúmeras bênçãos concedidas e graças alcançadas.

Meus maiores agradecimentos ao meu pai **Luiz Romero Lima**, meu grande amor e mestre; à minha mãe **Izabel Cristina**, luz da minha vida, a quem eu devo tudo que sou; às minhas irmãs, **Ana Carolina** e **Teresa de Lisieux**, minhas melhores amigas, por terem suportado comigo a dor da saudade em nome do meu grande sonho. Toda a minha família embarcou comigo há 5 anos quando decidi vir para São Paulo e permaneceu ao meu lado todos os dias. A certeza que eles estavam orgulhosos e felizes com a minha escolha me fez seguir em frente.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Célia Colli**, pela oportunidade, confiança e preciosos ensinamentos que ultrapassaram os muros da pós-graduação.

Ao programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos da FCF/USP, especialmente ao **Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento**, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Agradeço, de todo coração, aos colegas de laboratório **Alexandre Rodrigues Lobo**, pelo auxílio na concepção do projeto; **Ana Lina de Carvalho**, pelo carinho que me dedica e por tanto apoio sempre; **Eduardo De Carli**, pelos grandes ensinamentos e boas gargalhadas; **Gisele Cristina Dias**, pela palavra amiga e torcida e agradeço especialmente à **Fabiana da Silva Lima**, por ter sido minha grande parceira e incentivadora. Senti muito a falta de todos nos últimos anos do doutorado.

Sinceros agradecimentos aos amigos que a pós-graduação me trouxe: **Bruna Zavarize**, um verdadeiro anjo na minha vida, a quem eu sou eternamente grata por tanto carinho e apoio, por acreditar tanto em mim e me incentivar a ir cada vez mais longe; **Ernesto Vargas**, nosso gringo preferido que muito nos ensinou; **Graziela Biude**, nosso mascotinho, pelos conselhos, amizade e companheirismo; **José Augusto Sattler**, o Gutinho, pelos momentos de descontração e conversas sobre o futuro; **Luciana Yoshime**, uma das pessoas mais iluminadas que conheço; **Mayara**

Miranda, pela luta diária e palavras de conforto; **Janaína Donadio**, sinônimo de energia positiva e alegria; **Kristy Coelho**, pelo companheirismo e **Marina Nogueira**, pelo acolhimento. Cada palavra de incentivo, conversas longas sobre sonhos e projetos de vida, puxões de orelha, cafés entre uma análise e outra, almoços no bandejão foram muito importantes para me fortalecer e confiar que tudo realmente daria certo. Obrigada por terem sido tão generosos comigo e por terem segurado a minha mão nos momentos em que mais precisei.

Ao **André Buzolin**, meu porto seguro, por ser um grande incentivador dos meus sonhos. A vida é mais leve e feliz ao seu lado.

Aos professores que, gentilmente, disponibilizaram os seus laboratórios para que eu pudesse realizar parte dos procedimentos que compuseram esse estudo e me transmitiram grandes ensinamentos e mensagens de incentivo: **Profa. Lílian Sá**, **Prof. Ricardo Fock**, **Prof. Fernando Salvador Moreno**, **Prof. Julio Tirapegui** e **Profa. Silvia Cozzolino** e, um agradecimento especial ao **Prof. Dennys Esper Cintra**. Aos técnicos e funcionários do departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, especialmente **Roberta Uehara**, **Edilson Feitosa** e **Lurdinha** pelo auxílio quando mais precisamos. Agradeço também aos técnicos **Walter Turato**, **Nilton** e **Edson Makiyama**.

Aos funcionários do biotério do Instituto de Química da USP pelo auxílio durante o período experimental: **Renata Fontes**, **Flávia de Moura Prates Ong** e especialmente à **Silvânia Meiry Neves**, por toda assistência e confiança no meu trabalho.

E a todos que contribuíram para a realização desse momento, muito obrigada!

"Às vezes cremos que o que conseguimos é apenas uma gota no oceano. Mas, sem ela, o oceano estaria incompleto".
(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

ROMERO, A.B.R. Restrição dietética de magnésio associada à dieta hiperlipídica: implicações sobre a homeostase do mineral e sensibilidade à insulina. 2018. Tese [Doutorado em Ciência dos Alimentos] – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A resistência dos tecidos à ação da insulina é uma das principais complicações do excesso de peso. O aumento da gordura corporal, decorrente do consumo excessivo de nutrientes, é acompanhado por um quadro de inflamação crônica de baixa intensidade que está relacionado com a fisiopatologia da resistência à insulina. O magnésio (Mg) é um mineral envolvido com diversos processos fisiológicos e bioquímicos, especialmente aqueles relacionados ao metabolismo energético e ao controle glicêmico. Apesar de a deficiência deste mineral estar relacionada com condições pré-diabéticas, não está claro se a inadequação dietética promove alterações na sensibilidade à insulina e/ou se condições de resistência à insulina causam distúrbios na homeostase de Mg. O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da restrição dietética de Mg e sua associação com o excesso de lipídios sobre a homeostase do mineral e a sensibilidade à insulina. Ratos Wistar, machos, com peso entre 97–123 g, permaneceram em gaiolas individuais por 24 semanas. Os animais receberam rações normolipídicas (CON, 7% de lipídios) ou hiperlipídicas (HL, 32% de lipídios), adequadas (CON e HL Mg; 500 mg de Mg/kg de ração; n = 6 para cada grupo) ou com restrição de Mg (Mg[50] e HL Mg[50]; 50 mg de Mg/kg de ração; n = 6 para cada grupo). O consumo da dieta HL promoveu maior acúmulo de tecido adiposo e maior ganho de peso corporal ($p < 0,05$). Os animais que consumiram rações com restrição de Mg apresentaram hipomagnesemia ($p<0,01$), menor excreção urinária ($p < 0,01$) e fecal ($p < 0,001$) de Mg e menor concentração óssea desse mineral ($p < 0,001$). No entanto, não foram observadas alterações no Mg muscular ($p > 0,05$). O grupo HL Mg[50] apresentou maior concentração de Mg no eritrócito quando comparado aos outros grupos. A restrição dietética de Mg, isoladamente, não promoveu alterações na sensibilidade à insulina (avaliada pelo teste de tolerância à insulina). Quando associada à dieta hiperlipídica, resultou em aumento da glicemia de jejum e em redução da sensibilidade à insulina, após 16 semanas ($p < 0,01$). Em nível molecular, a fosforilação da proteína quinase B (Akt) no músculo e no fígado foi significantemente menor no grupo HL Mg[50] ($p < 0,05$). A restrição dietética de Mg induziu ao aumento do conteúdo proteico dos canais TRPM6 e TRPM7 no rim, independentemente da sensibilidade à insulina. Os resultados deste estudo apontam que a deficiência de Mg tende a agravar as repercussões metabólicas do consumo de dietas hiperlipídicas na sensibilidade à insulina e que a resistência à insulina altera a compartimentalização do Mg.

Palavras-chave: Obesidade; resistência à insulina; deficiência de magnésio; TRPM6; TRPM7.

ABSTRACT

ROMERO, A.B.R. Dietary magnesium restriction associated with a high-fat diet: implications on mineral homeostasis and insulin sensitivity. 2018. Thesis [Doctor Degree in Food Science] – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, 2018.

Insulin resistance is one of the main complications of overweight. Increase body fat, due to excessive consumption of nutrients is accompanied by a chronic low-grade inflammation related to insulin resistance pathophysiology. Magnesium (Mg) is a mineral involved in many physiological and biochemical processes, especially those related to energy metabolism and glycemic control. Although Mg deficiency is related to pre-diabetic conditions, it is unclear whether dietary inadequacy promotes changes in insulin sensitivity and/or if conditions of insulin resistance cause disturbances in Mg homeostasis. This work aimed to investigate the effects of dietary Mg restriction and its association with high-fat diet on mineral homeostasis and insulin sensitivity. Male Wistar rat (97-123 g) remained in individual cages for 24 weeks. Animals received normolipid diet (CON, 7% lipid) or high-fat diet (HF, 32% lipid), adequate (CON and HF, 500 mg Mg / kg diet, n = 6 for each group) or Mg restricted (Mg[50] and HF Mg[50], 50 mg of Mg / kg of diet, n = 6 for each group). High-fat diet promoted a greater adipose tissue excess and body weight gain ($p<0.05$). Animals with Mg restricted diet had hypomagnesemia ($p<0.01$), lower Mg urinary ($p<0.01$) and faecal loss ($p<0.001$) and lower bone Mg concentration ($p<0.001$). However, no changes were observed in muscle Mg ($p>0.05$). HF Mg[50] group presented higher concentration of erythrocyte Mg when compared to the other groups. Singly, dietary Mg restriction did not induce changes in insulin sensitivity (as assessed by the insulin tolerance test). When associated with high-fat diet, dietary Mg restriction resulted in higher fasting glycemia and lower insulin sensitivity after 16 weeks ($p<0.01$). At the molecular level, protein kinase B (Akt) phosphorylation in muscle and liver was significantly lower in HFMg [50] group ($p<0.05$). Dietary Mg restriction induced increased protein content of renal TRPM6 and TRPM7 channels, regardless of insulin sensitivity. The results of this study indicate that Mg deficiency worsens metabolic effects of high-fat diet on insulin sensitivity. In addition, insulin resistance changes Mg compartmentalization.

Keywords: Obesity; insulin resistance; magnesium deficiency; TRPM6; TRPM7.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Transporte epitelial do Mg. 22
Figura 2. Deficiência de Mg e resistência à insulina. 27
Figura 3. Delineamento experimental. 34
Figura 4. Imagens obtidas por DXA. 45
Figura 5. Fotomicrografia do fígado dos animais. 46
Figura 6. Concentração de citocinas no tecido adiposo retroperitoneal dos animais 48
Figura 7. Status de magnésio. 49
Figura 8. Parâmetros de sensibilidade à insulina dos animais. 50
Figura 9. Concentração de insulina plasmática nos animais após estímulo intraperitoneal 51
Figura 10. Estado de fosforilação da proteína quinase B no músculo (A), fígado (B) e no rim (C) dos animais. 52
Figura 11. Conteúdo proteico dos canais TRPM6 (A) e TRPM7 (B) no rim dos animais 53
Figura 12. Fotomicrografias de imunomarcação positiva de canais TRPM7 em tecido renal 54
Figura 13. Expressão dos genes TRPM6 (A) e TRPM7 (B) no rim dos animais 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formulação das rações experimentais.....35
Tabela 2. Composição química das rações (baseadas na AIN).....42
Tabela 3. Consumo de ração durante 24 semanas de experimento. 43
Tabela 4. Pesos e composição corporal dos animais. 44
Tabela 5. Determinações plasmáticas de AST, ALT e perfil lipídico dos animais.....47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIN – *American Institute of Nutrition*

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

Akt – Proteína quinase B

BRAZOS – *Brazilian Osteoporosis Study*

CEA – Coeficiente de Eficácia Alimentar

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

Ct – *Threshold cycle*

DMO – Densidade Mineral Óssea

EAR – Ingestão Média Recomendada

EAA – Espectrofotometria de absorção atômica

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FCF – Faculdade de Ciências Farmacêuticas

GLUT – Transportadores de glicose

Hb – Hemoglobina

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HNO_3 – Ácido nítrico

HOMA-IR – *Homeostasis Model Assessment for Insulin Resistance*

IA – Índice de Adiposidade

IL-6 – Interleucina 6

IL-1β – Interleucina 1β

IKK β – Quinase β do inibidor do fator nuclear-kB

IR-β – Receptor de insulina

IRS – Substrato do receptor de insulina

JNK – c-Jun N-terminal Kinase

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

MLG – Massa livre de gordura

Mg – Magnésio

MgO – Óxido de magnésio

NHANES – *National Health and Nutrition Examination Survey*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PI3K – Fosfatidilinositol 3-quinase

POF – Pesquisa de Orçamento Familiar

PTP1B – Proteína tirosina fosfatase 1B

QUICKI – *Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*

SDS – Dodecil sulfato de sódio

TAE – Tecido adiposo epididimal

TAR – Tecido adiposo retroperitoneal

TTI – Teste de tolerância à insulina

TBHQ – TercButil Hidroquinona

TNF-α – Fator de necrose tumoral

TRPM6 – Receptor de potencial transiente, subfamília melastatina 6

TRPM7 – Receptor de potencial transiente, subfamília melastatina 7

USP – Universidade de São Paulo

VET – Valor Energético Total

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 16

2. REVISÃO DA LITERATURA 19

2.1 RESISTÊNCIA À INSULINA: ETIOLOGIA E REPERCUSSÕES METABÓLICAS 19

2.2 MAGNÉSIO: FUNÇÕES E METABOLISMO 21

2.3 AVALIAÇÃO DO *STATUS* DE MAGNÉSIO 23

2.4 MAGNÉSIO E DOENÇAS METABÓLICAS 25

3. HIPÓTESE 29

4. OBJETIVOS 31

4.1 GERAL 31

4.2 ESPECÍFICOS 31

5. MATERIAL E MÉTODOS 33

5.1 ANIMAIS 33

5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 33

5.3 FORMULAÇÃO DAS RAÇÕES EXPERIMENTAIS 34

5.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS RAÇÕES 35

5.5 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CORPORAL 36

5.6 AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA À INSULINA 36

5.7 AVALIAÇÃO DO *STATUS* DE MAGNÉSIO 36

5.8 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA 37

5.9 *STATUS* INFLAMATÓRIO 37

5.10 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS 37

5.11 DETERMINAÇÃO DE INSULINA 38

5.12 WESTERN-BLOT 38

5.13 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE CDNA 39

5.14 PCR EM TEMPO REAL 39

5.15 AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA 40

5.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA 40

6. RESULTADOS 42

7. DISCUSSÃO 57

8. CONCLUSÃO 63

REFERÊNCIAS 65

ANEXO 75

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A resistência à insulina é uma condição metabólica em que há redução da resposta celular à ação da insulina em tecidos-alvo, relacionada principalmente a interferências na sua sinalização envolvendo a via PI3-K/Akt (JANUS et al., 2016) e constitui-se um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 (SANTOS et al., 2006).

Modificações na sensibilidade periférica à insulina decorrem de múltiplos fatores, dentre os quais: 1) a ativação de vias metabólicas que favorecem um quadro de inflamação sistêmica de baixa intensidade, relacionada com a ingestão excessiva de energia, especialmente gorduras (LAUGERETTE et al. 2011) e 2) alterações no *status* de determinados micronutrientes essenciais para a secreção e ação da insulina, dentre os quais o magnésio (Mg), em decorrência de inadequação alimentar e modificações na sua compartimentalização (JOHNSON; OLEFSKY, 2013; DA ROCHA ROMERO et al, 2017).

O Mg é o segundo cátion intracelular em maior concentração no organismo e é o quarto mais prevalente no corpo humano (SUGIMOTO, 2012). Considera-se que este mineral é versátil, uma vez que exerce funções estruturais e dinâmicas que incluem a sua participação na formação de substrato enzimático, atuação como um ativador alostérico de várias reações, modulação da função de canais iônicos e estabilização de membranas celulares. A função mais reconhecida do Mg é a sua atuação, associado ao ATP, na ativação ou desativação de vias de transdução de sinal, por exemplo, na sinalização da insulina (WOLF; TRAPANI, 2008).

O crescente interesse na elucidação dos processos pelos quais o Mg participa da regulação de diversas funções biológicas levou ao desenvolvimento de metodologias de pesquisa para detectar e medir variações na concentração de Mg em diferentes tecidos. A partir daí, então, a relação entre essas variações com a homeostase do mineral e patologias específicas puderam ser identificadas (ROMANI, 2011).

As discussões sobre alterações na sensibilidade à insulina têm relacionado essa condição não somente ao excesso de peso, mas também à deficiência de magnésio, com base nos efeitos do magnésio intracelular na transdução do sinal da insulina (BARBAGALLO et al., 2003). E ainda, evidências sugerem que uma desregulação na disponibilidade e no metabolismo de Mg pode ser considerada a

causa e/ou consequência de condições fisiopatológicas como doenças cardiovasculares, hipertensão, diabetes e síndrome metabólica (WOLF; TRAPANI, 2008).

Portanto, considerando que tanto o *status* de Mg no organismo quanto a inadequação alimentar, especialmente o consumo excessivo de lipídios, podem influenciar a sensibilidade à insulina, o presente estudo se propôs a investigar as repercussões da restrição dietética de Mg e do consumo de dieta hiperlipídica na homeostase do mineral e na sinalização da insulina.

Revisão da Literatura

“ O desenvolvimento intelectual do ser humano tem um caminho seguro: a leitura”
(Luiz Romero Lima)

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Resistência à insulina: etiologia e repercussões metabólicas

O termo resistência à insulina refere-se à sensibilidade reduzida dos tecidos periféricos à ação desse hormônio, principalmente os tecidos adiposo, muscular e hepático. Essa condição promove redução do transporte e metabolismo da glicose no adipócito e no músculo esquelético, bem como o aumento da liberação de glicose hepática e, consequentemente, a resistência à insulina predispõe ao surgimento de diabetes tipo 2 (SUMMERS, 2006).

O comprometimento da resposta dos tecidos à ação da insulina deve-se principalmente à redução da concentração e atividade quinase do receptor de insulina, dos substratos do receptor de insulina 1 e 2 (IRS 1 e 2), fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), proteína quinase B (Akt) e da translocação dos transportadores de glicose (GLUT) para a membrana plasmática (PESSIN, SALTIEL; 2000; ZECCHIN, CARVALHEIRA, SAAD, 2004).

A resistência à insulina constitui-se em uma complicação central do excesso de peso e obesidade (SUMMERS, 2006). O aumento da gordura corporal leva ao aumento da circulação de ácidos graxos livres (lipotoxicidade) e a deposição destes em tecidos não destinados à deposição de gordura, tais como músculo esquelético e fígado. Esses tecidos apresentarão alterações no metabolismo da glicose pela ação de produtos do metabolismo dos ácidos graxos, como ceramidas e diacilglicerol, e pela competição entre os substratos energéticos, que resultam em resistência à insulina pela fosforilação excessiva dos resíduos de serina do IRS-1 (RZHESHEVSKY, 2013). Esse mecanismo deve-se à presença de um resíduo de serina próximo ao domínio tirosina fosfatase no IRS-1, que pode ser fosforilado por uma série de mecanismos, incluindo quinases ativadas pela insulina ou quinases como *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK) (AGUIRRE *et al*, 2002).

Além da lipotoxicidade, o excesso de gordura corporal pode promover um quadro inflamatório crônico e de baixa intensidade, como mostram alguns estudos realizados em animais e humanos (CAI et al., 2005; SHOELSON et al., 2007). Nesse aspecto, o aumento do número de macrófagos ativos no tecido adiposo, em particular no tecido adiposo visceral, é precedido pela síntese de moléculas de adesão nas células endoteliais e pela migração de monócitos do sangue para o tecido adiposo (WEINBERG et al., 2003; SHOELSON et al., 2007). O recrutamento e

a infiltração de macrófagos levam à inflamação local, importante no desencadeamento da resistência periférica à insulina cuja etiologia está diretamente relacionada com o aumento da concentração plasmática de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF-α) e a interleucina 6 (IL- 6) (SHOELSON et al., 2007).

A IL-6 foi a primeira citocina pró-inflamatória a ser considerada capaz de induzir a resistência à insulina em indivíduos obesos. Esta citocina age reduzindo a síntese hepática de glicogênio e a captação de glicose nos adipócitos e no músculo esquelético, por inibir a interação do receptor de insulina com o IRS-1 e a translocação do transportador de glicose GLUT-4 para a membrana plasmática além de estimular a degradação das proteínas do substrato do receptor de insulina (KWON; PESSIN, 2013; OUCHI *et al*, 2011; SABIO *et al*, 2008). Além desses aspectos, a IL-6 inibe a produção de adiponectina, que aumenta a sensibilidade à insulina e consequente captação de glicose pelas células e estimula simultaneamente a síntese de TNF-α (RZHESHEVSKY, 2013).

O TNF-α reduz a sensibilidade do GLUT-4 e inibe a fosforilação em tirosina tanto do IR quanto do IRS-1, pela ativação da quinase β do inibidor do fator nuclear-kB (IKKβ), da quinase p38 MAP (p38MAPK) e da proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B). A IKKβ e a p38MAPK promovem a fosforilação em serina e a degradação proteassômica do IRS-1, enquanto a enzima PTP1B favorece a desfosforilação do resíduo tirosina, inibindo a cascata de sinalização da insulina (CAPURSO; CAPURSO, 2012; YE, 2013). Diante do exposto, o entendimento das alterações na via da insulina em situação de resistência a este hormônio, em diferentes tecidos, parece ser chave para a compreensão da sua etiologia.

Além dos efeitos do acúmulo de gordura corporal na inflamação crônica de baixa intensidade e suas repercussões na sensibilidade à insulina, tem-se discutido a importância da deficiência de minerais, em particular o magnésio (Mg), na etiologia dessa desordem metabólica (OLIVEIRA et at., 2017). A deficiência subclínica de Mg, induzida pelo seu baixo consumo, consiste em um fator de risco para doenças crônicas como doenças cardiovasculares e diabetes (NIELSEN, 2014). Nos itens a seguir, algumas considerações importantes sobre esse mineral.

2.2 Magnésio: funções e metabolismo

O magnésio é o segundo cátion intracelular em maior concentração no organismo e é o quarto cátion mais prevalente no corpo humano. É cofator para mais de 300 reações enzimáticas, em particular, aquelas relacionadas com a síntese de DNA, RNA e proteica, sendo fator importante no controle da proliferação celular (SUGIMOTO, 2012; BAAIJ et al., 2012).

Cerca de 60% do Mg no organismo encontra-se nos tecidos mineralizados (ossos e dentes), e os 40% restantes estão distribuídos no músculo esquelético e outros tecidos (RUDE; GRUBER, 2004). A concentração sérica de Mg é regulada pelo equilíbrio entre absorção intestinal (principalmente no jejuno proximal e íleo), excreção e reabsorção urinária, retenção e mobilização ósseas (ARNAUD, 2008).

A absorção intestinal de Mg ocorre por transporte passivo (paracelular), portanto não saturável, quando são atingidas concentrações acima de 20 mEq/L no lúmen intestinal, bem como por transporte ativo (transcelular), saturável, em concentrações intraluminais de até 20 mEq/L, sendo este o principal mecanismo atuante em casos de restrição dietética (ALEXANDER et al., 2008). O transporte ativo é feito por meio dos canais TRPM6 e TRPM7 (receptor de potencial transiente, subfamília melastatina 6 e 7), canais iônicos de peso molecular aproximado de 230 KDa fundidos com uma α-quinase – característica atípica que confere aos mesmos o nome de “chanzimas” (Figura 1) (SCHLINGMANN; GUDERMANN, 2005). O TRPM6 é abundante nos intestinos (principalmente no íleo, ceco e cólon) e também está presente na membrana apical do túbulo contorcido distal do rim, sendo responsável pela reabsorção renal do mineral. (NADERI; REILLY JR., 2008; GROENESTEGE *et al.*, 2006). Já o TRPM7 está presente em todos os tipos celulares e pode ser um importante sensor da homeostase de magnésio (SCHLINGMANN *et al.*, 2007; NAIR *et al.*, 2012).

Assim, os rins são fundamentais para a homeostase do Mg uma vez que sua concentração sérica é controlada principalmente pela modulação da sua excreção na urina. Em condições fisiológicas, aproximadamente 2400 mg de magnésio plasmático são filtrados pelos glomérulos e desses, cerca de 95% são imediatamente reabsorvidos, ou seja, de 3 a 5% são excretados na urina (JAHNEN-DECHENT; KETTELER, 2012).

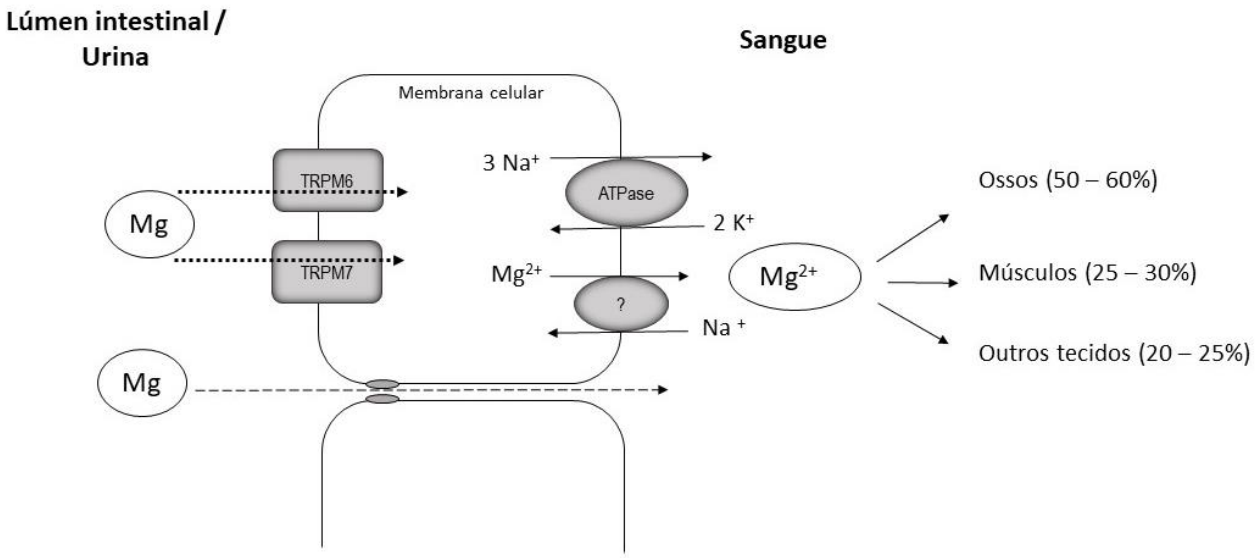

Figura 1. Transporte epitelial do Mg. O Mg é absorvido no lúmen intestinal e reabsorvido nos rins por via paracelular (linha tracejada) e via transcelular (linha pontilhada). O transporte paracelular é realizado através das *tight junctions*, que são compostas por várias proteínas, principalmente as claudinas. Já a via transcelular, via preferencial do túbulo contorcido distal (TCD) dos rins, é mediada por canais. A figura enfatiza o influxo de Mg nas células epiteliais do TCD e do enterócito mediado pelos canais TRPM6 e TRPM7. O efluxo é efetuado por carreador de identidade desconhecida, por meio de contra-transporte Na^+/Mg^{2+}. Após a entrada de Mg no compartimento sanguíneo, o mineral é distribuído para os ossos, músculos e outros tecidos.
Adaptada de Hoenderop; Bindels, 2005 e Giménez-Mascarell et al., 2018.

Como já mencionado, o maior compartimento corporal de Mg é o osso, onde parte desse conteúdo está na superfície e parte na matriz óssea. O Mg de superfície funciona como um tampão para manter a concentração extracelular do mineral constante: quando há redução da concentração plasmática ocorre rápida liberação do Mg ligado à superfície do osso para o compartimento sanguíneo (ALFREY; MILLEY, 1973). A redução de magnésio no plasma para concentrações entre 0,4 – 0,5 mmol/L (hipomagnesemia grave) é uma condição relativamente rara e é frequentemente associada a distúrbios hidroeletrolíticos como hipocalemia e acidose metabólica. Sinais e sintomas da hipomagnesemia grave incluem fraqueza, apatia, tetania, parestesia e arritmia (AYUK; GITTOES, 2011).

2.3 Avaliação do *status* de magnésio

Atualmente, o método mais utilizado para avaliar o *status* de magnésio em humanos é a sua determinação sérica, cujo valor de referência é em torno de 0,7 a 1,05 mmol/L (BAAIJ et al., 2012). No entanto, apesar de ser o método mais disponível, o conteúdo de Mg no soro pode não refletir adequadamente as reservas corporais devido à sua distribuição fisiológica (HANSEN; BRUSERUD, 2018). Portanto, a incorporação de outros métodos laboratoriais que reflitam o estoque corpóreo desse mineral deve ser encorajada (DA ROCHA ROMERO et al., 2017).

A biópsia de músculos e ossos, os principais compartimentos de estoque de Mg, permite avaliar com segurança o *status* desse mineral no organismo e é muito utilizada em estudos experimentais. Porém, essa metodologia é invasiva e inviável na rotina clínica. Outro método laboratorial inclui a determinação de magnésio intracelular (leucocitário e eritrocitário), urinário e o fecal, que poderiam ser facilmente adaptados ao laboratório de análises clínicas (SALES et al., 2012). O teste de tolerância ao magnésio é outro método que pode ser utilizado para investigar sua deficiência, e desde que o paciente seja rigorosamente acompanhado em ambulatório durante a análise, o teste é reprodutível, seguro e confiável (GULLESTAD et al., 1992).

Os resultados dos exames laboratoriais para investigação da deficiência de Mg, principalmente quando um único biomarcador para diagnóstico é utilizado, devem ser avaliados com cautela, uma vez que a depleção de magnésio em outros compartimentos como o intracelular e ósseo podem coexistir com níveis normais de magnésio no soro (ARNAUD, 2008; WILLIAM; DANZINGER, 2015). Por exemplo, mulheres obesas com baixa ingestão dietética de Mg exibiram concentrações plasmáticas e eritrocitárias normais de Mg e menor excreção urinária do mineral (DE OLIVEIRA et al., 2015). Assim, detectar a prevalência da deficiência desse mineral na população pode ainda ser um desafio e o impacto do consumo inadequado de Mg pode ser subestimado (SUGIMOTO et al., 2012; BAAIJ et al., 2012).

Diante das limitações laboratoriais apresentadas para a identificação de hipomagnesemia, pesquisas devem ser incentivadas com o objetivo de avaliar o consumo de Mg e seu papel na saúde da população, já que a ingestão dietética deste micronutriente pelo ser humano tem diminuído consideravelmente no último

século (KANADHIA et al., 2014). Muitos dados interessantes na área de consumo alimentar são citados a seguir.

Dados do *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) indicaram que aproximadamente 60% de todos os adultos americanos avaliados não atingem a ingestão média recomendada (EAR) para Mg (NIELSEN, 2014). No Brasil, a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF 2008-2009) realizada em todas as regiões do país avaliou o consumo alimentar de 34.000 indivíduos por meio de registros alimentares e aponta que a prevalência da inadequação da ingestão de magnésio é alta (superior a 70%), principalmente em áreas urbanas. O magnésio está entre os nutrientes com os maiores percentuais de inadequação de ingestão na faixa etária de 19 a 59 anos, para ambos os sexos, estimada pela proporção de indivíduos com consumo abaixo do valor de EAR (de 255 a 265 para mulheres e 330 a 350 para homens) (BRASIL, 2011).

Ainda, um estudo conduzido com estudantes de uma universidade pública do Brasil verificou uma alta frequência de deficiência subclínica de magnésio, evidenciada por baixas concentrações plasmática e eritrocitária do mineral, bem como alta probabilidade de inadequação do consumo de magnésio, em torno de 70 e 94% para mulheres e homens, respectivamente (HERMES SALES et al., 2014).

Alguns estudos chamam atenção que o consumo de Mg abaixo das recomendações possivelmente não indica deficiência do mineral no organismo. O *Brazilian Osteoporosis Study* (BRAZOS) cujo objetivo foi avaliar a ingestão de nutrientes relacionados à saúde óssea em 2344 indivíduos adultos, verificou que somente 20% dos participantes do estudo atingiram a recomendação diária de magnésio (350 mg para homens e 265 mg para mulheres), ou seja, uma amostra representativa da população brasileira demonstrou baixa ingestão de Mg (PINHEIRO et al, 2009). E ainda, Rocha et al. (2012), em estudo transversal com 50 gestantes atendidas em um Hospital Universitário público do Brasil, observou níveis adequados de Mg sérico e eritrocitário em uma amostra com alta probabilidade de inadequação na ingestão do mineral. Dessa forma, os autores concluíram que o *status* de Mg das gestantes estava adequado apesar da ingestão dietética ser inferior as recomendações para esse micronutriente.

A literatura é controversa em relação à inadequação dietética de Mg e sua relação com doenças. De um lado, estudos com animais demonstram a relação entre deficiência de magnésio e a etiologia de algumas doenças (KRAMER et al.,

2003; 2009) e por outro, estudos em humanos não trazem evidências de que o baixo consumo de magnésio reflita necessariamente em deficiência do mineral, e que esta seja consistentemente encontrada em condições patológicas (NANRI et al. 2010; COSARO et al., 2014).

2.4 Magnésio e doenças metabólicas

As doenças metabólicas são condições intimamente ligadas à inflamação crônica. Em 2006, uma revisão elaborada por Hotamisligil traz o conceito de metainflamação, ou seja, um tipo de inflamação metabólica desencadeada pelo excesso de nutrientes que envolve um conjunto similar de moléculas e vias de sinalização envolvidas na inflamação clássica (HOTAMISLIGIL, 2006). Assim, entende-se que o excesso de peso e obesidade, como consequências do excesso de nutrientes, são fatores de risco para o surgimento de doenças de etiologia inflamatória. No entanto, nem todos os indivíduos obesos apresentam quadro de inflamação crônica, indicando que outros fatores, além da obesidade, podem contribuir para um estado crônico de inflamação, como por exemplo, o baixo consumo de alimentos ricos em antioxidantes e micronutrientes (NIELSEN, 2010).

Nesse contexto, destaca-se a deficiência moderada ou subclínica de magnésio que pode induzir inflamação crônica de baixo grau ou exacerbar o estresse inflamatório causado por outros fatores (NIELSEN, 2018). A seguir, alguns exemplos de trabalhos que investigaram essa associação.

Estudos sobre deficiência dietética de magnésio têm demonstrado, em modelos experimentais, alterações nas células do sistema imune evidenciadas pela desgranulação de mastócitos, aumento no número de leucócitos polimorfonucleares e fagocitose (BOIS, 1963; MALPUECH-BRUGÈRE et al., 2000; TONG et al., 2005). Em outro estudo, a restrição dietética de magnésio em ratos (32 mg / Kg / dieta) por curto período de tempo resultou no aumento da resposta inflamatória, no número de leucócitos, tais como neutrófilos, monócitos, basófilos e diminuição da proporção de linfócitos CD5+ e CD8+ (MALPUECH-BRUGÈRE et al., 2000). Ensaio *in vitro* conduzido com células mesenquimais demonstrou o papel imunomodulador do Mg em favorecer a proliferação celular e reduzir os níveis de citocinas inflamatórias (DA SILVA LIMA et al., 2018).

Estudos clínicos também sugerem que o Mg pode estar associado a processo inflamatório e estresse oxidativo. Dados do NHANES (1999 – 2000) apontam que indivíduos adultos que consomem diariamente menos do que a RDA de Mg foram 1,48 a 1,75 vezes mais propensos a ter aumento na concentração sérica de PCR, do que adultos que consumiram quantidade acima ou igual à RDA (KING et al., 2005).

No que se refere à obesidade, Guerrero-Romero et al. (2008) estudaram indivíduos obesos e não obesos, de ambos os sexos e com idade entre 20-65 anos, com e sem alterações metabólicas (hiperglicemia, resistência à insulina, hipertensão e triglicérides aumentados). Os autores verificaram que a hipomagnesemia associou-se positivamente com essas alterações em ambos os grupos estudados. Observaram ainda que, nos obesos, a hipomagnesemia associou-se fortemente com altos valores de triglicérides e resistência à insulina e, por outro lado, a normomagnesemia foi mais frequente em indivíduos metabolicamente saudáveis.

Acerca da investigação sobre a relação entre a resistência à insulina e menor consumo de magnésio, estudo conduzido em pacientes diabéticos demonstrou correlação inversa entre magnésio sérico e nível de insulina em jejum, além de uma correlação altamente significativa entre o Mg e os índices de sensibilidade à insulina: HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment for Insulin Resistance) e o QUICKI (Quantitative Insulin Sensitivity Check Index) (CHUTIA; LYNRAH, 2015). E, ainda, dados no NHANES III mostram que o consumo de Mg está associado com redução de aproximadamente 30% das chances de doença hepática gordurosa e pré-diabetes, quando feita comparação entre o mais alto e o mais baixo quartil de ingestão de Mg (LI et al., 2018).

Quanto aos ensaios experimentais, um estudo com ratos alimentados com uma dieta rica em gordura animal e com restrição dietética moderada de magnésio (70% da recomendação) exibiram menor sensibilidade hepática à insulina, evidenciada pela redução da fosforilação de IR-β, IRS-1 e Akt sem qualquer alteração na glicemia ou nos níveis de insulina circulantes (SALES et al., 2014). A figura 2 traz um breve resumo sobre a relação entre deficiência de Mg, resistência à insulina e diabetes.

Diante do exposto, a inadequação dietética de magnésio parece ser uma condição importante para a predisposição ao surgimento e agravamento de doenças metabólicas como obesidade, resistência à insulina e síndrome metabólica e (MAZUR, 2007; NIELSEN, 2014; BERTINATO et al., 2016).

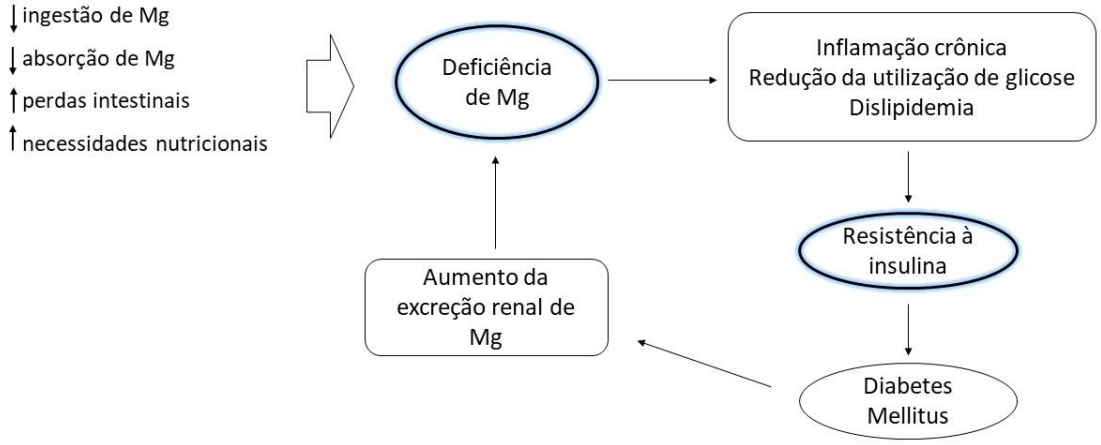

Figura 2. Deficiência de Mg e resistência à insulina. O esquema mostra as causas da deficiência de Mg no organismo e sua relação com a resistência à insulina e o diabetes, que por sua vez, agrava a deficiência de Mg.
Adaptada de Gröber et al. 2015 e Schwalfenberg et al. 2017.

Hipótese

3 HIPÓTESE

A restrição dietética de magnésio e o consumo excessivo de lipídios alteram o *status* do mineral e a sensibilidade à insulina.

Objetivos

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar, em ratos *Wistar*, os efeitos da restrição dietética de Mg e do consumo excessivo de lipídios sobre a homeostase de Mg e sensibilidade à insulina.

4.2 Específicos

- Investigar a compartimentalização do Mg frente a sua restrição dietética e ao alto consumo de lipídios.
- Avaliar as repercussões do modelo experimental na sinalização da insulina em termos moleculares e sistêmicos.
- Verificar a influência da restrição de Mg e do alto consumo de lipídios na expressão dos canais TRPM6 e TRPM7 no rim, principal órgão envolvido na homeostase do mineral.

Material e Métodos

5. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FCF/USP em 12 de setembro de 2014 (Protocolo CEUA/FCF/476).

5.1 Animais

Ratos *Wistar* (*Rattus novergicus*, var. *albinus*) machos, heterogênicos, com peso entre 97 – 123 g, provenientes do Biotério de Produção e Experimentação da FCF e do Instituto de Química da USP, foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura (22±2°C) e umidade (55%) controladas e ciclos de claro/escuro de 12h.

5.2 Delineamento experimental

Os animais, após período de 7 dias de adaptação, foram distribuídos em quatro grupos com seis animais em cada: controle (CON), normolipídico com restrição de magnésio (Mg [50]), hiperlipídico (HL) e hiperlipídico com restrição de magnésio (HL Mg [50]) (Figura 1).

O consumo de ração e de água foram determinados diariamente e o peso corporal aferido semanalmente. Ração e água foram oferecidas *ad libitum*. Três dias antes da eutanásia, foram coletadas fezes e urina para determinação da concentração magnésio.

Para a análise da fosforilação das proteínas envolvidas na sinalização da insulina, os animais receberam 5U de insulina/1000g de peso corporal, por via intraperitoneal (PEDROSO et al., 2014) e, após 15 minutos, foi administrada dose intraperitoneal de tiopental sódico (100 mg/Kg) (Thiopentax, Cristália, São Paulo) (FLECKNELL, 2009) e posterior exsanguinação de acordo com as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA (2013). Sangue, fígado, rins, músculo (gastrocnêmio), tecidos adiposos (epididimal e retroperitoneal) e ossos (tíbia, fêmur) foram adequadamente coletados, pesados e acondicionados para posteriores análises.

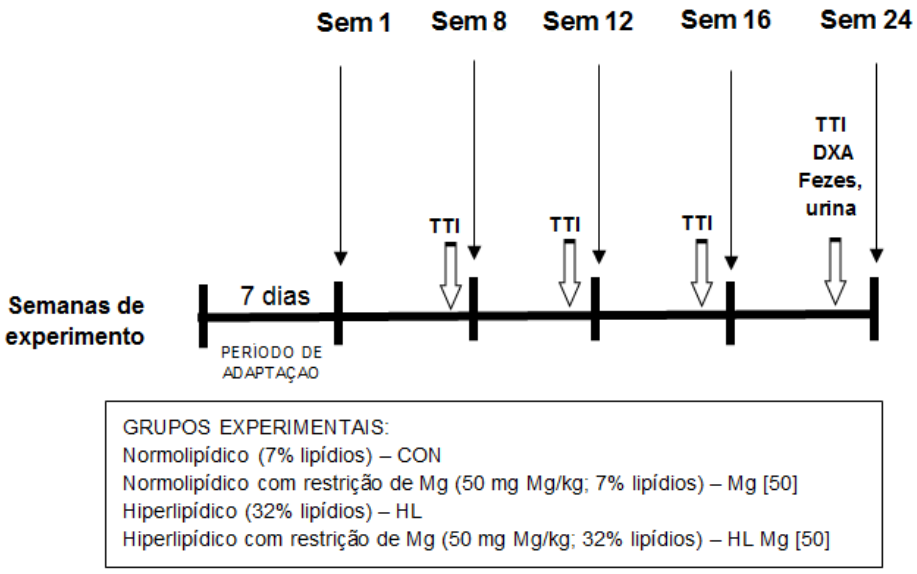

Figura 3. Delineamento experimental.

5.3 Formulação das rações experimentais

As rações experimentais foram elaboradas (lotes de 5 Kg) no laboratório de Minerais em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e acondicionadas em câmara fria (~4°C) até o momento da sua utilização.

A formulação das rações seguiu as recomendações do *American Institute of Nutrition* (REEVES et al, 1993), com modificações (Tabela 1). As rações normolipídicas (grupos CON e Mg [50]) foram elaboradas com 7% de lipídios e as rações hiperlipídicas (grupos HL e HL Mg[50]) foram elaboradas com 32% de lipídios. A quantidade adicional de lipídios nas rações hiperlipídicas foi descontada do teor de amido da formulação em relação às normolipídicas.

As rações dos grupos com restrição de Mg foram formuladas de modo a conter 10% da recomendação de Mg (como óxido de magnésio, [MgO]) para roedores (50 mg de Mg/ Kg de ração) (REEVES et al., 1993).

Tabela 1. Formulação das rações experimentais[1].

Ingredientes (%)	Normolipídicas	Hiperlipídicas
Caseína [2]	20,0	20,0
Fibra (celulose)	5,0	5,0
L-cistina	0,3	0,3
Bitartarato de colina [3]	0,25	0,25
Mistura vitamínica [4]	1,0	1,0
Mistura salina [5]	3,5	3,5
Sacarose	10,0	10,0
Amido de milho	52,95	27,95
Lipídios		
Óleo de soja	7,0	7,0
Gordura suína (banha)	---	25,0
TBHQ antioxidante [6]	0,0014	0,0028

1 – Com base nas recomendações da AIN-93 (REEVES et al., 1993), com modificações;
2 – 85% de proteína (N x 6,25);
3 – 41,1% de colina
4 – AIN-93 (REEVES et al, 1993)
5 – Modificada a partir da formulação AIN-93 (REEVES et al., 1993)
6 – TBHQ, TercButil Hidroquinona.

5.4 Composição química das rações

Após a elaboração de cada lote de ração, foi determinada a composição química: umidade, lipídios e proteínas. A quantidade de carboidratos foi calculada por diferença. Foi utilizada como referência para as análises uma formulação (padrão secundário) baseada na AIN-93. As concentrações de Mg nas rações e na água foram determinadas por espectrofotometria de absorção atômica (EAA) (Vision Scientific, Miami, FL, EUA), empregando-se lâmpadas de catodo oco de 202,6 nm e fenda de 1,3 nm após digestão por via úmida (HNO_3:H_2O_2, 5:1; v/v), diluição com HNO_3 a 1% (v/v) e adição de 0,1% (p/v) de lantânio, como La_2O_3 (AOAC, 2006). Curva-padrão foi preparada pela diluição do padrão de Mg ($MgCl_2$) em HNO_3 (Titrisol, Merck, Darmstadt, Alemanha).

5.5 Avaliação da composição corporal

A composição corporal foi analisada por absorção de dupla energia por raios X - DXA (Bruker Molecular Imaging Software, BRUKER Corporation, Billerica, MA, EUA). Os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de solução de xilazina (25 mg/Kg) e quetamina (10 mg/Kg) na proporção de 1:2 (v/v) e posicionados em decúbito ventral na mesa do equipamento para a análise dos compartimentos ósseo e adiposo.

No dia da eutanásia, os tecidos adiposos epididimal (TAE) e retroperitoneal (TAR) foram coletados e pesados para o cálculo do índice de adiposidade (TAR+TAE/peso corporal final x 100).

As concentrações de magnésio e cálcio na tíbia foram determinadas por espectrofotometria de absorção atômica (EAA). A concentração de fósforo foi avaliada por método colorimétrico, baseado fundamentalmente na transformação de fósforo em ácido fosfomolíbdico pela adição de molibdato de amônio (FISKE; SUBBAROW, 1925).

5.6 Avaliação da tolerância à insulina

Os animais foram submetidos a 4h de jejum para realização do teste de tolerância à insulina (TTI) na 8ª, 12ª, 16ª e 24ª semanas de experimento. Uma solução de insulina recombinante humana foi injetada (0,75 U/kg; Humulin R; Eli Lily, Indianapolis, EUA), por via intraperitoneal, e amostras de sangue foram obtidas pela punção da cauda dos animais, nos tempos 0 (basal), 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 minutos para dosagem de glicose (CARVALHO-FILHO *et al*, 2005). As alterações nas concentrações de glicose durante o TTI foram expressas como a área integrada sob a curva (ASC) de glicose.

5.7 Avaliação do *status* de magnésio

Amostras de sangue foram coletadas com citrato de sódio a 30% para análise da concentração de Mg no plasma e nos eritrócitos (1:100). A determinação de Mg eritrocitário foi realizada após a lavagem e lise da massa eritrocitária. A concentração de hemoglobina (Hb) foi determinada na massa de eritrócitos, pelo método de cianometaglobina com kit Labtest Diagnóstica (Lagoa Santa, MG, Brasil).

As concentrações de Mg no sangue, na urina, nas fezes, no músculo (gastrocnêmio) e no osso (tíbia) foram determinadas por EAA nas mesmas condições descritas para a análise das rações.

5.8 Análise histopatológica

Após a eutanásia, fragmentos de fígado foram coletados e fixados, respectivamente, em solução tamponada de methacarn (metanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%) por até 24 horas e depois mantidos em álcool a 96%. Seguiu-se processamento de rotina para microscopia de luz com inclusão dos fragmentos em parafina, cortes em 4 µm e coloração por hematoxilina-eosina (HE). Os exames histológicos das lâminas foram realizados em microscópio Eclipse Ni (Nikon, Japão) com câmera de captura de imagem acoplada (DS-U3, Nikon, Japão) nos aumentos de 40, 100, 200 e 400x. A presença de esteatose microvesicular foi avaliada conforme o sistema de escores para roedores proposto por Liang e colaboradores (2014), que considera o grau da lesão, sem zoneamento, classificada em escore 0 quando o parênquima apresenta menos de 5% de esteatose, escore 1, de 5% a 33%, escore 2 de 33% a 66% e escore 3 quando maior que 66%.

A avaliação microscópica dos fragmentos foi realizada por um observador que desconhecia a identificação do animal e do grupo.

5.9 *Status* inflamatório

Foram determinadas as citocinas TNF-α, IL-6 e IL-1β no tecido adiposo retroperitoneal por meio da utilização de kits comerciais por ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). As concentrações mínimas de citocinas dectáveis pelos kits de ELISA são de 5 pg/mL para TNF-α e IL-1β e de 14 a 36 pg/mL para IL-6.

5.10 Parâmetros bioquímicos

Foram determinadas no plasma as concentrações de AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase), triglicérides, colesterol total, LDL-c e HDL-c por meio de kits comerciais (Labtest, Minas Gerais, Brasil) de acordo

com as recomendações do fabricante, em analisador bioquímico automatizado (Labmax 240, Labtest, Minas Gerais, Brasil).

5.11 Determinação de insulina

A insulina plasmática foi determinada por ELISA por meio de kit comercial (Rat/Mouse Insulin, Millipore, Missouri, EUA).

5.12 Western-Blot

Foi avaliada, por Western-Blot, o conteúdo da proteína quinase B (Akt) total e fosforilada no fígado, músculo e rim (córtex renal), bem como os canais TRPM6 e TRPM7 no rim.

Aos fragmentos dos tecidos foi adicionado tampão para extração de proteína total (3,2 mmol FNa, 0,5 mmol $Na_4P_2O_7$, 0,3 mmol Na_3VO_4 1:100 *protease inhibitor cocktail* e T-PER *tissue protein* – Thermo Scientific, Rockford, l, EUA para posterior homogeneização com auxílio de Polytron e centrifugação (5 minutos, 4º C, 10000 g). Após a centrifugação, uma alíquota do sobrenadante foi retirada para a determinação da concentração de proteína total (BCA protein kit assay, Pierce, Rockford, IL, EUA). A partir da obtenção desta concentração, foram feitas alíquotas com concentração de 50µg de proteína total, que foram armazenadas em ultra-freezer a -80º C.

Amostras de 50µg de extrato proteico total foram então submetidas 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 – 70 V por 30 minutos (Trans-blot, Bio-Rad, CA, EUA), para a membranas de nitrocelulose (Amersham Hybond – ECL, GE, UK). As membranas foram bloqueadas para posterior incubação, *overnight*, a 4º C, com anticorpos primários para Akt (1:2000; Akt1 e *phospho* Akt [Ser473], Cell Signaling Technology, Bervely, MA, EUA), TRPM6 (1:1000; Abcam®, UK), TRPM7 (1:750; Abcam®, UK) e β-actina (1:50000; Sigma-Aldrich, EUA).

Posteriormente, as membranas foram incubadas, por 2h, com anticorpos secundários específicos para cada anticorpo primário (1:50000 *anti-rabbit peroxidase*, GE Healthcare Lifesciences, Freiburg, Alemanha). Os complexos antígeno-anticorpo foram identificados pela utilização do substrato

quimioluminescente para a enzima peroxidase (Amershan ™, ECL Select Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare, Italy), detectados e quantificados no equipamento Alliance 4.7 (UVITEC Cambridge) com auxílio de *software* disponibilizado pelo fabricante. Para a quantificação das proteínas, os resultados referentes às proteínas de interesse foram normalizados pela β-actina e, para as proteínas fosforiladas, os valores de proteína total, após *stripping.*

5.13 Extração de RNA total e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído do rim por meio da utilização do Mini Kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA, EUA) conforme as recomendações do fabricante. O RNA obtido foi submetido ao tratamento com DNase I para prevenir a contaminação com DNA genômico. Para determinar a integridade do RNA, todas as amostras foram avaliadas após corrida em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio, enquanto as concentrações de RNA foram determinadas medindo a razão da absorbância a 260 e 280 nm utilizando o NanoDrop 2000 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EUA). Em seguida, 0,5 µg de RNA total foram transcritos em cDNA pela utilização de kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante.

5.14 PCR em tempo real

Foi avaliada no rim a expressão dos genes de canais transportadores de Mg (TRPM6 e TRPM7) por PCR em tempo real, cujo método consiste na reação em cadeia de polimerase em tempo real. As reações foram feitas em 20 µL utilizando 10 µL do Taqman Universal PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 100 mg de cDNA como modelo e 1 µL da mistura 20X de iniciadores e sondas Taqman para os genes-alvo (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Foi utilizado o termociclador StepOneTM PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) para obtenção de dados da amplificação por qRT-PCR em tempo real. Para cada extração de RNA, foram feitas análises dos dados de expressão em quadriplicata pelo método ΔΔCt. Os valores de Ct (*threshold cycle)* foram normalizados pelos genes constitutivos GAPDH e β-actina e expressos em *fold*

change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) no qual $\Delta\Delta Ct = (Ct_{gene\ alvo} - Ct_{genes\ de\ referência}) - (Ct_{grupo\ experimental} - Ct_{grupo\ controle})$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

5.15 Avaliação imuno-histoquímica

Os fragmentos de rim foram submetidos ao exame imuno-histoquímico para a determinação do canal TRPM7. Brevemente, as lâminas foram desparafinadas em xilol, reidratadas em álcool e submersas em peróxido de hidrogênio a 3% durante 10 minutos (3x) e, então, lavadas com tampão fosfato (PBS), pH 7,4, por 5 minutos. Posteriormente, as lâminas foram levadas ao banho-maria em solução de tampão citrato (pH 6), onde ficaram por 20 minutos à temperatura de 95°C. Para bloqueio de reações inespecíficas, foi utilizado leite desnatado 10% por 30 minutos. Os cortes foram incubados *overnight* com o anticorpo primário anti-TRPM7 (Abcam, ab109438) na diluição 1:50 em BSA 1%. A lâmina utilizada como controle negativo foi incubada apenas com BSA.

Após incubação, foi utilizado o kit de detecção Spring® REVEAL (Pleasanton, CA, EUA). As seções foram reveladas com o cromógeno diaminobenzidina (DAB, 3,3'- diaminobenzidina Sigma Chemical Co., D5637) 0,03%, contracoradas com hematoxilina de Harris e, após lavagem e desidratação em álcool em concentração decrescente e diafanização em xilol, foram montadas com resina Permount® (Fisher Scientific, SP 15-100). O exame em microscopia de luz utilizou microscópio ótico (Eclipse Ni, Nikon, Japão) com câmera de captura de imagem acoplada (DS-U3, Nikon, Japão) e software NiS elements (Nikon). As seções submetidas ao exame imuno-histoquímico foram descritas e fotomicrografadas utilizando o mesmo sistema óptico.

5.16 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Instat (GraphPad Software Inc, versão 5.0.1, San Diego, EUA) e o nível de significância adotado foi de 5%. A normalidade dos dados foi testada usando o teste de Shapiro-Wilk. Os dados que assumiram distribuição normal tiveram suas médias comparadas por meio de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Quando não foi observada distribuição normal, as medianas foram comparadas pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis.

Resultados

6. RESULTADOS

- Composição química das rações e consumo de nutrientes

Na Tabela 2 são apresentados os resultados da composição química das rações experimentais utilizadas no ensaio. As dietas hiperlipídicas apresentaram 6 vezes mais lipídios que as normolipídicas, e as rações com restrição de Mg tiveram apenas 10% das recomendações de Mg para roedores.

Tabela 2. Composição química das rações (baseadas na AIN).

Nutrientes	Rações			
	Normolipídicas		Hiperlipídicas	
	Controle	Mg [50]	HL	HL [50]
Proteína (g/100 g)	16,0 ± 0,4	17,4 ± 0,2	20,0 ± 1,9	16,7 ± 2,1
Lipídios (g/100 g)	6,4 ± 1,1	4,5 ± 1,4	34 ± 0,4	34 ± 0,3
Carboidratos (g/100g)	80,5 ± 2,0	78,9 ± 0,01	44,6 ± 1,7	51,9 ± 3,1
Umidade (g/100 g)	11,7 ± 0,2	9,0 ± 0,2	6,7 ± 0,8	6,7 ± 0,7
Magnésio (μg/g)	460 ± 37,6	56 ± 9,4	407 ± 18,2	48 ± 1,6

Resultados expressos como média ± DP. HL: hiperlipídica. Dados referentes à média das análises feitas para cada lote de ração, em triplicata.

Os dados de consumo total de ração e de nutrientes constam na Tabela 3. Os animais dos grupos hiperlipídicos consumiram menos ração, porém não houve diferença no consumo total de energia entre estes e os grupos CON e Mg [50]. Como esperado, o consumo de Mg pelos animais que receberam rações com restrição de Mg foi significantemente menor. Ainda, os animais do grupo HL, que consumiram menos ração em relação ao grupo controle, também exibiram um menor consumo de Mg. No entanto, os grupos com restrição de Mg (Mg[50] e HL Mg[50]) não diferiram entre si ($p>0,05$).

Tabela 3. Consumo de ração durante 24 semanas de experimento.

Consumo (24 semanas)	CON n=6	Mg [50] n=6	HL n=6	HL Mg [50] n=6
Ração (g)	3601 ± 217,4[a]	3408 ± 214,2 [a]	2935 ± 243,9[b]	2836 ± 209,3[b]
Energia (Kcal)	15555± 939,4[ab]	14400 ± 905,2[a]	16727± 1390[b]	16164± 1193[ab]
Proteína (g)	449,2 ± 99,4[a] (11% VET)	593 ± 37,3[b] (16% VET)	586,5 ± 48,8[c] (14% VET)	473,6 ± 34,9[ac] (12% VET)
Lipídio (g)	230,5 ±13,9[a] (13% VET)	153,4 ± 9,7[a] (10% VET)	997,8 ± 82,9[b] (54% VET)	964,2 ± 71,2[b] (54% VET)
Carboidrato (g)	2830 ± 170,9[a] (76% VET)	2662 ± 167,3[a] (74% VET)	1350 ± 112,2[b] (32% VET)	1398 ± 103,2[b] (34% VET)
Magnésio Ração	1572 ± 240,2[a]	185,7 ± 17,4[b]	1173 ± 107,1[c]	136,1 ± 10,1[b]
Água	6,7± 0,54[a]	6,2 ± 1,0[ab]	6,3± 1,0[ab]	5,3± 0,8[b]
Total (mg)	1664 ± 100,9[a]	197 ± 11,7[b]	1201 ± 99,6[c]	141,4 ± 10,6[b]
CEA	0,29 ± 0,01[a]	0,29 ± 0,01[a]	0,37± 0,02[b]	0,35 ± 0,02[b]

Resultados expressos em média±desvio padrão. Na mesma linha, os grupos seguidos pelas mesmas letras minúsculas não são significantemente diferentes, de acordo com a análise ANOVA oneway e pós-hoc de Tukey. CON: grupo controle; Mg [50]: grupo normolipídico com restrição de Mg; HL: grupo hiperlipídico; HL Mg [50]: grupo hiperlipídico com restrição de Mg. VET: Valor energético total. CEA: Coeficiente de Eficácia Alimentar, calculado como Δ peso(g) / consumo de ração (g) em 30 dias.

- Modelo experimental

O consumo da dieta hiperlipídica promoveu maior ganho de peso corporal e aumento da gordura visceral nos animais dos grupos HL e HL Mg[50] quando comparados aos grupos CON e Mg[50], verificados por meio do índice de adiposidade e pela somatória dos pesos dos coxins adiposos (tecido adiposo retroperitoneal e epididimal). Não foram observadas diferenças no percentual de gordura periférica, massa livre de gordura e densidade mineral óssea (tabela 4).

Tabela 4. Pesos e composição corporal dos animais.

Parâmetro	Grupos				
	CON n=6	Mg [50] n=6	HL n=6	HL Mg[50] n=6	*P*
Peso corporal inicial (g)	109,6 ± 13,8[a]	110,5 ± 13,9[a]	113,0 ± 13,3[a]	112,2 ± 16,3[a]	0,9976
Peso corporal final (g)	524,2 ± 46,5[a]	533,8 ± 56,8[ac]	622,2 ± 63,0[bc]	631,8 ± 57,0[b]	0,0052
Ganho de peso (g)	414,7 ± 41,1[a]	422,8 ± 56,2[a]	509,2 ± 54,7[b]	519,6 ± 46,8[b]	0,0024
Gordura periférica (%)	25,18 ± 5,7	28,33 ± 5,4	30,7 ± 3,2	28,1 ± 1,8	0,3548
MLG (%)	74,8 ± 5,7	71,6 ± 5,4	69,3 ± 3,2	71,9 ± 1,8	0,2894
TAR+TAE (g)	34,2 ± 4,2[a]	40,4 ± 5,0[ab]	55,9 ± 4,4[b]	50,7 ± 2,8[b]	0,0059
TAR (g/g peso relativo)	0,03 ± 0,01[a]	0,03 ± 0,0[ab]	0,05 ± 0,01[b]	0,05 ± 0,00[b]	0,0119
IA (%)	6,5 ± 1,5[a]	7,5 ± 1,5[ab]	9,0 ± 1,5[b]	8,4 ± 1,0[ab]	0,0270
DMO no fêmur (g/cm^2)	2,2 ± 0,3	1,9 ±1,1	2,3 ± 0,1	2,3 ± 0,2	0,6582
Conteúdo de cálcio na tíbia (g/g)	167,6 ± 14,5	170,7 ± 18,0	166,7 ± 20,7	169,3 ± 11,1	0,9773
Conteúdo de fósforo na tíbia (mg/g)	159,3 ± 16,6	142,7 ± 13,3	141,3 ± 20,2	143,9 ± 14,0	0,7980

Resultados expressos em média±desvio padrão. Na mesma linha, os grupos seguidos pelas mesmas letras minúsculas não são significantemente diferentes, de acordo com a análise ANOVA oneway e pós-hoc de Tukey. CON: grupo controle; Mg [50]: grupo normolipídico com restrição de Mg; HL: grupo hiperlipídico; HL Mg [50]: grupo hiperlipídico com restrição de Mg. MLG: Massa livre de gordura. TAR tecido adiposo retroperitoneal. TAE: tecido adiposo epididimal. IA: Índice de adiposidade, calculado como [(TAR + TAE) * 100] / peso corporal (g). DMO: densidade mineral óssea.

O percentual de gordura periférica e a densidade mineral óssea foram calculados a partir de análise por DXA cujas imagens representativas de cada grupo estão apresentadas na figura 4.

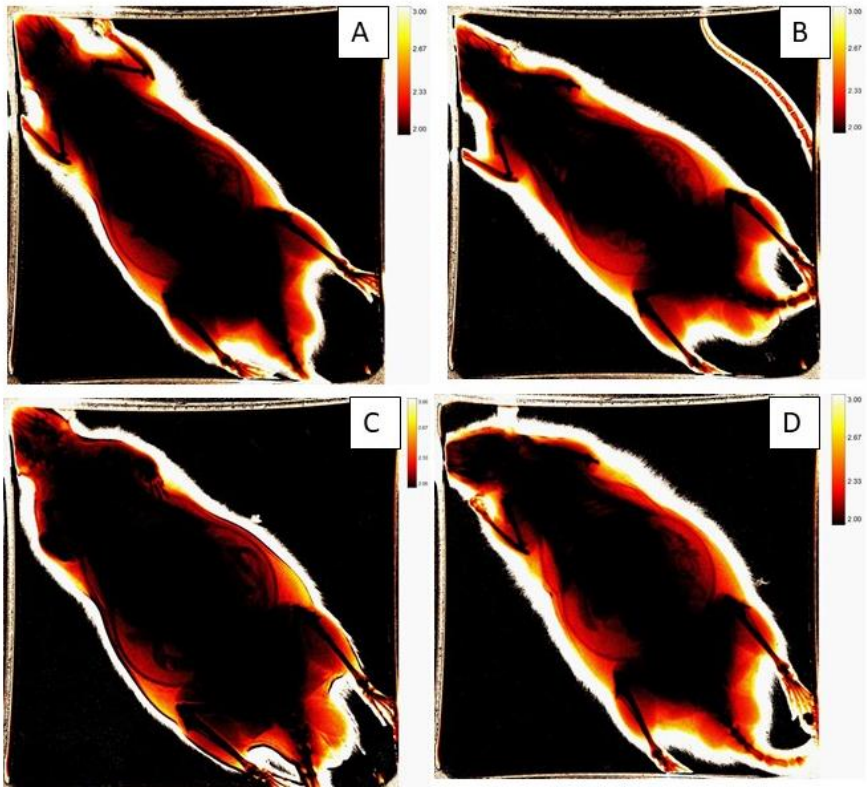

Figura 4. Imagens obtidas por DXA. (A) CON: grupo controle; (B) Mg [50]: grupo normolipídico com restrição de Mg; (C) HL: grupo hiperlipídico; (D) HL Mg [50]: grupo hiperlipídico com restrição de Mg. A área referente à gordura periférica dos animais é exibida na imagem como vermelha/amarela, enquanto as regiões magra e óssea são pretas. As áreas em branco representam a pele e os pelos dos animais.

Além das repercussões metabólicas na composição corporal, o consumo da dieta hiperlipídica induziu a um quadro de esteatose hepática. A figura 5 mostra a presença de esteatose do tipo microgoticular em fragmentos de fígado dos animais dos grupos hiperlipídicos (Figura 5). Não foram observadas alterações necroinflamatórias.

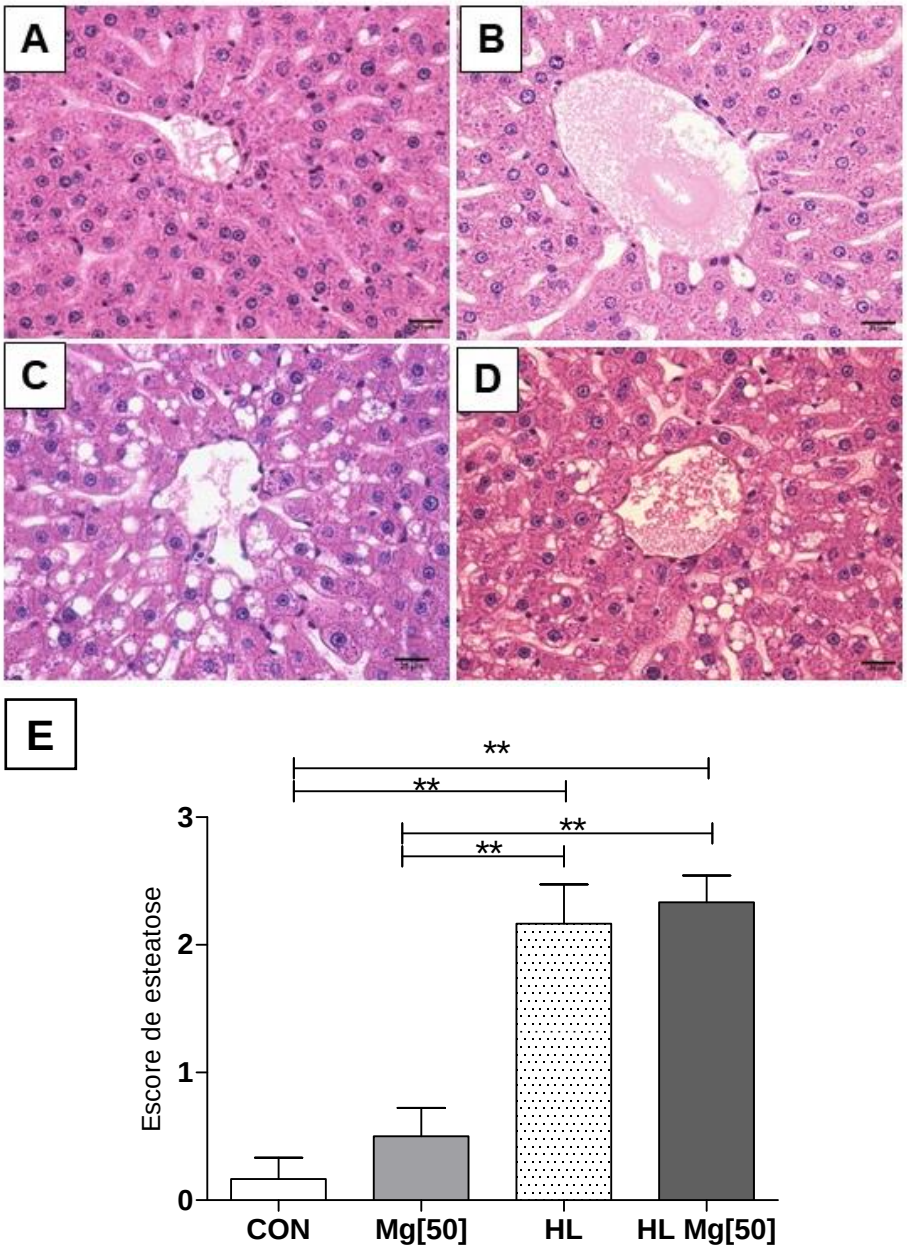

Figura 5. Fotomicrografia do fígado dos animais. (A) CON: grupo controle; (B) Mg [50]: grupo normolipídico com restrição de Mg; (C) HL: grupo hiperlipídico; (D) HL Mg [50]: grupo hiperlipídico com restrição de Mg. HE, barra 25 µm. Observe em (A) e (B) ausência de alterações histológicas na região de veia hepática central; em (C) e (D) Hepatócitos exibem esteatose microgoticular; (E) Gráfico de distribuição dos escores de esteatose, escore varia de 0-3. Valores das medianas comparados pelo teste Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). n=6 animais. **$p<0,01$.

- Avaliação bioquímica

Na tabela 5 encontram-se os valores das concentrações plasmáticas de enzimas hepáticas e o perfil lipídico dos animais. Não foram observados efeitos da restrição de Mg e da dieta hiperlipídica nesses parâmetros bioquímicos.

Tabela 5. Determinações plasmáticas de AST, ALT e perfil lipídico dos animais.

Determinações bioquímicas	Grupos				*P*
	CON	Mg [50]	HL	HL Mg[50]	
AST (U/L)	25,8 ± 4,8	32,5 ± 16,2	33,0 ± 10,2	38,6 ± 12,8	0,434
ALT (U/L)	89,4 ± 18,6	100,3 ± 36,8	89,5 ± 25,1	100,0 ± 21,5	0,833
Triglicérides (mg/dL)	84,8 ± 31,5	71,7 ± 20,1	54,3 ± 21,5	55,0 ± 18,7	0,532
Colesterol total (mg/dL)	85,8 ± 15,7	82,3 ± 28,0	73,8 ± 4,8	72,6 ± 6,8	0,533
LDL-c (mg/dL)	21,0 ± 3,5	21,2 ± 11,4	17,2 ± 4,8	14,8 ± 1,9	0,374
HDL-c (mg/dL)	30,4 ± 3,8	30,7 ± 11,0	26,8 ± 1,8	29,4 ± 3,3	0,116

Resultados expressos em média±desvio padrão. Análise ANOVA oneway e pós-hoc de Tukey.
AST: Aspartato aminotransferase. ALT: alanina aminotransferase. CON: grupo controle; Mg [50]: grupo normolipídico com restrição de Mg; HL: grupo hiperlipídico; HL Mg [50]: grupo hiperlipídico com restrição de Mg. n=5-6 animais.

- Avaliação de citocinas inflamatórias no tecido adiposo

Foram avaliadas as concentrações das interleucinas IL-6, TNF-α e IL-1β no tecido adiposo retroperitoneal. Não houve diferença estatística entre os grupos estudados (Figura 6).

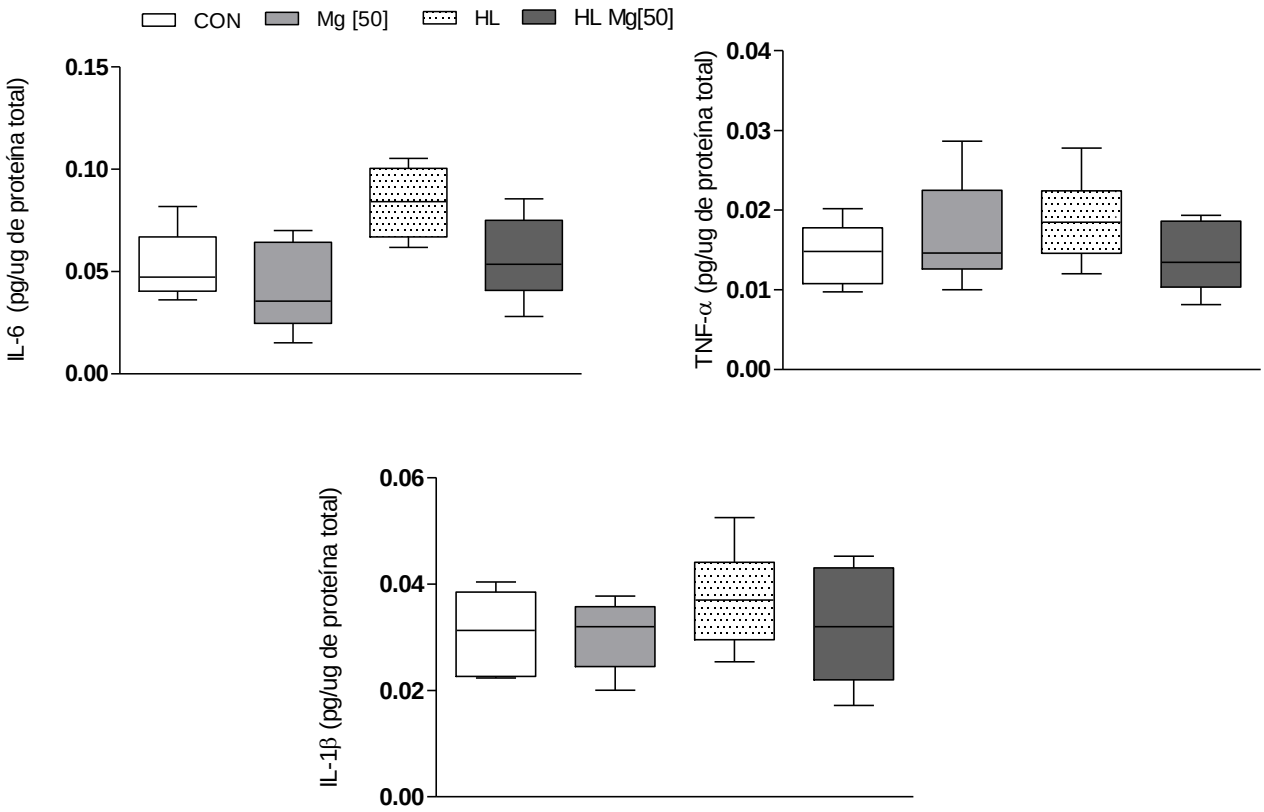

Figura 6. Concentração de citocinas no tecido adiposo retroperitoneal dos animais. CON: grupo controle; Mg [50]: grupo normolipídico com restrição de Mg; HL: grupo hiperlipídico; HL Mg [50]: grupo hiperlipídico com restrição de Mg. n=5-6 animais. Valores das medianas comparados pelo teste Kruskal-Wallis (p>0,05).

- Status de Mg

Os animais alimentados com rações com restrição de Mg apresentaram menor excreção urinária e fecal deste mineral, bem como menor concentração de Mg no plasma e no osso. Não houve alteração no conteúdo de Mg muscular. Os níveis de magnésio eritrocitário foram maiores no grupo HL Mg[50] em relação ao demais grupos (Figura 7).

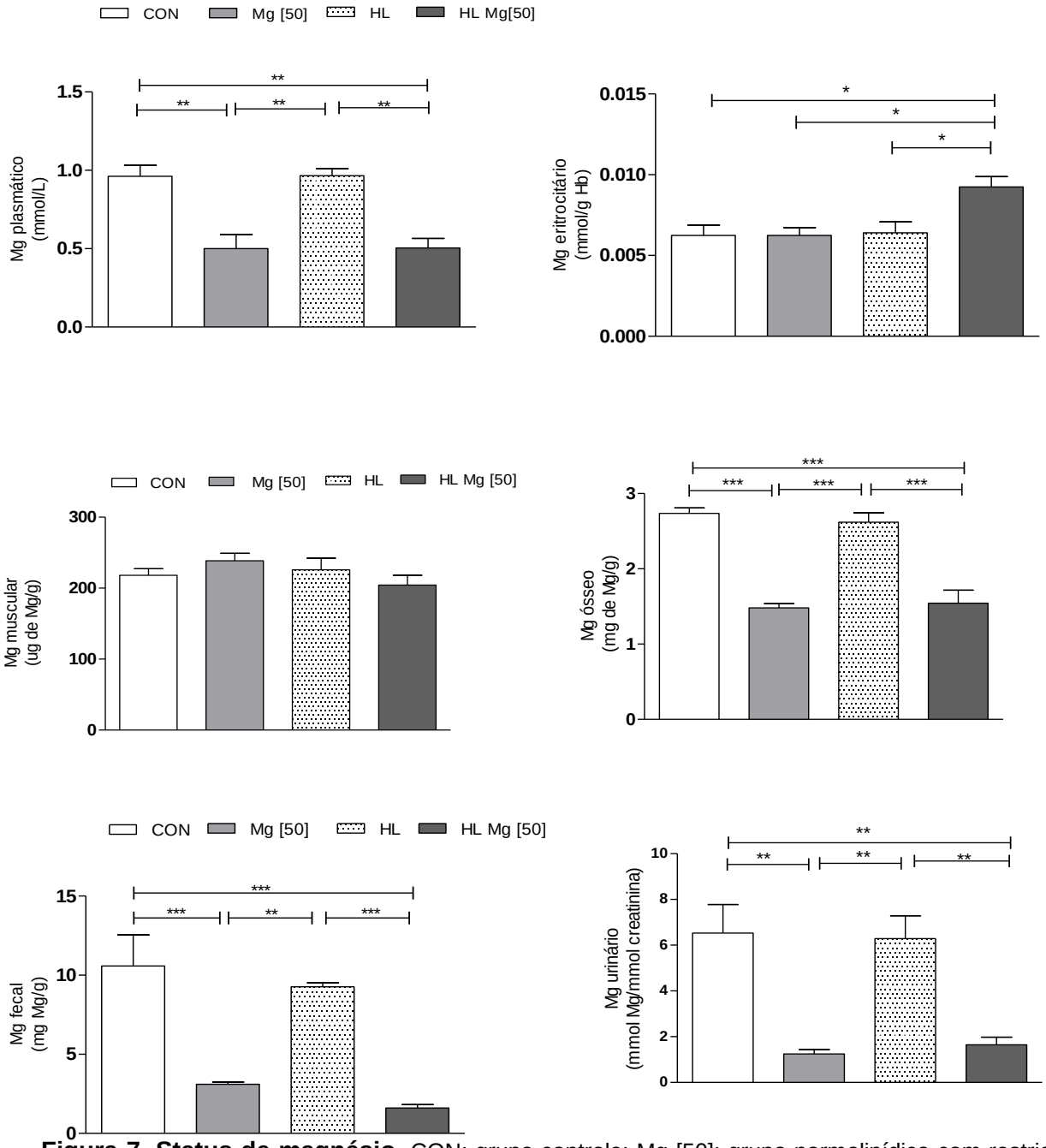

Figura 7. Status de magnésio. CON: grupo controle; Mg [50]: grupo normolipídico com restrição de Mg; HL: grupo hiperlipídico; HL Mg [50]: grupo hiperlipídico com restrição de Mg. n=4-6 animais. Resultados expressos como média±desvio padrão. Valores das médias comparados pelo one-way ANOVA seguido de pós-hoc de Tukey. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

- Efeitos na sensibilidade sistêmica à insulina

A figura 8 traz os resultados da avaliação da sensibilidade à insulina dos animais durante o período experimental. A sensibilidade à insulina do grupo HL Mg[50] foi menor em relação aos grupos CON e Mg[50] a partir da 16ª semana de acompanhamento (Figura 8 A). No entanto, no final do experimento, os dois grupos hiperlipídicos apresentaram maior glicemia de jejum (Figura 8 B). A figura 8 C ilustra o menor decaimento da glicose nos grupos hiperlipídicos, principalmente do grupo HL Mg[50] em relação aos grupos normolipídicos, nos diferentes tempos do teste de tolerância à insulina na semana 24.

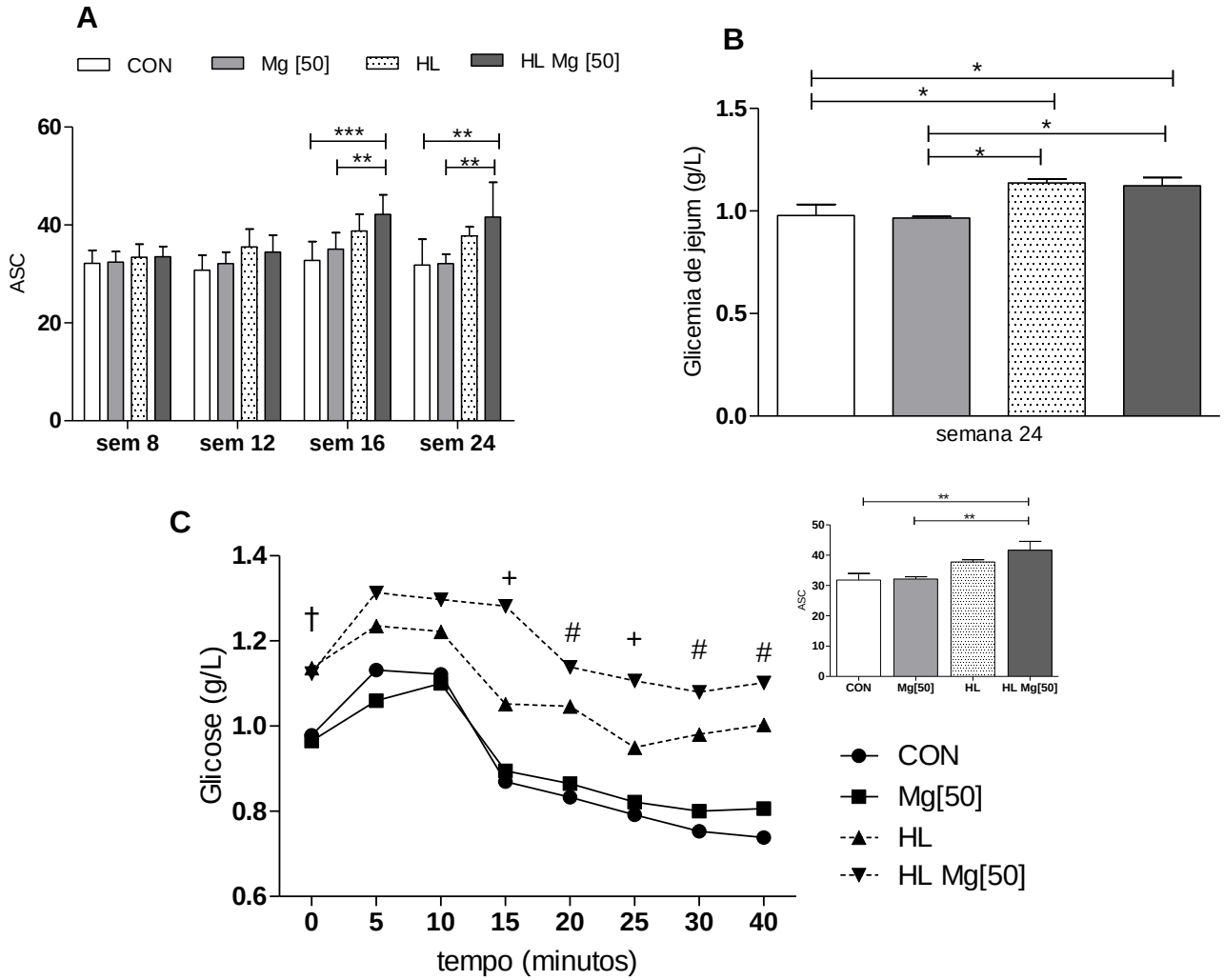

Figura 8. Parâmetros de sensibilidade à insulina dos animais. A – Área sob a curva (ASC) nas semanas 8, 12, 16 e 24. B - Glicemia de jejum ao final do experimento (semana 24). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. C – Curva de decaimento da glicose no teste de tolerância à insulina na semana 24. † p<0,05 CON e Mg[50] *vs* HL e HL Mg[50]; + p<0,05 CON e Mg[50] *vs* HL Mg[50]; # p<0,05 CON e Mg [50] *vs* HL Mg[50]; CON *vs* HL. CON: grupo controle; Mg [50]: grupo normolipídico com restrição de Mg; HL: grupo hiperlipídico; HL Mg [50]: grupo hiperlipídico com restrição de Mg. Resultados expressos como média±desvio padrão. Valores das médias comparados pelo one-way ANOVA seguido de pós-hoc de Tukey (p <0,05). n=6 animais.

No intuito de investigar os efeitos do modelo experimental na via de sinalização da insulina, os animais foram estimulados com este hormônio por via intraperitoneal. Para proceder esta análise, demonstramos que o estímulo foi similar para todos os grupos, como mostra a figura 9.

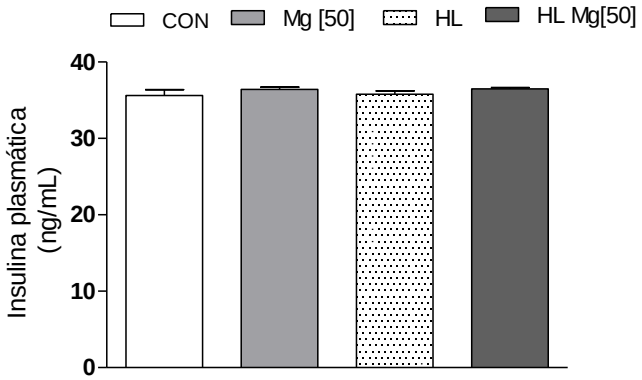

Figura 9. Concentração de insulina plasmática nos animais após estímulo intraperitoneal. CON: grupo controle; Mg [50]: grupo normolipídico com restrição de Mg; HL: grupo hiperlipídico; HL Mg [50]: grupo hiperlipídico com restrição de Mg. Resultados expressos como média±desvio padrão. Valores das médias comparados pelo one-way ANOVA seguido de pós-hoc de Tukey. n=6 animais. p>0,05.

- *Efeitos na sensibilidade tecidual à insulina*

Na investigação da sensibilidade tecidual à insulina, observamos que, no músculo, o grupo HL Mg[50] apresentou menor fosforilação da Akt (resíduo serina 473) em relação aos grupos que receberam rações normolipídicas (Figura 10 A). No fígado, essa diferença se deu apenas em relação ao grupo CON (Figura 10 B).

E, considerando a importância da sinalização da insulina para os mecanismos de reabsorção de Mg, analisamos ainda a função da Akt no rim, porém não foram observadas alterações significantes (Figura 10 C).

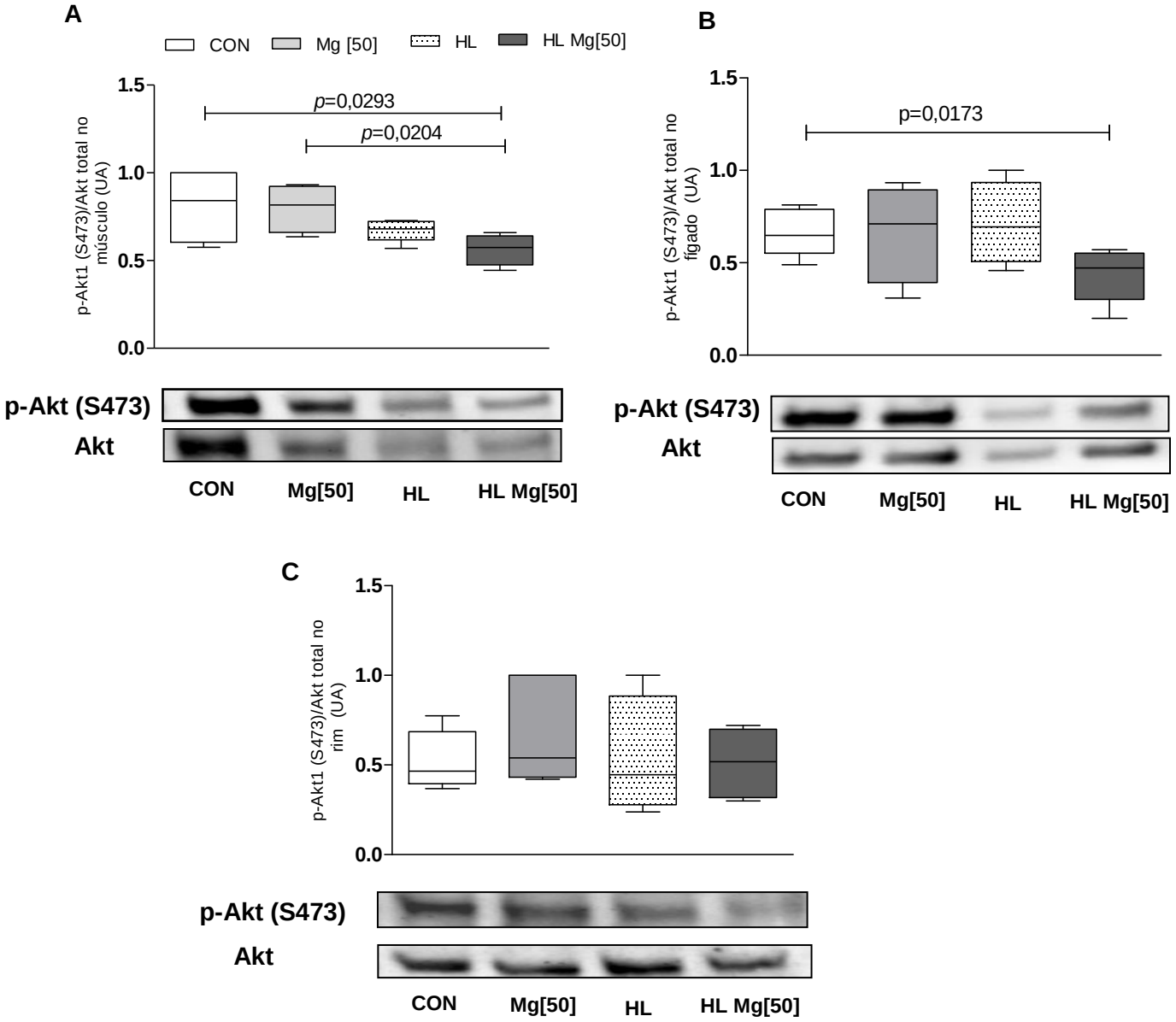

Figura 10. Estado de fosforilação da proteína quinase B no músculo (A), fígado (B) e no rim (C) dos animais. CON: grupo controle; Mg [50]: grupo normolipídico com restrição de Mg; HL: grupo hiperlipídico; HL Mg [50]: grupo hiperlipídico com restrição de Mg. n=5-6 animais. Valor de *p* calculado pelo teste Kruskal-Wallis. Western-Blots representativos abaixo dos respectivos gráficos. UA: unidades arbitrárias.

- Avaliação dos canais TRPM6 e TRPM7

Pode-se observar que restrição dietética de Mg, tanto isolada quanto associada à dieta hiperlipídica, aumentou o conteúdo proteico dos canais TRPM6 e 7 no rim, como mostra a Figura 11.

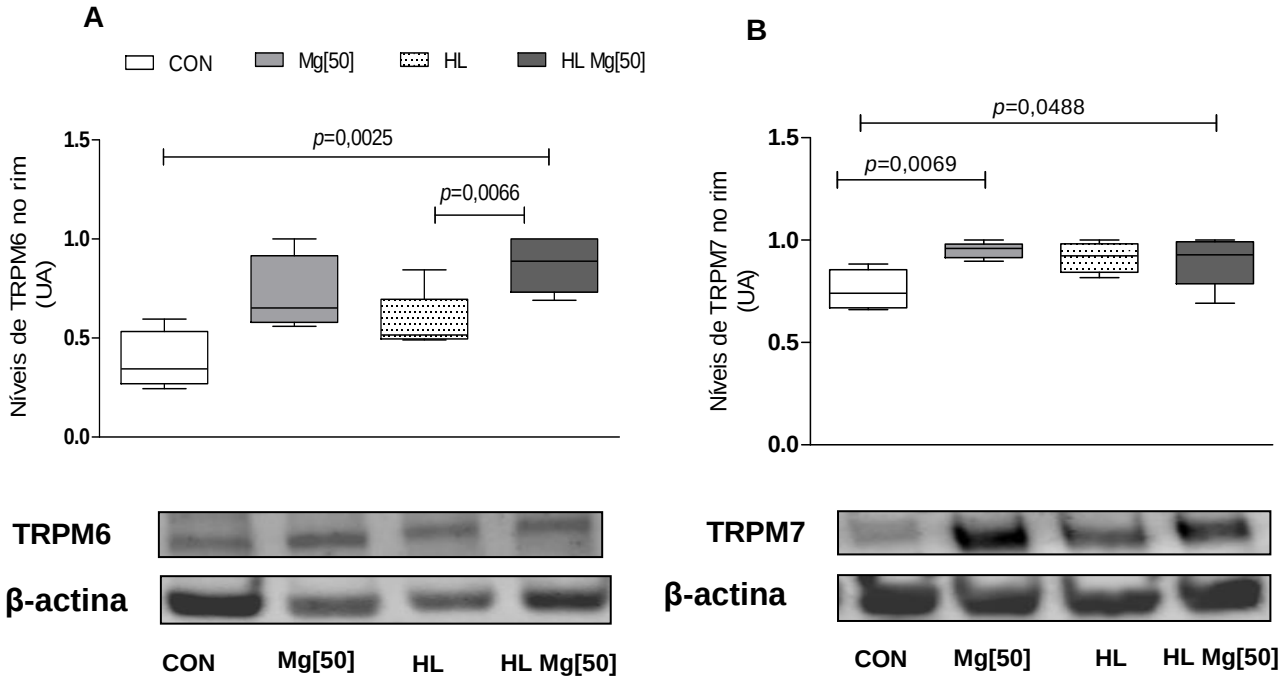

Figura 11. Conteúdo proteico dos canais TRPM6 (A) e TRPM7 (B) no rim dos animais. CON: grupo controle; Mg [50]: grupo normolipídico com restrição de Mg; HL: grupo hiperlipídico; HL Mg [50]: grupo hiperlipídico com restrição de Mg. n=4-6 animais. Valor de *p* calculado pelo teste Kruskal-Wallis. Western-Blots representativos abaixo dos respectivos gráficos. UA: unidades arbitrárias.

Em concordância com os resultados apontados pelo *western-blot*, a análise imuno-histoquímica evidenciou que os grupos experimentais (Mg [50], HL e HL Mg[50]) apresentaram maior marcação para o canal TRPM7 localizado na borda em escova das células epiteliais de túbulos contorcidos distais (Figura 12).

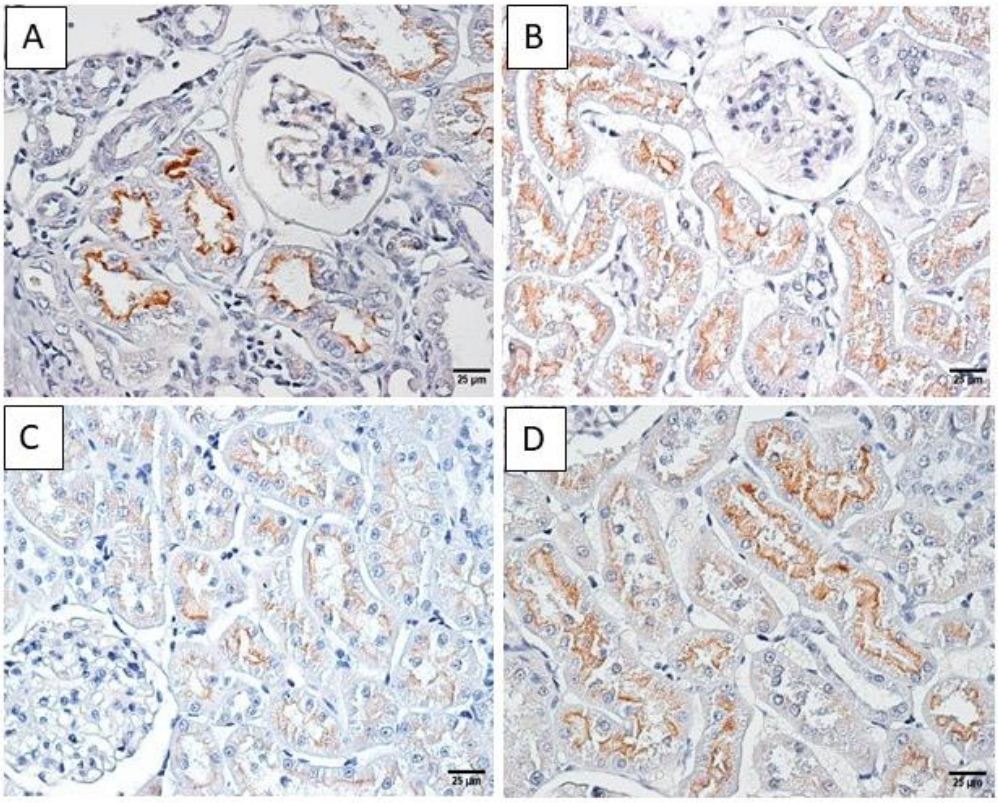

Figura 12. Fotomicrografias de imunomarcação positiva de canais TRPM7 em tecido renal. (A) CON: grupo controle; (B) Mg [50]: grupo normolipídico com restrição de Mg; (C) HL: grupo hiperlipídico; (D) HL Mg [50]: grupo hiperlipídico com restrição de Mg. Note a marcação positiva na borda em escova de células epiteliais tubulares, sendo mais intensa e em maior número de células epiteliais de túbulos distais dos animais deficientes em Mg (B e D). Método estreptoavidina-biotina-peroxidase. Sistema de detecção Polímero Reveal Compplement e Conjugate HRP (kit Spring® REVEAL). Contracoloração com Hematoxilina de Harris. Barra=25 µm.

Em relação à análise de expressão gênica, a figura 13 mostra que não houve diferenças significantes na expressão dos mRNAs dos genes para os canais TRPM6 e TRPM7 no rim entre os diferentes grupos estudados.

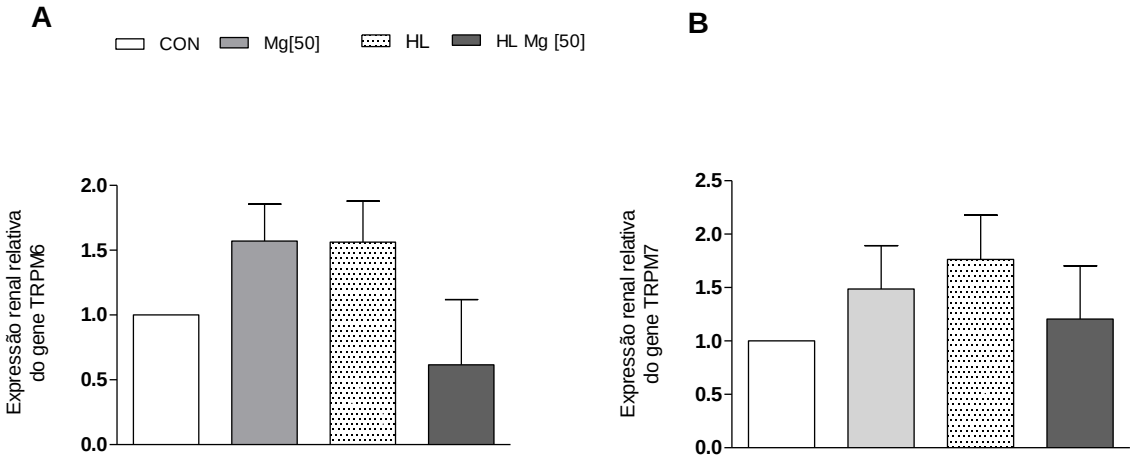

Figura 13. Expressão dos genes TRPM6 (A) e TRPM7 (B) no rim dos animais. *Fold change* em relação ao grupo controle. CON: grupo controle; Mg [50]: grupo normolipídico com restrição de Mg; HL: grupo hiperlipídico; HL Mg [50]: grupo hiperlipídico com restrição de Mg. n=4-6 animais. p>0,05.

Discussão

7. DISCUSSÃO

O modelo experimental desenvolvido neste trabalho associou duas condições nutricionais que ocorrem em indivíduos obesos: o alto consumo de lipídios e a reduzida ingestão dietética de magnésio. Esses dois desafios dietéticos foram propostos para avaliar as alterações na sensibilidade à insulina e o *status* de Mg em ratos *Wistar*, que têm grande capacidade de adaptação. Evidentemente, o ponto de partida para a proposta de delineamento que foi adotada foram os distúrbios metabólicos e a obesidade em seres humanos (JANSSENS et al., 2015), bem como as evidências de que a redução do consumo de Mg e as alterações no seu *status* no organismo são associadas ao diabetes (MOOREN, 2015).

As dietas hiperlipídicas como indutoras de obesidade em modelos animais são amplamente conhecidas e utilizadas por reproduzirem grande parte da patogênese da obesidade em humanos, incluindo o ganho de peso lento e progressivo e o desenvolvimento secundário da resistência à insulina (KLEINERT et al, 2018). Uma das estratégias utilizadas em modelos experimentais é o excesso de lipídios pela inclusão da banha de porco, que acentua o ganho de peso, o desenvolvimento de obesidade e resistência à insulina de forma mais pronunciada do que as dietas com gorduras de origem vegetal (KUBANT et al., 2015).

Conforme observado em outros estudos experimentais (DOSSI et al., 2014; PAN et al., 2015), a ingestão da dieta com alto teor de lipídios (aproximadamente 55% do VET) promoveu maior acúmulo de gordura visceral e induziu a um quadro de esteatose hepática nos animais. Ao contrário do que algumas pesquisas apontam (JACOB et al., 2013; SANTANA et al., 2014; LU et al., 2016; BUSSEROLLES et al., 2003), a dieta hiperlipídica e a restrição dietética de Mg não promoveram modificações no perfil lipídico e na concentração de citocinas inflamatórias no tecido adiposo. Porém, alguns estudos crônicos desenvolvidos com ratos *Wistar* alimentados com dietas hiperlipídicas relatam a ausência de inflamação e de alterações nos níveis de lipídios circulantes assim como o presente estudo (GZIELO et al., 2017; BEZAN et al., 2018). As diferenças nesses resultados podem decorrer das variações no teor de lipídios e no perfil de ácidos graxos da dieta, peso e idade dos animais utilizados e do tempo de estudo.

Como consequência desse perfil metabólico, a dieta hiperlipídica, isolada ou combinada com a restrição de Mg, reduziu a sensibilidade à insulina dos animais. No entanto, o efeito dos dois desafios nutricionais em associação tende a ser mais expressivo, o que sugere que a deficiência de Mg pode agravar os efeitos do consumo excessivo de lipídios.

Isoladamente, a restrição dietética de Mg não impactou negativamente na tolerância à insulina, porém a literatura ressalta que a restrição de Mg pode predispor a hiperinsulinemia, a alterações na expressão de enzimas chaves para a gliconeogênese (TAKAYA et al., 2012) e ao comprometimento da fosforilação de proteínas da via da insulina (SUAREZ et al., 1995; SALES et al., 2013). Há ainda estudos que verificaram os efeitos da restrição de Mg associada à dieta com alto teor de sacarose no desenvolvimento de distúrbios no metabolismo de carboidratos como hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e na atividade de enzimas glicolíticas no fígado (CHAUDHARY et al., 2006; BOPARAI et al., 2007; GARG et al., 2014).

O desenvolvimento da resistência à insulina nesse modelo experimental teve como principais causas o aumento da adiposidade, a sobrecarga de lipídios e sua deposição ectópica no fígado, bem como o comprometimento de diversas reações relacionadas ao metabolismo da glicose pela deficiência de Mg. Para o entendimento desse quadro, investigamos a sensibilidade tecidual à insulina por meio da avaliação do estado de fosforilação da Akt, proteína que regula a homeostase da glicose através de uma variedade de alvos a jusante na via da insulina (HERS et al., 2011).

Verificamos que a hiperglicemia e as alterações na tolerância à insulina estão relacionadas ao menor estado de fosforilação da Akt no fígado e no músculo, dois órgãos-alvo para este hormônio. No entanto, a resistência à insulina tem implicações não somente nos seus principais tecidos alvos, mas em todo o organismo, incluindo o rim, importante órgão para a homeostase de Mg (RAO et al., 2015). E neste órgão, especificamente, a insulina tem papel importante para a reabsorção de Mg, uma vez que promove a ativação e o aumento da expressão do canal TRPM6 na membrana plasmática (BAAIJ et al., 2012; NAIR et al., 2012). Observamos então que a resistência à insulina estabelecida neste modelo experimental não alterou a

sinalização deste hormônio no rim e possivelmente não interferiu nos mecanismos de reabsorção do mineral.

A resposta tecidual à insulina em modelos experimentais de deficiência de Mg já vem sendo explorada nas últimas décadas. Reis et al. (2000) verificaram que a deficiência de Mg não afetou a sinalização da insulina no músculo esquelético de ratos e ainda foi capaz de aumentar a fosforilação do receptor de insulina no fígado após 11 semanas de restrição de 86% da necessidade do mineral para roedores. Já Matsui et al. (2007) relataram que uma restrição dietética grave (92% da recomendação para roedores) por 4 semanas reduziu a sensibilidade muscular à insulina associada ao aumento da expressão de TNF-α. Sales et al. (2013) observaram que a restrição dietética moderada (70% das recomendações) associada a dieta hiperlipídica, por 30 dias, promoveu alterações hepáticas na via da insulina que antecederam a instalação de um quadro de resistência sistêmica ao hormônio (SALES et al., 2013).

Já está bem estabelecido que a restrição dietética de Mg altera a sua compartimentalização e que há inibição dos mecanismos de excreção deste mineral, principalmente pelos rins, conforme observado em estudos experimentais e em humanos (SALES, 2014; ROCHA, 2012). No presente estudo, a restrição dietética crônica de Mg (90% da recomendação para roedores), independentemente do teor de lipídios da dieta, resultou em hipomagnesemia, baixa concentração de magnésio no osso e redução da excreção fecal e urinária, caracterizando um quadro de deficiência grave. Surpreendentemente, os animais não apresentaram os sinais físicos clássicos de deficiência de Mg como hiperemia nas orelhas, lesões ulcerativas e queda de pelos (KRUSE et al., 1932).

Em períodos de restrição dietética leve ou moderada, os mecanismos envolvidos no controle homeostático do magnésio são capazes de manter as concentrações circulantes do mineral dentro da faixa de normalidade (LOURENÇO; ERMELINDA CAMILO, 2000). Já em casos de restrição grave, as concentrações de magnésio nos ossos e em outros tecidos, inclusive no plasma, estarão baixas e as concentrações intracelulares podem ser preservadas (BAAIJ et al., 2012). Neste estudo, observou-se que as concentrações intraeritrocitárias de Mg foram mantidas mesmo na deficiência grave, já que não foram observadas diferenças entre os

grupos CON e Mg[50]. Assim, este biomarcador parece não refletir adequadamente o estado corporal relativo ao Mg.

No entanto, os animais resistentes à insulina (HL Mg[50]) apresentaram maiores concentrações de magnésio no eritrócito quando comparados aos demais grupos, sugerindo que a resistência à insulina altera a compartimentalização de Mg. Esse dado corrobora com os resultados obtidos em pesquisas envolvendo indivíduos obesos com resistência à insulina (TOHIDI et al., 2011) e gestantes com *status* inflamatório alterado pela pré-eclâmpsia (ROCHA et al., 2015). No entanto, resultados contrários foram observados em indivíduos com diabetes tipos 1 e 2 em outros estudos (UĞURLU et al., 2016; CROOK et al., 1994).

O aumento da concentração de Mg no eritrócito neste estudo pode estar relacionado ao desequilíbrio no controle glicêmico (hiperglicemia) apresentado pelos animais associado ao estímulo intraperitoneal com insulina. Sabe-se que a insulina influencia a homeostase do magnésio por múltiplos mecanismos, dentre os quais o seu deslocamento do plasma para os eritrócitos e plaquetas (ROMANI, 2000; PAOLISSO, 1997). Adicionalmente, pode ter ocorrido efeito inibitório da glicose no efluxo de Mg dos eritrócitos por via independente de canais de sódio e de ATP (FRANCK et al., 1999) ou por defeitos na atividade de canais dependentes de sódio já relatados em situação de resistência à insulina (MIMURA et al., 1994).

Podemos inferir, então, que a hiperglicemia dos animais associada à estimulação com insulina no momento da eutanásia pode ter favorecido o deslocamento de Mg para o eritrócito e reduzir o seu efluxo para o meio extracelular. Xu e Maalouf (2017) discutiram uma situação similar em estudo sobre a homeostase de Mg em indivíduos diabéticos. Nesse estudo, os indivíduos com diabetes apresentaram menor concentração de Mg circulante durante uma infusão aguda de insulina, e os autores sugeriram que houve maior influxo para o meio intracelular.

Um aspecto muito interessante da homeostase do Mg está relacionado com a regulação da reabsorção desse mineral através dos canais TRPM6 e TRPM7. Embora sejam canais altamente homólogos e que compartilham as mesmas características estruturais, os mesmos não são funcionalmente similares (SCHMITZ et al., 2005). O TRPM6 está envolvido principalmente na regulação do Mg corporal através dos sistemas renal e gastrointestinal e o TRPM7 pode ser mais importante

na regulação da homeostase intracelular do Mg de maneira específica para cada tipo celular (TOUYZ, 2008). O presente estudo mostrou que a deficiência de Mg promove o aumento do conteúdo de ambos os canais, resultando em maior reabsorção renal de Mg em situações de baixa ingestão, e que a resistência à insulina instituída neste modelo experimental não promoveu alterações na abundância dos canais. O aumento compensatório do canal TRPM6 em situações de deficiência de Mg foi verificado em outros estudos (RONDÓN et al., 2008; THONGON et al. 2016).

Ainda que o TRPM7 seja um canal ubíquo e que alguns pesquisadores indiquem que não seja modulado pela deficiência de Mg (SCHLINGMANN et al., 2007), destacamos neste estudo o seu importante papel na homeostase de Mg em situações de deficiência crônica grave. Como trata-se de um canal com papel amplo na biologia celular, consideramos ainda que alterações secundárias ao modelo experimental possam ter influenciado sua expressão ou atividade, como por exemplo modificações na função cardiovascular e estresse oxidativo (PARAVICINI et al., 2012).

O presente estudo indica que a deficiência de Mg, isoladamente, não parece predispor a alterações no controle glicêmico, mas chama atenção para a importância desse mineral no agravamento de condições que predispõem ao diabetes. Embora o quadro de obesidade não tenha sido pronunciado como aquele decorrente de modelos genéticos, observamos as repercussões do consumo crônico de dietas inadequadas na etiologia da resistência à insulina, condição que se assemelha à atual situação alimentar dos indivíduos.

Conclusão

8. CONCLUSÃO

Os resultados de nosso trabalho mostram que a restrição dietética de 90% de Mg quando associada a dieta hiperlipídica levou a menor sensibilidade tecidual à insulina e a alterações no conteúdo dos canais TRPM6 e TRPM7, importantes reguladores da homeostase do mineral no organismo. A resistência à insulina, neste modelo experimental, alterou a concentração de Mg nos eritrócitos, sugerindo que essa condição metabólica altera a compartimentalização de Mg.

Referências

REFERÊNCIAS

AGUIRRE, V.; WERNER, E.D.; GIRAUD, J.; LEE, Y.H.; SHOELSON, S.E.; WHITE, M.F. Phosphorylation of Ser^{307} in isulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. **J Bio Chemistry**. v. 277, p. 1531-1537, 2002.

ALEXANDER, R.T.; HOENDEROP, J.G.; BINDELS, R.J. Molecular determinants of magnesium homeostasis: insights from human disease. **Am. J. Soc. Nephrol.**, v.19, p.1451-1458, 2008.

ALFREY, A.C.; MILLER, N.L. Bone magnesium pools in uremia. **J Clin Invest.** v.52, n.12, p.3019–3027, 1973.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists. 18.ed. Maryland, 2006.

ARNAUD, M.J. Update on the assessment of magnesium *status*. **Brit. J. Nutr**., v.99 (Suppl.3), p.S24-S33, 2008.

AYUK, J., GITTOES, N.J. How should hypomagnesaemia be investigated and treated? **Clin Endocrinol (Oxf**).v.75, n.6, p. 743-6, 2011.

BAAIJ, J.H.F.; HOENDEROP, J.G.J.; BINDELS, R.J.M. Regulation of magnesium balance: lessons learned from human genetic disease. **Clin Kidney J**, v.5 [Suppl 1], p. 15–24, 2012.

BARBAGALLO, M et al. Role of magnesium in insulin action, diabetes and cardio-metabolic syndrome X. **Mol Apects med**. v.24, p.39-52, 2003.

BERTINATO, J.; LAVERGNE, C.; RAHIMI, S.; RACHID, H.; VU, N.; PLOUFFE, L. Moderately Low Magnesium Intake Impairs Growth of Lean Body Mass in Obese-Prone and Obese-Resistant Rats Fed a High-Energy Diet. **Nutrients**. v. 8, 253, 2016.

BEZAN, P. N. et al. High Dose of A Conjugated Linoleic Acid Mixture Increases Insulin Resistance in Rats Fed Either A Low Fat or A High Fat Diet. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, 2018.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares, 2008-2009. Análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2011.

BOIS, P. Effect of magnesium deficiency on mast cells and urinary histamine in rats. **British journal of experimental pathology**, v. 44, n. 2, p. 151, 1963.

BOPARAI, Ravneet K.; KIRAN, Ravi; BANSAL, Devi D. Insinuation of exacerbated oxidative stress in sucrose-fed rats with a low dietary intake of magnesium: evidence

of oxidative damage to proteins. **Free radical research**, v. 41, n. 9, p. 981-989, 2007.

BUSSEROLLES, J. et al. High fructose feeding of magnesium deficient rats is associated with increased plasma triglyceride concentration and increased oxidative stress. **Magnesium research**, v. 16, n. 1, p. 7-12, 2003.

CAI, D.; YUAN, M.; FRANTZ, D.F et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-β and NF-kB. **Nat. Med**., v.11, p.183-190, 2005.

CAPURSO, C.; CAPURSO, A. From excess adiposity to insulin resistance: The role of free fatty acids. **Vascular Pharmacology**. p. 1-8, 2012.

CARVALHO-FILHO, M. A. et al. S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. **Diabetes**, v. 54, n. 4, p. 959-967, 2005.

CHAUDHARY, D.P.; BOPARAI, R.K.; 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.** v.7, n.4, p.293-300, 2004.

CHUTIA, H.; LYNRAH, K. G. Association of serum magnesium deficiency with insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. **Journal of laboratory physicians**, v. 7, n. 2, p. 75, 2015.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA. **Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA**. Brasília – DF, 2013.

COSARO, E. et al. Effects of magnesium supplements on blood pressure, endothelial function and metabolic parameters in healthy young men with a family history of metabolic syndrome. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases,** v. 24, n. 11, p. 1213-1220, 2014.

CROOK, M.; COUCHMAN, S.; TUTT, P.; AMIEL, S.; SWAMINATHAN, R. Erythrocyte, plasma total, ultrafiltrable and platelet magnesium in type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus. **Diabetes Res**. v.27, n.2, p.73-9, 1994.

DA ROCHA ROMERO, Amanda Batista; DA SILVA LIMA, Fabiana; COLLI, Célia. Mg status in inflammation, insulin resistance, and associated conditions. **Nutrire**, v. 42, n. 1, p. 6, 2017.

DA SILVA LIMA, F. et al. An insight into the role of magnesium in the immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 55, p. 200-208, 2018.

DE OLIVEIRA, A.R.; CRUZ,K.J.; MORAIS, J.B.; SEVERO, J.S.; DE FREITAS, T.E.; VERAS, A.L et al. Magnesium Status and Its Relationship with C-Reactive Protein in

Obese Women. **Biol Trace Elem Res**. v.168, n.2, p.296-302, 2015.

DOSSI,C.G; TAPIA, G.S.; ESPINOSA, A.; VIDELA, L.A.; D'ESPESSAILLES, A. Reversal oh high-fat diet-induced hepatic steatosis by *n*-3 LCPUFA: role of PPAR-α and SREBP-1c. **Journal of Nutritional Biochemisry**. n.25, p. 977-984, 2014.

FISKE, C.H.; SUBBAROW, V. The colorimetric determination of phosphorus. J**. Biol. Chem**. v. 66, n. 2, p. 375-400, 1925.

FLECKNELL, P. Laboratory Animal Anaesthesia. **Elsevier**. 3 ed., 2009.

FRANCK, G.; WDZIECZAK-BAKALA, J.; HENROTTE, J.G. Modulating role of glucose on magnesium transport in rat erythrocytes. J Nutr Biochem. V.10, n.7, p. 433-7, 1999.

GARG, M.; MEHRA, P.; BANSAL, D. D. Hormonal imbalance and disturbances in carbohydrate metabolism associated with chronic feeding of high sucrose low magnesium diet in weanling male Wistar rats. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 389, n. 1-2, p. 35-41, 2014.

GIMÉNEZ-MASCARELL, P., SCHIRRMACHER, C.E.; MARTÍNEZ-CRUZ, L.A.; MÜLLE, D. Novel Aspects of Renal Magnesium Homeostasis. **Front Pediatr**. v. 9 n.6, p.1-13, 2018.

GRÖBER, U.; SCHMIDT, J.; KISTERS, K. Magnesium in prevention and therapy. **Nutrients**, v. 7, n. 9, p. 8199-8226, 2015.

GROENESTEGE, W.M.T.; HOENDEROP, J.G.; VAN DEN HEUVEL, L.; KNOERS, N.; BINDELS, R.J. The Epithelial Mg^{2+}channel Transient Receptor Potential Melastatin 6 Is Regulated by Dietary Mg^{2+} content and Estrogens. **J Am Soc Nephrol**. V.17, p.1035–1043, 2006.

GUERRERO-ROMERO, F.; RASCÓN-PACHECO, R.A.; RODRÍGUEZ-MORAN, M.; DE LA PEÑA, J.E.; WACHER, N. Hypomagnesaemia and risk for metabolic glucose disorders: a 10-year follow-up study. **Eur J Clin Invest**. v.38, p.389-396, 2008.

GULLESTAD, L. et al. Magnesium deficiency diagnosed by an intravenous loading test. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation**, v. 52, n. 4, p. 245-253, 1992.

GZIELO, K. et al. Long-term consumption of high-fat diet in rats: effects on microglial and astrocytic morphology and neuronal nitric oxide synthase expression. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 37, n. 5, p. 783-789, 2017.

HANSEN, B.; BRUSERUD, Ø. Hypomagnesemia in critically ill patients. **Journal of intensive care**, v. 6, n. 1, p. 21, 2018.

HERMES SALES, C. et al. There is chronic latent magnesium deficiency in apparently healthy university students. **Nutricion hospitalaria**, v. 30, n. 1, 2014.

HERS, I.; VINCENT, E. E.; TAVARÉ, J. M. Akt signalling in health and disease. **Cellular signalling**, v. 23, n. 10, p. 1515-1527, 2011.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860, 2006.

HOENDEROP, J.G.J.; BINDELS, R.J.M. Epithelial Ca2+ and Mg2+ channels in health and disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 16, n. 1, p. 15-26, 2005.

JACOB, P.S. et al. Isocaloric intake of a high-fat diet promotes insulin resistance and inflammation in Wistar rats. **Cell biochemistry and function**, v. 31, n. 3, p. 244-253, 2013.

JAHNEN-DECHENT, W.; KETTELER, M. Magnesium basics. **Clin Kidney J** v. 5[Sup 1], p.3-14, 2012.

JANSSENS et al., 2015. Effects of low-stearate palm oil and high-stearate lard high-fat diets on rat liver lipid metabolism and glucose tolerance. **Nutr Metab.** V.18, p.12-57, 2015.

JOHNSON, A.M.F.; OLEFSKY, J.M. The origins and drivers of insulin resistance. **Cell**. v.152, p. 673-684, February 14, 2013.

KANADHIA, K. C. et al. A study of water hardness and the prevalence of hypomagnesaemia and hypocalcaemia in healthy subjects of Surat district (Gujarat). **Magnesium research**, v. 27, n. 4, p. 165-174, 2014.

KING, Dana E. et al. Dietary magnesium and C-reactive protein levels. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 24, n. 3, p. 166-171, 2005.

KRAMER, Jay H. et al. Dietary magnesium intake influences circulating pro-inflammatory neuropeptide levels and loss of myocardial tolerance to postischemic stress. **Experimental Biology and Medicine**, v. 228, n. 6, p. 665-673, 2003.

KRAMER, Jay H. et al. Neurogenic inflammation and cardiac dysfunction due to hypomagnesemia. **The American journal of the medical sciences**, v. 338, n. 1, p. 22-27, 2009.

KRUSE, H. D. et al. Studies on magnesium deficiency in animals. 1. Symptomatology resulting: from magnesium deprivation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 96, p. 519-539, 1932.

KLEINERT, M.; CLEMMENSEN, C.; HOFMANN,S.M.; MOORE, M.C.; RENNER, S. et al. Animal models of obesity and diabetes mellitus. **Nature Reviews**

Endocrinology. v.14, p. 140–162, 2018.

KUBANT, R.; POON, A.N.; SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, D.; DOMENICHIELLO, A.F.; HUOT, P.S. et al. A comparison of effects of lard and hydrogenated vegetable shortening on the development of high-fat diet-induced obesity in rats. **Nutr Diabetes**. v.14, n.5:e1882015, 2015.

KWON, H.; PESSIN, J.E. Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. **Frontiers in Endocrinolog**. v.4, P. 1-13, 2013.

LAUGERETTE, F. et al. Complex links between dietary lipids, endogenous endotoxins and metabolic inflammation. **Biochimie**, v. 93, n. 1, p. 39-45, 2011.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. **methods,** v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LI, W.; ZHU, X.; SONG, Y.; FAN, L., WU, L. et al. Intakes of magnesium, calcium and risk of fatty liver disease and prediabetes. **Public Health Nutr**. v.2, p.1-8, 2018.

LIANG, W. et al. Establishment of a general NAFLD scoring system for rodent models and comparison to human liver pathology. **PloS one**, v. 9, n. 12, p. e115922, 2014.

LOURENÇO, R. ERMELINDA CAMILO, M. Magnésio: relevância na fisiologia e clínica. 1ª parte: homeostasia e perturbações no metabolismo do magnésio. **Acta Médica Portuguesa.** v.13, p. 211-220, 2000.

LU, C.; HUNG, Y.; HSIEH, P. Additional effect of metformin and celecoxib against lipid dysregulation and adipose tissue inflammation in high-fat fed rats with insulin resistance and fatty liver. **European journal of pharmacology**, v. 789, p. 60-67, 2016.

MALPUECH-BRUGÈRE, Corinne et al. Inflammatory response following acute magnesium deficiency in the rat. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1501, n. 2-3, p. 91-98, 2000.

MATSUI, T. et al. Magnesium deficiency stimulated mRNA expression of tumor necrosis factor-α in skeletal muscle of rats**. Nutrition research,** v. 27, n. 1, p. 66-68, 2007.

MAZUR, A. et al. Magnesium and the inflammatory response: potential physiopathological implications. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 458, n. 1, p. 48-56, 2007.

MIMURA, M. et al. Reduction of erythrocyte (Na+-K+) ATPase activity in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients with microalbuminuria. **Hormone and metabolic**

research, v. 26, n. 01, p. 33-38, 1994.

MOOREN, F. Magnesium and disturbances in carbohydrate metabolism. **Diabetes Obes Metab**. v.17, n.9, p.813-23, 2015.

NADERI, A.S.A.; REILLY JR., R.F. Hereditary etiologies of hypomagnesemia. **Nat Clin Pract Nephol.** v.4, n.2, p. 80-89, 2008.

NAIR, A.V; HOCHER, B.; VERKAART, S.; ZEELAND, F.V.; PFAB, T.; SLOWINSKI, T. *et al* Loss of insulin-induced activation of TRPM6 magnesium channels results in impaired glucose tolerance during pregnancy. **PNAS.** v. 109, n.28, p. 11324–11329, 2012.

NANRI, A. et al. Magnesium intake and type II diabetes in Japanese men and women: the Japan Public Health Center-based Prospective Study. **European journal of clinical nutrition,** v. 64, n. 10, p. 1244, 2010.

NIELSEN, F.H. Magnesium, inflammation, and obesity in chronic disease. **Nutr Rev.** v.68, n.6, p.333-40, 2010.

NIELSEN, F.H. Effects of magnesium depletion on inflammation in chronic disease. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. V. 17, n. 6, p. 525-3-, 2014.

NIELSEN, F.H. Magnesium deficiency and increased inflammation: current perspectives. **J Inflamm Res.** v.18, n.11, p:25-34, 2018.

OLIVEIRA, A.R.S. de et al. Hypomagnesemia and its relation with chronic low-grade inflammation in obesity. **Revista da Associação Médica Brasileira,** v. 63, n. 2, p. 156-163, 2017.

OUCHI, N.; PARKER, J.L.; LUGUS, J.J.; WALSH, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature Reviews.** v.11, p.85-97.

PAN, Q.; REN, Y.; LIU, W.; HU, Y; ZHENG, J.; XU, Y.; WANG, G. Resveratrol prevents hepatic steatosis and endoplasmic reticulum stress and regulates the expression of genes involved in lipid metabolism, insulin resistance, and inflammation in rats. **Nutrition Research**. v. 35, n. 7, p:576-584, 2015.

PAOLISSO, G.; BARBAGALLO, M. Hypertension, Diabetes Mellitus, and Insulin Resistance: The Role of Intracellular Magnesium. **American Journal of Hypertension.** v.3, p:346-355, 1997.

PARAVICINI, T. M.; CHUBANOV, V.; GUDERMANN, T. TRPM7: a unique channel involved in magnesium homeostasis. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 44, n. 8, p. 1381-1384, 2012.

PEDROSO, J.A.B.; BUONFIGLIO, D.C.; CARDINALI, L.I.; FURIGO, I.C. *et al*. Inactivation of SOCS3 in leptin receptor expressing cells protects mice from diet-

induced insulin resistance but does not prevent obesity. **Molecular Metabolism**. v.3, p: 608-618, 2014.

PESSIN, J.E.; SALTIEL, A.R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **J Clin Invest.** V.106, p.165-9, 2000.

PINHEIRO, M. M. et al. Nutrient intakes related to osteoporotic fractures in men and women–The Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). **Nutrition journal**, v. 8, n. 1, p. 6, 2009.

RAO, A.; PANDYA, V.; WHALEY-CONNELL, A. Obesity and insulin resistance in resistant hypertension: implications for the kidney. **Advances in chronic kidney disease**, v. 22, n. 3, p. 211-217, 2015.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY JR, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr.** v.123, n.11, p.1939-51, 1993.

REIS, M.A.B. et al. Magnesium deficiency modulates the insulin signaling pathway in liver but not muscle of rats. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 2, p. 133-138, 2000.

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.

ROCHA, V.S.; DELLA ROSA, F.B.; RUANO, R.; ZUGAIB, M.; COLLI,C. Association between magnesium status, oxidative stress and inflammation in preeclampsia: A case–control study. **Clinical Nutrition**. V.34, p.1166-1171, 2015.

ROMANI, A.M.; MATTHEWS, V.D; SCARPA, A. Parallel stimulation of glucose and Mg 2+ accumulation by insulin in rat hearts and cardiac ventricular myocytes. **Circ Res**.v. 86, p.326–333, 2000.

ROMANI, A.M. Cellular magnesium homeostasis. **Arch Biochem Biophys**. v.512, v.1, p.1-23, 2011.

RONDÓN, L. J. et al. Relationship between low magnesium status and TRPM6 expression in the kidney and large intestine. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 294, n. 6, p. R2001-R2007, 2008.

RUDE, R.K.; GRUBER, H.E. Magnesium deficiency and osteoporosis: animal and human observations. **J. Nutr. Biochem**., v.15, p.710-716, 2004.
RUDE, R.K.; GRUBER, H.E.; WEI, L.Y. *et al* Magnesium deficiency: effect on bone and mineral metabolism in the mouse. **Calcif Tissue Int**, v.72, p.32–41,2003.

RZHESHEVSKY, A.V. Fatal “Triad”: Lipotoxicity, Oxidative Stress, and Phenoptosis. **Biochemistry** (Moscow), v. 78, n.. 9, p. 991-1000, 2013.

SABIO, G.; DAS, M.; MORA, A.; ZHANG, Z.; JUN, J.Y.; KO, H.J et al. A Stress Signaling Pathway in Adipose Tissue Regulates Hepatic Insulin Resistance. **Science.** v. 322, p.1539-1543, 2008.

SALES, Cristiane Hermes et al. Magnésio urinário, plasmático e eritrocitário: validação do método de análise por espectrofotometria de absorção atômica com chama. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 71, n. 4, p. 685-690, 2012.

SALES, C.H; SANTOS, A.R.; CINTRA, D.E.C.; COLLI, C. Magnesium-deficient high-fat diet: Effects on adiposity, lipid profile and insulin sensitivity in growing rats. **Clinical Nutrition**. p.1-10, 2013.

SANTANA, A. B. C. et al. Effect of high-fat diet upon inflammatory markers and aortic stiffening in mice. **BioMed research international,** v. 2014, 2014.

SANTOS, C.R.B.; PORTELLA, E.S.; AVILA, S.S.; SOARES, E.A. Fatores dietéticos na prevenção e tratamento de comorbidades associadas à síndrome metabólica. **Rev. Nutr**. v.19 n.3, 2006.

SCHLINGMANN, K.P, GUDERMANN, T. A critical role of TRPM channel-kinase for human magnesium transport. **J Physiol**. v.566.2, p. 301–308, 2005.

SCHLINGMANN, K.P.; WALDEGGER, S.; KONRAD, M.; CHUBANOV, V.; GUDERMANN, T. TRPM6 and TRPM7 – Gatekeepers of human magnesium metabolism. **Biochim Biophys Acta.** V.17, n. 72, p.813-21, 2007.

SCHMITZ, C.; DOROVKOV, M.V.; ZHAO, X.; DAVENPORT, B.J.; RYAZANOV, A.G.; PERRAUD, A.L. The channel kinases TRPM6 and TRPM7 are functionally nonredundant. **J Biol Chem.** v.280, n.45, p. 37763-71, 2005.

SCHWALFENBERG, G. K.; GENUIS, S.J. The importance of magnesium in clinical healthcare. **Scientifica**, v. 2017, 2017.

SHOELSON, S.E.; HERRERO, L.; NAAZ, A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. **Gastroenterology**, v.132, p.2169-2180, 2007.

SUAREZ, A. et al. Impaired tyrosine-kinase activity of muscle insulin receptors from hypomagnesaemic rats. **Diabetologia**, v. 38, n. 11, p. 1262-1270, 1995.

SUGIMOTO, Jun et al. Magnesium decreases inflammatory cytokine production: a novel innate immunomodulatory mechanism. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 12, p. 6338-6346, 2012.

SUMMERS, S.A. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. **Progress in Lipid Research**. v.45, p. 42-72, 2006.

TAKAYA, J. et al. Down-regulation of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase expression in magnesium-deficient rats. **Magnesium research,** v. 25, n. 3, p. 131-

139, 2012.

TOHIDI, M.; GHASEMI, A.; HADAEGH, F.; ARBABI, S.; ISFAHANI, F.H. Intra-erythrocyte Magnesium Is Associated with Gamma-Glutamyl Transferase in Obese Children and Adolescents. **Biol Trace Elem Res.** v.143, p.835–843, 2011.

TONG, G. M.; RUDE, R. K. Magnesium deficiency in critical illness. **Journal of intensive care medicine,** v. 20, n. 1, p. 3-17, 2005.

TOUYZ, R. M. Transient receptor potential melastatin 6 and 7 channels, magnesium transport, and vascular biology: implications in hypertension. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 294, n. 3, p. H1103-H1118, 2008.

THONGON, N. et al. Omeprazole suppressed plasma magnesium level and duodenal magnesium absorption in male Sprague-Dawley rats. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology,** v. 468, n. 11-12, p. 1809-1821, 2016.

UĞURLU, V.; BINAY Ç1, ŞIMŞEK E, BAL C. Cellular Trace Element Changes in Type 1 Diabetes Patients. **J Clin Res Pediatr Endocrinol**. V.8, n.2, p.180-6, 2016.

WEINBERG, J.M. Lipotoxicity. **Kidney Int.** v. 70, p. 1560–6, 2006.

WILLIAM, J.H.; DANZINGER,J. Magnesium Deficiency and Proton-Pump Inhibitor Use:A Clinical Review.**The Journal of Clinical Pharmacology.** p. 1–9, 2015.

WOLF, F.I.; TRAPANI, V. Cell (patho)physiology of magnesium. **Clin Sci**. v.114, n.1, p. 27-35, 2008.

XU, L. H. R.; MAALOUF, N. M. Effect of acute hyperinsulinemia on magnesium homeostasis in humans. **Diabetes/metabolism research and reviews**, v. 33, n. 2, 2017.

YE, J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. **Frontiers of Medicine**. v.7, n.1, p. 14-24, 2013.

ZECCHIN, H.G.; CARVALHEIRA, J.B.C.; SAAD, M.J.A. Mecanismos moleculares de resistência à insulina na síndrome metabólica. **Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo**. v.14, n.4, p. 574-589, 2004.

Anexos

ANEXO 1 – APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Ofício CEUA/FCF **88.2014-P476**

C E R T I F I C A D O

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, **CERTIFICA** que o Projeto de Pesquisa "**Resistência à insulina e status em magnésio: implicações sobre o transporte intestinal e renal de magnésio e sobre o remodelamento ósseo de ratos Wistar alimentados com rações hiperlipídicas**" (Protocolo CEUA/FCF/476), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Amanda Batista da Rocha Romero**, sob orientação do(a) **Profa. Dra. Célia Colli**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO em reunião de **12 de setembro de 2014**. Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento deste Projeto de Pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 15 de setembro de 2014.

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

ANEXO 2 – FICHA DO ALUNO

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

9132 - 9097610/1 - Amanda Batista da Rocha Romero

Email:	amandaromero@usp.br
Data de Nascimento:	13/03/1987
Cédula de Identidade:	RG - 2.504.018 - PI
Local de Nascimento:	Estado do Piauí
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Nutricionista - Universidade Federal do Piauí - Piauí - Brasil - 2010
Mestrado:	Mestre em Alimentos e Nutrição (1) - Universidade Federal do Piauí - Piauí - Brasil - 2013

Curso:	Doutorado
Programa:	Ciência dos Alimentos
Área:	Nutrição Experimental
Data de Matrícula:	03/07/2014
Início da Contagem de Prazo:	03/07/2014
Data Limite para o Depósito:	03/07/2018
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Celia Colli - 03/07/2014 até o presente. Email: cecolli@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 03/07/2014
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 24/08/2016
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:	Primeira Matrícula em 03/07/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 05/02/2018
Impresso em: 26/06/2018 14:02:46

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

9132 - 9097610/1 - Amanda Batista da Rocha Romero

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
ICB5735-1/1	Regulação Central do Balanço Energético e da Homeostase Glicêmica (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	29/07/2014	30/09/2014	45	3	100	A	N	Concluída
FBA5728-3/10	Aprimoramento Didático	19/08/2014	15/09/2014	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5751-1/2	Minerais em Nutrição: Distribuição Compartimental e Mecanismos de Regulação de sua Homeostase	07/10/2014	27/10/2014	30	2	100	A	N	Concluída
HEP5800-3/9	Bioestatística (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	02/03/2015	13/05/2015	90	6	100	A	N	Concluída
HNT5759-2/2	Nutrigenômica no Contexto das Doenças Crônicas não Transmissíveis (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	03/03/2015	06/04/2015	60	4	100	A	N	Concluída
HEP5800-3/10	Bioestatística (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	03/03/2015	14/05/2015	90	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
MCM5797-5/3	Obesidade (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	09/06/2015	29/06/2015	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5896-7/2	Tópicos em Ciência dos Alimentos e Nutrição II	17/11/2017	25/01/2018	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	25
Estágios:			
Total:	0	20	25

Créditos Atribuídos à Tese: 172

Observações:
1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria MEC nº 1.077, de 31.08.2012..

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 05/02/2018
Impresso em: 26/06/2018 14:02:47

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

9132 - 9097610/1 - Amanda Batista da Rocha Romero

Comissão julgadora da tese de doutorado:

NUSP	Nome	Vínculo	Função
49193	Celia Colli	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 05/02/2018
Impresso em: 26/06/2018 14:02:47

ANEXO 3 – CURRÍCULO LATTES

Amanda Batista da Rocha Romero
Curriculum Vitae

Dados pessoais

Filiação: Luiz Romero Lima e Izabel Cristina Batista Romero
Nascimento: 13/03/1987 - Teresina/PI - Brasil
Carteira de Identidade : 2504018 SSP - PI - 09/08/2002
CPF : 027.928.163-33

Formação acadêmica/titulação

2014 Doutorado em Alimentos e Nutrição Experimental.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Restrição dietética de magnésio associada à dieta hiperlipídica: implicações sobre a homeostase do mineral e sensibilidade à insulina
Orientador: Célia Colli
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2011 - 2013 Mestrado em Alimentos e Nutrição.
Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil
Título: Efeitos de ração enriquecida com polpa de buriti (Mauritia flexuosa L.) sobre o crescimento e controle metabólico de ratos recém-desmamados, Ano de obtenção: 2013
Orientador: Maria do Carmo de Carvalho e Martins
Co-orientador: Paulo Humberto Moreira Nunes
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2010 - 2012 Especialização em Nutrição Clínica.
Instituto Brasileiro de Pós-Graduação e Extensão, IBPEX, Curitiba, Brasil
Título: Papel do cálcio na hipertensão

2005 - 2009 Graduação em Nutrição.
Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil

Formação complementar

2012 - 2012 Extensão universitária em Tópicos Especiais em Fisiologia. (Carga horária: 48h).
Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil

2009 - 2009 Monitoria na disciplina Dietoterapia II.
Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil

2007 - 2009 Estágio Extracurricular.
Hospital de Terapia Intensiva e Medicina Interna do Piauí, HTI, Brasil

2009 - 2009 Monitoria na disciplina Dietoterapia I.
Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil

2008 - 2008 Monitoria na disciplina Nutrição e Dietética II.
Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil

2008 - 2008 Extensão universitária em Atendimento de Colonoscopia no Hospital Universitá. (Carga horária: 400h).
Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil

2007 - 2007 Monitoria na disciplina Tecnologia de Alimentos (Carga horária: 192h).
Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2017 - Atual Vínculo: Professora, Enquadramento funcional: Professora convidada, Regime: Parcial . Outras informações: Professora convidada da disciplina CQB5747, IQ-USP, para aula de Nutrição para animais de Laboratório- Ratos e Camundongos.

2014 - Atual Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Estudante de pós-graduação , Carga horária: 40, Regime: Integral.

Atividades

02/2017 - 06/2017 Estágio, Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Estágio Supervisionado em Docência junto à disciplina FBA 0406 - Fiscalização de Alimentos, sob a supervisão da profa. Dra. Ligia Bicudo de Almeida Muradian

02/2016 - 07/2016 Estágio, Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Estágio Supervisionado em Docência junto à disciplina FBA 0417 - Nutrição Humana, sob a supervisão da profa. Dra. Célia Colli

07/2015 - 11/2015 Estágio, Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Estágio Supervisionado em Docência junto à disciplina FBA 0201 - Bromatologia, sob supervisão da Profa Dra Elizabete Wenzel de Menezes

07/2014 - Atual Pesquisa e Desenvolvimento, Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Linhas de pesquisa:
Resistência à insulina e status em magnésio: implicações sobre a homeostase de magnésio e sobre o remodelamento ósseo de roedores alimentados com rações hiperlipídicas

2. Fundação Municipal de Ensino Superior de Bragança Paulista - FESB

Vínculo institucional

2017 - Atual Vínculo: Docente, Enquadramento funcional: Docente convidada do curso de pós-graduação, Regime: Parcial.

3. Universidade Federal do Piauí - UFPI

Vínculo institucional

2012 - 2013 Vínculo: Contrato, Enquadramento funcional: Professora Temporária, Carga horária: 20, Regime: Parcial. Outras informações: Professora das disciplinas Nutrição nos ciclos de vida I, Educação Nutricional, Tecnologia de Alimentos e Superviora de estágios.

2011 - 2011 Vínculo: Estágio em docência, Enquadramento funcional: Professora, Regime: Parcial
Outras informações: Disciplina ministrada: Fisiologia Humana - 60h

Atividades

03/2011 - 06/2013 Pesquisa e Desenvolvimento, Centro de Ciências da Saúde
Linhas de pesquisa:Efeitos da ração enriquecida com buriti (Mauritia flexuosa L.) sobre o crescimento e parâmetros metabólicos de ratos em crescimento

4. Faculdade de Educação São Francisco - FAESF

Vínculo institucional

2013 - 2013 Enquadramento funcional: Coordenadora do curso de Nutrição, Carga horária: 40, Regime: Integral.

5. Secretaria Municipal de Saúde de Piripiri - PI - SMS

Vínculo institucional

2010 - 2011 Vínculo: Servidor público, Enquadramento funcional: Nutricionista, Carga horária: 30, Regime: Parcial.

Linhas de pesquisa

1. Efeitos da ração enriquecida com buriti (Mauritia flexuosa L.) sobre o crescimento e parâmetros metabólicos de ratos em crescimento

2. Resistência à insulina e status em magnésio: implicações sobre a homeostase de magnésio e sobre o remodelamento ósseo de roedores alimentados com rações hiperlipídicas

Projetos

Projetos de pesquisaProjetos de pesquisa

2014 – Atual - Resistência à insulina e status em magnésio: implicações sobre o transporte intestinal

e renal de magnésio e sobre o remodelamento ósseo de roedores alimentados com rações hiperlipídicas. Descrição: O aumento da adiposidade, como consequência de alterações no equilíbrio energético, é uma condição que afeta a sensibilidade central e periférica do organismo à insulina. Essas alterações podem interferir na homeostase de magnésio, mineral que atua como cofator essencial de várias enzimas envolvidas no metabolismo dos carboidratos e nas reações de fosforilação, inclusive aquelas envolvidas na via de transdução do sinal da insulina. Este projeto apresenta como proposta avaliar os efeitos da resistência à insulina no status em magnésio e as possíveis alterações na expressão dos canais TRPM6 e 7 nos tecidos renal, ósseo e intestinal, os quais estão envolvidos na regulação da homeostase do mineral.
Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (1); Especialização (0); Mestrado acadêmico (1); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (2); Integrantes: Amanda Batista da Rocha Romero (Responsável); ; Ana Lina de Carvalho Cunha Sales; Alexandre Rodrigues Lobo; Pryscila Dryelle S Teixeira; Eduardo de Carli; Fabiana da Silva Lima; Célia Colli

2012 – Atual - Efeitos de ração enriquecida com Buriti (Mauritia flexuosa) sobre o crescimento e controle metabólico de ratos recém-desmamados. Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa.
Alunos envolvidos: Graduação (5); Mestrado acadêmico (1);
Integrantes: Amanda Batista da Rocha Romero; Maria do Carmo de Carvalho e Martins (Responsável)

2008 – 2009 - Efeitos do extrato hidroalcoólico de Vitex agnus-castus L. (Verbenaceae) na histologia testicular em ratos diabéticos por estreptozocina.
Situação: Concluído. Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (5); Mestrado acadêmico (1);
Integrantes: Amanda Batista da Rocha Romero; Paulo Rocha de Pádua Júnior; Ana Roberta Albuquerque Lira; Nívea Maria da Costa Sousa; Leanny Keyla Almeida; Ana Lina de Carvalho Cunha Sales; Maria do Carmo de Carvalho e Martins (Responsável)

2008 – 2009 - Efeitos do extrato hidroalcoólico de Vitex agnus-castus L. (Verbenaceae) no sistema reprodutor de ratos diabéticos por estreptozocina.
Situação: Concluído. Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (5); Mestrado acadêmico (1);
Integrantes: Amanda Batista da Rocha Romero; Paulo Rocha de Pádua Júnior; Ana Roberta Albuquerque Lira; Nívea Maria da Costa Sousa; Leanny Keyla Almeida; Ana Lina de Carvalho Cunha Sales; Maria do Carmo de Carvalho e Martins (Responsável)

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. DA SILVA LIMA, FABIANA; **DA ROCHA ROMERO, AMANDA BATISTA**; HASTREITER, ARACELI; NOGUEIRA-PEDRO, AMANDA; MAKIYAMA, EDSON; COLLI, CÉLIA; FOCK, RICARDO AMBRÓSIO. An insight into the role of magnesium in the immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells. JOURNAL OF NUTRITIONAL BIOCHEMISTRY. v.55, p.200 - 208, 2018.

2. **DA ROCHA ROMERO, AMANDA BATISTA**; DA SILVA LIMA, FABIANA; COLLI, CÉLIA

Mg status in inflammation, insulin resistance, and associated conditions. Nutrire - Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição. v.42, p.1-6, 2017.

3. LUZ, MARIA MERCÊS DE ARAÚJO; **ROMERO, AMANDA BATISTA DA ROCHA**; BRITO, ANA KAROLINNE DA SILVA; BATISTA, LÍVIA PATRÍCIA RODRIGUES; NOGUEIRA, LÍDYA TOLSTENKO; SANTOS, MARIZE MELO DOS; MARTINS, MARIA DO CARMO DE CARVALHO E
A formação do profissional nutricionista na percepção do docente. Interface (Botucatu. Online). v.19, p.589 - 601, 2015.

4. **ROMERO, A. B. R.**; MARTINS, M. C. C. E.; Nunes P.H. M; FERREIRA, N. R. T.; BRITO, ANA KAROLINNE DA SILVA; CUNHA, P. F. M.; LIMA, A.; ASSIS, R. C.; ARAUJO, E. M. In vitro and in vivo antioxidant activity of Buriti fruit (Mauritia flexuosa L.f.). Nutrición Hospitalaria. v.32, p.2153 - 2161, 2015.

5. DE OLIVEIRA, ANA RAQUEL SOARES; CRUZ, KYRIA JAYANNE CLÍMACO; MORAIS, JENNIFER BEATRIZ SILVA; SEVERO, JULIANA SOARES; FREITAS, TAYNÁH EMANNUELLE COELHO DE; VERAS, ANTONIO LOBÃO; **ROMERO, AMANDA BATISTA DA ROCHA**; COLLI, CÉLIA; NOGUEIRA, NADIR DO NASCIMENTO; TORRES-LEAL, FRANCISCO LEONARDO; MARREIRO, DILINA DO NASCIMENTO. Magnesium Status and Its Relationship with C-Reactive Protein in Obese Women. Biological Trace Element Research. v.168, p.296 - 302, 2015.

6. SOUSA JUNIOR, E. C.; NOGUEIRA, A. M. T.; **ROMERO, A. B.** R.; LEAO, F. G. A.; SOUSA, M. S. B. Frequência de Consumo Alimentar e Índice de Massa Corpórea dos Pacientes submetidos à Sigmoidoscopia no Hospital Universitário em Teresina (PI). Nutrição Brasil. v.9, p.17 - 23, 2010.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **ROMERO, A. B. R.**; Cavassana, V.M. ; FRAGAL, B.; CARLI, E.; LOBO, A. R.; COLLI, C. Dietary magnesium restriction promotes insulin resistance in rats fed a high fat diet In: 21st International Congress of Nutrition, 2017, Buenos Aires. **Ann Nutr Metab**. 2017. v.71.

2. FRAGAL, B.; **ROMERO, A. B. R.**; CARLI, E.; LOBO, A. R.; COLLI, C. Long-term magnesium restriction modified the body iron stores in rats fed a high-fat diet In: 21st International Congress of Nutrition, 2017, Buenos Aires. **Ann Nutr Metab**. 2017. v.71.

3. **ROMERO, A.**; LIMA, F. S.; CARLI, E.; FOCK, R. A.; LOBO, A. R.; COLLI, C. A 16-wk restriction of 90% dietary magnesium requirements impaired whole body insulin sensitivity in rats fed a high-fat diet: preliminary resultf In: 11 Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos, 2015, Campinas - SP. **Anais do Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos 11 SLACA**. 2015. v.2.

4. MARTINS, M. C. C. E.; ROMERO, A. B. R.; Simplício A.P.; Pires M.F.; Silva M.C.; Nunes P.H. M. Efeito do óleo de buriti (Mauritia flexuosa) sobre o trânsito intestinal de camundongos In: XX Congresso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina Prof. Dr. Francisco José de Abreu Matos, 2011, Fortaleza - CE. **Anais do XX Congresso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina Prof. Dr. Francisco José de Abreu Matos**, 2011.

5. MARQUES, M. R.; ROMERO, A. B. R.; PAZ, D. D.; ARAUJO, M. A. M.; MOREIRA-ARAUJO, R. S. Teor de fenólicos totais e poder antioxidante da polpa da castanhola (Terminallia catappa L.) In: 8º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2009, Campinas - SP. **Anais do 8º SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos - "Ciência de Alimentos no mundo globalizado: Novos desafios, Novas perspectivas"**. 2009.

6. LEAO, F. G. A.; ROMERO, A. B. R.; SOUSA JUNIOR, E. C. Análise das Colonoscopias realizadas pelo Serviço de Coloproctologia do Hospital Universitário durante os anos de 2005 a 2008

em Teresina (PI). XV Congresso Médico-Acadêmico do Piauí, 2008, Teresina. **Anais do XV Congresso Médico-Acadêmico do Piauí**. 2008.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **ROMERO, A. B. R. Papel da nutrição no controle das doenças cardiometabólicas**, 2017. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)

2. **ROMERO, A. B. R.**; LIMA, F. S.; CARLI, E.; FOCK, R. A.; LOBO, A. R.; COLLI, CÉLIA. **A 16-WK RESTRICTION OF 90% DIETARY MAGNESIUM RECOMMENDATIONS IMPAIRED WHOLE BODY INSULIN SENSITIVITY IN RATS FED A HIGH-FAT DIET: PRELIMINARY RESULTS**, 2015. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

3. LOBO, A. R.; CARLI, E.; SALES, A. L. C. C.; TEIXEIRA, P. D. S.; ROMERO, A. B. R.; LIMA, F. S.; TAKAYAMA, L.; PEREIRA, R. M. R.; COLLI, C. **BONE MASS AND MICRO-ARCHITECTURE ARE IMPAIRED BY FEEDING GROWING RATS WITH A HIGH-FAT DIET**, 2014. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

4. LOBO, A. R.; DONATO JR, J.; FURIGO, I. C.; SALES, A. L. C. C.; ROMERO, A. B. R.; TEIXEIRA, P. D. S.; CARLI, E.; LIMA, F. S.; COLLI, C. **CHANGES IN MAGNESIUM STATUS IN OBESITY: PRELIMINARY RESULTS USING HIGH-FAT FED RATS AND LEPTIN-DEFICIENT OB/OB MICE**, 2014. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

5. MARTINS, M. C. C. E.; ROMERO, A. B. R.; Simplício A.P.; Pires M.F.; Silva M.C.; Nunes P.H. M. **Efeito do óleo de Buriti (Mauritia flexuosa) sobre o trânsito intestinal de camundongos**, 2011. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

6. MATIAS, J.P.; MARTINS, L.M.; ROMERO, A. B. R.; FREITAS, B.J.S.A. **"Ingestão de cálcio em adolescentes do município de Beneditinos-PI"**, 2011. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

7. PÁDUA JÚNIOR, P. R.; LIRA, A. R. A.; ROMERO, A. B. R.; SOUSA, N. M. C.; ALMEIDA, L. K.; SALES, A. L. C. C.; MARTINS, M. C. C. E. **"Efeito do extrato de Vitex agnus castus sobre o sistema reprodutor de ratos diabéticos"**, 2009. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

8. ROMERO, A. B. R.; PÁDUA JÚNIOR, P. R.; SALES, A. L. C. C.; SOUSA, N. M. C.; ALMEIDA, L. K.; LIRA, A. R. A.; GALVAO, S. M. P.; MARTINS, M. C. C. E. **"Efeitos do extrato hidroalcoólico de Vitex agnus-castus L. (Verbenaceae) no sistema reprodutor de ratos diabéticos por estreptozotocina"**, 2009. (Seminário,Apresentação de Trabalho)

9. MARQUES, M. R.; ROMERO, A. B. R.; MOREIRA-ARAUJO, R. S.; PAZ, D. D.; ARAUJO, M. A. M. **"Teor de fenólicos totais e poder antioxidante da polpa de Castanhola (Terminallia catappa L.)**, 2009. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

10. LEAO, F. G. A.; ROMERO, A. B. R.; SOUSA JUNIOR, E. C. **"Análise das Colonoscopias realizadas pelo Serviço de Coloproctologia do Hospital Universitário durante os anos de 2005 a 2008 em Teresina (PI)."**, 2008. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

11. PARENTE, J. M. L.; SOUSA JUNIOR, E. C.; MACEDO, N. A. A. G.; ROMERO, A. B. R.; LEAO, F. G. A.; BEZERRA, S. A. **"Análise dos exames endoscópicos realizados no Serviço de Coloproctologia do Hospital Universitário"**, 2008. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

12. ROMERO, A. B. R.; LEAO, F. G. A.; SOUSA JUNIOR, E. C.; NOGUEIRA, A. M. T.**"Frequência de Consumo Alimentar e Índice de Massa Corpórea dos pacientes submetidos à Sigmoidoscopia no Hospital Universitário em Teresina (PI)"**, 2008. (Congresso,Apresentação de Trabalho).

Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões concluídas

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. Lays Rafaelle Abrantes Barros e Thaline Alencar Mota. **Avaliação do estado nutricional de idosos cadastrados no programa Hiperdia do centro de saúde Jerusalém em Trizidela do Vale - MA**. 2012. Curso (Enfermagem) - Faculdade de Educação São Francisco

2. Ana Paula de Lima Monteiro Silva e Winny de Sousa Ferreira. **Estado nutricional e fatores relacionados à prática alimentar de crianças de 0 a 6 meses assistidas pela Estratégia Saúde da Família de Pedreiras - MA**. 2012. Curso (Enfermagem) - Faculdade de Educação São Francisco

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **14° Congresso Brasileiro da SBAN**, 2017. (Congresso) Restrição dietética de magnésio promove resistência à insulina em ratos alimentados com dieta hiperlipídica.

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Internacional Congress of Nutrition**, 2017. (Congresso) Dietary magnesium restriction promotes insulin resistance in rats fed a high-fat diet.

3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **International Congress of Nutrition**, 2017. (Congresso) Overweight and obesity in children from Pirai do Sul, Parana, Brazil: a cross-sectional study in rural schools.

4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **International Congress of Nutrition**, 2017. (Congresso) Long-term magnesium restriction modified the body iron stores in rats fed a high-fat diet.

5. **Lipids in 21 century: Where we are?**, 2017. (Encontro).

6. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Semana de Farmácia e Bioquímica da USP**, 2016. (Outra) A 16-wk restriction of 90% dietary magnesium requirements impaired whole body insulin sensitivity in rats fed a high-fat diet: preliminary results.

7. Apresentação de Poster / Painel no(a) **11° Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, 2015. (Simpósio) A 16-wk restriction of 90% dietary magnesium requirements impaired whole body insulin sensitivity in rats fed a high-fat diet: preliminary results.

8. **Biossegurança - Atividades com OGM em contenção**, 2014. (Outra)

9. **Nutrição de Animais de Laboratório**, 2014. (Outra)

10. **12º Congresso Brasileiro de Alimentação e Nutrição**, 2013. (Congresso)

11. **Curso de treinamento no uso de animais de experimentação**, 2013. (Outra)

12. Avaliador no(a) **I Congresso Internacional de Atenção em Saúde: Evidências na APS**, 2013. (Congresso) Avaliação de pôsteres.

13. Conferencista no(a) **I Encontro de Iniciação Científica - ENIC**, 2012. (Encontro)

Profissional liberal e Empreendedorismo: Uma aposta de sucesso!.

14. Apresentação de Poster / Painel no(a) **IV Simpósio Nacional de Produtos Naturais**, 2012. (Simpósio) Efeitos da suplementação alimentar com buriti (Mauritia flexuosa) sobre o crescimento, ganho de peso e perfil lipídico de ratos.

15. Conferencista no(a) **VIII Congresso da FAESF - Desenvolvimento Regional: Sustentabilidade e Inclusão Social**, 2012. (Congresso) Mesa Redonda - Micronutrientes e Obesidade.

16. Conferencista no(a) **VIII Congresso da FAESF - Desenvolvimento Regional: Sustentabilidade e Inclusão Social**, 2012. (Congresso) Atualidades em Nutrição Funcional.

17. **CURSO DE CAPACITAÇÃO EM ALEITAMENTO MATERNO**, 2010. (Outra)

18. **Oficina de Qualificação do NASF para Intesificação das Ações de Redução da Mortalidade Infantil**, 2010. (Oficina).

19. **VIII CONGRESSO NORTE NORDESTE DE NUTRIÇÃO PARENTERAL E ENTERAL E VIII CONGRESSO NORTE NORDESTE DE NUTRIÇÃO CLÍNICA**, 2008. (Congresso)

20. Apresentação de Poster / Painel no(a) **VIII SEMANA BRASILEIRA DO APARELHO DIGESTIVO**, 2008. (Congresso) Análise dos exames endoscópicos realizados no Serviço de Coloproctologia do Hospital Universitário.

21. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XV CONGRESSO MÉDICO-ACADÊMICO DO PIAUÍ**, 2008. (Congresso) Análise das Colonoscopias realizadas pelo Serviço de Coloproctologia do Hospital Universitário durante os anos de 2005 a 2008 em Teresina (PI).

22. **I SIMPÓSIO PIAUIENSE DE ALIMENTAÇÃO ESCOLAR**, 2007. (Simpósio).

23. **IV SIMPÓSIO PIAUIENSE DE SAÚDE E NUTRIÇÃO**, 2007. (Simpósio)

Organização de evento

1. MEDEIROS, L. C. M.; MARTINS, M. C. C. E.; Nunes P.H. M; **ROMERO, A. B. R. I Congresso Internacional de Atenção à Saúde: Evidências na APS**, 2013. (Congresso, Organização de evento)

2. **ROMERO, A. B. R. Comemoração do Dia Mundial da Saúde**, 2012. (Outro, Organização de evento)

3. **ROMERO, A. B. R. I Encontro de Iniciação Científica da FAESF**, 2012. (Outro, Organização de evento)

4. **ROMERO, A. B. R. II Jornada de Nutrição da FAESF**, 2012. (Outro, Organização de evento)

Bancas

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. SANTOS, M.M.; ROMERO, A. B. R.; TEIXEIRA, N. S. C. A. Participação em banca de Clóvis de Oliveira Monteiro Neto. **Conhecimentos sobre alimentação saudável e sua relação com atitudes alimentares de adolescentes da rede municipal de ensino de Teresina-PI**, 2011. (Nutrição) Universidade Federal do Piauí

2. SANTOS, M.M.; TEIXEIRA, N. S. C. A.; **ROMERO, A. B. R.** Participação em banca de Patrícia Almendra Araújo. **Perfil alimentar e estado nutricional de adolescentes da rede pública municipal de Teresina-PI**, 2011. (Nutrição) Universidade Federal do Piauí