AMARILES DINIZ RAMIRES

INFLUÊNCIA DO CÁLCIO E MAGNÉSIO SOBRE O GANHO DE PESO CORPORAL: UMA ABORDAGEM EXPERIMENTAL COM RATOS WISTAR EM CRESCIMENTO.

Campo Grande
2014

AMARILES DINIZ RAMIRES

INFLUÊNCIA DO CÁLCIO E MAGNÉSIO SOBRE O GANHO DE PESO CORPORAL: UMA ABORDAGEM EXPERIMENTAL COM RATOS WISTAR EM CRESCIMENTO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Jose Antônio Braga Neto.
Coorientador: Prof. Dr. Silvio Assis de Oliveira Junior.

Campo Grande
2014

AMARILES DINIZ RAMIRES

INFLUÊNCIA DO CÁLCIO E MAGNÉSIO SOBRE O GANHO DE PESO CORPORAL: UMA ABORDAGEM EXPERIMENTAL COM RATOS WISTAR EM CRESCIMENTO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Resultado: _____

Campo Grande (MS), ____ de _____ de 2014.

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. José Antônio Braga Neto – Presidente – UFMS

_____

Prof.ª D.ra Andreia Conceição Milan Brochado Antoniolli da Silva – UFMS

_____

Prof.ª D.ra Doroty M. Dourado – Anhanguera-UNIDERP

_____

Prof.ª D.ra Karine de Cássia Freitas – Suplente – UFMS

Aos meus filhos, Damaris e Daniel, e meu esposo, Lauri,
motivações maiores e constantes em tudo o que realizo.
Sempre o meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **José Antônio Braga Neto**, meu orientador, pelo acolhimento já em 2011, pela confiança em mim depositada e por haver acreditado que era possível a realização deste projeto, ajudando-me a traçar o caminho do aprendizado e do conhecimento.

Ao Prof. Dr. **Silvio Assis de Oliveira Junior**, que aceitou coorientar-me e esteve sempre disposto a me ajudar e a esclarecer minhas inúmeras dúvidas.

A Prof.ª D.ra **Doroty Mesquita Dourado**, por disponibilizar seu laboratório para a confecção das lâminas e principalmente por disponibilizar seu tempo comigo para a leitura e captura das imagens.

Ao meu esposo, **Lauri**, pela cumplicidade e apoio absoluto e por seus questionamentos que sempre me impulsionaram a buscar mais respostas.

Aos meus filhos, **Damaris** e **Daniel**, que souberam, nesta fase de novos afazeres, compreender minha ausência, mesmo quando estávamos juntos.

Aos técnicos do **Laboratório da Unidade de Tecnologia de Alimentos e Saúde Pública do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)**, em especial ao meu parceiro nos trabalhos práticos e teóricos, **Marcio de Figueiredo**.

Aos membros do **Laboratório de Bioquímica da Unidade de Farmácia-Bioquímica da UFMS**, pelas dosagens dos exames.

Ao médico veterinário **Pedro Cassino de Carvalho**, pela parceria, desde o cuidado dos animais até a finalização do experimento, com a realização das eutanásias e das coletas de sangue e tecidos.

A todos os funcionários do **Biotério da UFMS**, pelo zelo com que resguardaram os experimentos, tornando possíveis as atividades ali realizadas.

Ao **Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da UFMS**, por possibilitar a concretização deste projeto, como seguimento de uma ideia acalentada desde a graduação.

"Os homens devem saber que neste teatro da vida humana
apenas Deus e os anjos podem ser espectadores."
Francis Bacon (1561-1626)

RESUMO

RAMIRES, A.D. **Influência do cálcio e do magnésio sobre o peso corporal: uma abordagem experimental com ratos Wistar em crescimento.** Campo Grande, 2014. [Dissertação – Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.]

O aumento do peso corporal constitui um grave problema mundial de saúde pública, pelo risco elevado de doenças associadas, como diabetes, doenças cardiovasculares, hipertensão e algumas formas de câncer. A escolha de alimentos com alto valor energético e pobres em micronutrientes agrava o quadro nutricional e contribui para a deficiência de minerais importantes para a saúde humana. O uso de minerais, entre eles o cálcio e o magnésio, no controle do peso corporal tem sido objeto de várias pesquisas. O objetivo deste estudo foi analisar a suplementação da ração de ratos Wistar com os minerais cálcio e magnésio. Para tanto, conduziu-se um ensaio biológico com 24 animais, distribuídos em quatro grupos de seis. O grupo controle (GI) recebeu ração no padrão AIN-93G (19,74% de proteína, 7,48% de lipídeo, 52,64% de carboidrato e 3,5% de mistura salina, com 5 000 mg de cálcio e 500 mg de magnésio por quilo de ração); o grupo suplementado com cálcio (GII) recebeu essa ração contendo aproximadamente o quádruplo deste mineral; o grupo suplementado com magnésio (GIII) a recebeu com aproximadamente o quádruplo deste mineral; e o grupo suplementado com lipídeo (GIV) a recebeu com adição de 14% de óleo vegetal, porém sem suplementação dos minerais. As rações mantiveram-se isocalóricas (3,57 kcal/g). As variáveis mensuradas foram peso, coeficiente de eficácia alimentar, morfologia de fígado e rim e os seguintes parâmetros laboratoriais: colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), triglicérides (TG) e cálcio e magnésio séricos. Ao fim de 35 dias, constatou-se que os animais do grupo GII apresentaram menor índice de eficácia alimentar, quando comparados com os demais grupos, e consequentemente menor peso corporal, e também apresentaram aumento significativo nos níveis de VLDL, TG e cálcio sérico e diminuição no de magnésio sérico. As análises morfológicas de fígado e rim revelaram alteração tecidual em todos os grupos que receberam suplementação. A suplementação com cálcio revelou-se um possível recurso para o controle do peso corporal, diferentemente do observado com os animais que receberam suplementação de magnésio, cujos resultados se assemelharam aos dos controles.

Palavras-chave: peso corporal, suplementação, dieta, cálcio, magnésio

ABSTRACT

RAMIRES, A.D. **The influence of calcium and magnesium on body weight: an experimental approach with growing Wistar rats.** Campo Grande, 2014. [Master's thesis – Graduate Program in Health and Development in Midwest Brazil, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil.]

The increase in body weight is a serious global public health problem, with high risk of associated diseases such as diabetes, cardiovascular disease, hypertension, and some forms of cancer. The option for foods with high energy value but poor in micronutrients increases the nutritional status and contributes to the deficiency of important minerals in human health. The use of minerals, among them calcium and magnesium, to control body weight has been the object of several studies. The purpose of this study was to investigate the effect of with the calcium and magnesium supplementation in diets offered to Wistar rats. To this end, a biological assay was conducted with 24 animals, distributed in four groups of six. The control group (GI) received feed prepared according to the AIN-93G standard (19.74% protein, 7.48% lipid, 52.64% carbohydrate, and 3.5% saline mixture, with 5000 mg of calcium and 500 mg of magnesium per kilogram of feed); the calcium-supplemented group (GII) received this diet containing approximately four times this mineral; the group supplemented with magnesium (GIII) received approximately four times this mineral; and the lipid-supplemented group (GIV) received it with a 14% addition of vegetable oil, but no mineral supplementation. The diets were isocaloric (3.57 kcal/g). The variables measured were weight, feed efficiency coefficient, liver and kidney morphology, and the following laboratory parameters: total cholesterol (TC), high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL), triglycerides (TG), and serum calcium and magnesium levels. After 35 days, the GII animals showed the lowest level of feed efficiency, when compared with the other groups, and consequently exhibited lower body weight, with a significant increase in VLDL, TG and serum calcium levels and a decrease in serum magnesium. The morphological analysis of liver and kidney revealed tissue changes in all groups that received supplementation. The supplementation with calcium proved a possible resource for body weight control, in contrast with that observed in the animals that received magnesium supplementation, whose results were similar to those of controls.

Keywords: body weight, supplementation, diet, calcium, magnesium

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de referência para consumo diário (*dietary reference intake*) de cálcio, por faixa etária 17

Tabela 2. Valores de referência para consumo diário (*dietary reference intake*) de magnésio, por faixa etária. 22

Tabela 3. Matriz do delineamento experimental. 26

Tabela 4. Composição das rações, conforme AIN-93G. 27

Tabela 5. Composição química das rações utilizadas no experimento, por grupo de animais. 34

Tabela 6. Concentrações dos minerais nas rações utilizadas no experimento. 35

Tabela 7. Ingestão alimentar (g) em ratos Wistar, por grupo de estudo e momento de avaliação. 36

Tabela 8. Ganho de massa corporal (g), por grupo e momento de avaliação. 39

Tabela 9. Médias e desvios-padrão dos perfis bioquímicos, por grupo de estudo. 42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de regulação de cálcio no sangue. 19

Figura 2. Distribuição e organização dos grupos. 26

Figura 3. Procedimentos para a coleta de sangue. 32

Figura 4. Procedimentos de análise histológica de órgãos. 32

Figura 5. Processamento das estruturas teciduais. 33

Figura 6. Ingestão calórica total por indivíduo, por grupo de estudo. 37

Figura 7. Índices de eficiência alimentar observados nos grupos de estudo. 38

Figura 8. Evolução do peso corporal dos animais (g) ao longo das cinco semanas, por grupo. 40

Figura 9. Seção hepática de ratos Wistar. 45

Figura 10. Seção renal de ratos Wistar. 46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11
2 REVISÃO DE LITERATURA 13
2.1 ASPECTOS NUTRICIONAIS GERAIS 13
2.2 AUMENTO DO PESO CORPORAL 14
2.3 MINERAIS 15
2.3.1 CÁLCIO 16
2.3.1.1 Cálcio e peso corporal 18
2.3.2 MAGNÉSIO 20
2.3.2.1 Magnésio e peso corporal 23
3 OBJETIVOS 24
3.1 Objetivo geral 24
3.2 Objetivos específicos 24
4 METODOLOGIA 25
4.1 ANIMAIS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS 25
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 26
4.3 RAÇÕES EXPERIMENTAIS 27
4.3.1 DETERMINAÇÃO QUÍMICA 28
4.3.1.1 Umidade 28
4.3.1.2 Minerais totais 28
4.3.1.3 Lipídeos 29
4.3.1.4 Proteínas 29
4.3.1.5 Carboidratos 29
4.3.1.6 Minerais (cálcio e magnésio) 29
4.3.1.7 Valor calórico total 30
4.4 EFICÁCIA ALIMENTAR 30
4.5 INGESTÃO CALÓRICA 30
4.6 ACOMPANHAMENTO DE PESO E CONSUMO DE RAÇÃO 31
4.7 EXAMES BIOQUÍMICOS 31
4.8 ANÁLISE MORFOLÓGICA 32
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA 33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 34
5.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E CALÓRICA DAS DIETAS ADMINISTRADAS 34
5.2 INGESTÃO ALIMENTAR E CALÓRICA TOTAL 36
5.3 EFICIÊNCIA ALIMENTAR 37
5.3.1 COMPORTAMENTO PONDERAL 38
5.4 PERFIL BIOQUÍMICO 41
5.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA 44
5.5.1 FÍGADO 44
5.5.2 RIM 46
6 CONCLUSÃO 48
REFERÊNCIAS 49
ANEXO 54

1 INTRODUÇÃO

Considerada um dos maiores problemas de saúde pública, a obesidade é uma das doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs) que, epidemiologicamente, mais crescem em todo o mundo, sendo por isso objeto de políticas de saúde pública. No Brasil, esse fenômeno é marcante, com aumento de sua prevalência em adolescentes, adultos e idosos (SILVA; MURA, 2007; SICHIERI; SOUZA, 2008).

Ocupam papel de destaque os estudos e intervenções voltados a crianças e adolescentes. A explicação para o aumento do peso nesta faixa etária seria a redução de atividades físicas e a adoção de um modelo de vida familiar pouco saudável, que estimularia o superconsumo de alimentos (SUTER; RUCKSTUHL, 2006).

É uma doença recorrente e de difícil controle, por consistir em um desequilíbrio energético associado a diversos distúrbios metabólicos. Suas causas são multifatoriais, inclusive genéticas e ambientais, sendo que a disponibilidade de dietas com altas densidades energéticas tem contribuído para o aumento de sua prevalência (COZZOLINO, 2007).

A obesidade pode ser o resultado mais característico da má nutrição, atingindo grande parcela da população. O desequilíbrio do balanço energético é um fator contribuinte para o agravamento desta doença (SILVA; MURA, 2007).

A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2006) destaca que manter o equilíbrio energético é fundamental para o controle da obesidade, sendo por isso a primeira recomendação do documento internacional conhecido como *Estratégia global*, incorporada no Brasil ao *Guia alimentar para a população brasileira* (BRASIL, 2006).

Estudos epidemiológicos voltados a encontrar formas de controle para doenças associadas à obesidade têm proposto uma nova abordagem para o uso de minerais, especificamente associado ao controle do peso corporal, identificando a alta ingestão dietética de cálcio como um fator negativo para o aumento do índice de massa corporal (IMC), e a alta ingestão de magnésio como fator contribuinte para o controle da hipertensão arterial, patologia que agrava o quadro da obesidade. Entretanto, os resultados de tais pesquisas mostram-se controversos e ainda inconclusivos quanto à eficácia destes minerais (COZZOLINO, 2007).

Há evidências de que outros minerais possam se correlacionar com o controle da adiposidade, entre eles o magnésio, que pode ter efeito antiobesidade semelhante ao do cálcio,

uma vez que também pode formar sais com ácidos graxos no intestino e, desta forma, reduzir o conteúdo de energia digerível da dieta (COZZOLINO, 2007).

Os níveis de cálcio intracelular podem se elevar tanto na deficiência de cálcio quanto na de magnésio, havendo evidências de que a combinação destes minerais pode ter efeito benéfico sobre a pressão arterial, os níveis de colesterol e o controle da obesidade (PASCHOAL *et al.*, 2009; COZZOLINO, 2007).

Diante destas considerações, buscou-se com este estudo verificar a possível influência dos minerais cálcio e magnésio sobre o controle do ganho de peso corporal e suas correlações na prevenção das alterações metabólicas associadas à obesidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS NUTRICIONAIS GERAIS

Dentre os estudos de base populacional realizados no Brasil com enfoque em problemas nutricionais, destacam-se o *Estudo nacional sobre despesas familiares* (ENDEF) (IBGE, 1976), a *Pesquisa nacional sobre saúde e nutrição* (PNSN) (BRASIL, 1990, 1991), a *Pesquisa sobre padrões de vida* (PPV) (IBGE, 1997), e duas versões da *Pesquisa de Orçamentos Familiares* (POF), relativas aos biênios 2002-2003 (IBGE, 2004) e 2008-2009 (IBGE, 2011). Estes foram trabalhos de grande importância, por permitirem avaliar a magnitude dos agravos nutricionais e evidenciar as modificações ocorridas nos padrões nutricionais. Tais estudos ainda norteiam discussões e pesquisas sobre a transição nutricional que se processa no Brasil até os dias de hoje.

Em seu aspecto mais visível, a transição epidemiológica pode ser retratada na mudança do perfil demográfico e de seus vetores proximais mais relevantes: a natalidade e a mortalidade. Nesse âmbito, destaca-se como observação histórica importante a de Malthus (1999), de que a mortalidade na população humana tenderia a cair e a natalidade a manter seus padrões quantitativos, o que culminaria em um balanço populacional preocupante.

Em termos qualitativos, a transição epidemiológica envolve uma mudança dos padrões de morbimortalidade, de um amplo predomínio de doenças infectoparasitárias e carenciais para uma hegemonia (75%) das DCNTs, entre elas as associadas ao sobrepeso e à obesidade (POPKIN, 1993; BARRETO; CARMO, 2000; BATISTA FILHO; BATISTA FILHO; RISSIN, 2003; KAC; VELASQUEZ-MELÉNDEZ, 2003).

Segundo Popkin (1993), as mudanças nos padrões nutricionais levaram à adoção de dietas com alta densidade calórica, fato que, acompanhado de uma redução na atividade física e de mudanças sociais, econômicas e demográficas, tem definido o conceito de transição nutricional, cuja característica básica é o crescimento de dietas ricas em gordura, açúcares e alimentos refinados e a redução do consumo de carboidratos complexos e fibras.

O perfil alimentar da população brasileira apresentou expressivas mudanças nos últimos 30 anos, o que corresponde ao período mais característico da transição nutricional no país, tendo por traço predominante a emergência epidêmica do sobrepeso, e particularmente

da obesidade, como evento de maior visibilidade epidemiológica, com implicações nos índices de morbimortalidade (BATISTA FILHO; ASSIS; KAC, 2007).

2.2 AUMENTO DO PESO CORPORAL

Pela primeira vez na história, o número de indivíduos com excesso de peso supera o de desnutridos (ROTH *et al*., 2004). Estima-se que, mundialmente, cerca de 1,6 bilhão de adultos (com mais de 15 anos) tenham sobrepeso, com índice de massa corporal (IMC) superior a 25 kg/m^2, e que pelo menos 400 milhões sejam obesos, com IMC superior a 30 kg/m^2, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2011), que define a obesidade como acúmulo anormal ou excessivo de gordura que pode prejudicar a saúde. Constituindo o quinto maior fator de risco para morte, tanto em adultos como em crianças, a obesidade também eleva os riscos de DCNTs (WHO, 2011).

O Consenso Latino-Americano de Obesidade (FLASO, 1999) caracteriza essa doença como endócrino-metabólica, crônica, reincidente, heterogênea, com predomínio genético e de custo elevado, com impacto negativo sobre a expectativa de vida.

Estudos têm demonstrado que a obesidade associa-se fortemente a risco de desfechos indesejáveis, tanto cardiovasculares e de câncer quanto de aumento na mortalidade e de incapacidade funcional. A pesquisa intitulada *National health and nutrition examination study III* (NHANES III), realizada em 1988-1994 nos Estados Unidos, com mais de 16 mil participantes, constatou associação entre obesidade e aumento das DCNTs, incluindo prevalência de diabetes tipo 2, doença da vesícula biliar, doença arterial coronariana, hipertensão arterial sistêmica, osteoartrose e dislipidemia.

Em 2011, o Ministério da Saúde e o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2011) divulgaram dados sobre o excesso de peso e a obesidade no Brasil, colhidos na POF relativa ao biênio 2008-2009, revelando um aumento contínuo do excesso de peso e da obesidade na população: 47,8% das crianças de 5 a 9 anos, 25,4% dos adolescentes de 10 a 19 anos e 63,8% dos adultos com 20 anos ou mais apresentavam sobrepeso ou obesidade.

No panorama atual, a ingestão excessiva de macronutrientes como lipídeos e açúcares está frequentemente associada ao baixo consumo de micronutrientes, podendo levar indivíduos obesos ou com sobrepeso a vivenciar déficits nutricionais em decorrência de suas escolhas alimentares (KAIDAR-PERSON *et al.*, 2008).

2.3 MINERAIS

Os minerais, considerados uma grande classe de micronutrientes majoritariamente essenciais, são tradicionalmente categorizados em macrominerais (elementos de volume) e microminerais (elementos-traço). Os primeiros são necessários em quantidades de ao menos 100 mg/dia, enquanto os microminerais são requisitados em quantidades bem menores, de cerca de 15 mg/dia. Tanto nos alimentos quanto no organismo, os macrominerais são encontrados principalmente em estado iônico (JOHN *apud* MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2005). Constituem no mínimo 0,01% do peso corporal total, sendo os principais o cálcio, o fósforo, o magnésio, o sódio, o potássio e o cloro (GROPPER; SMITH; GROFF, 2011).

Historicamente, a noção de que os minerais são necessários na nutrição evoluiu a partir do conhecimento da composição mineral de tecidos e fluidos corporais (GROPPER; SMITH; GROFF, 2011).

Os minerais são essenciais para as funções orgânicas, seja em forma iônica ou como constituintes de compostos como hormônios, enzimas e proteínas teciduais. Perfazendo cerca de 4% do peso corporal total (WIEGERT; CALIXTO-LIMA; COSTA, 2012), regulam o metabolismo enzimático, mantendo o equilíbrio ácido-básico e a pressão osmótica, viabilizando assim a transferência de compostos pelas membranas celulares e participando do processo de composição de tecidos. Os minerais apresentam sinergia mútua: o excesso ou deficiência de um deles interfere diretamente no metabolismo de outro (BORGES *et al.*, 2006).

As interações entre minerais podem ser diretas e indiretas. Ocorre interação direta quando estes competem pelo mesmo sítio de absorção, por possuírem propriedades físicas e químicas semelhantes. Nesta situação, o excesso de um mineral prejudica a utilização do outro. Na interação indireta, um mineral depende do outro para ser transformado em sua forma ativa, ou seja, uma deficiência deste acarretará prejuízo de função no primeiro (COUZI *et al.*, 1993).

Kaluza *et al.* (2009) examinaram a associação entre ingestão de cálcio e de magnésio. Embora sem identificar conclusivamente qual seria a ingestão ideal para equilíbrio entre esses minerais, constataram o antagonismo destes em termos de absorção e metabolismo, especialmente quando a ingestão de um era significativamente mais elevada que a do outro. Além disso, observaram haver associação entre o consumo destes dois micronutrientes e a incidência de DCNTs.

2.3.1 CÁLCIO

O cálcio é o cátion bivalente (Ca^{2+}) mais abundante no organismo, constituindo cerca de 1,5% a 2% do peso corporal humano, majoritariamente nos ossos, sob a forma de hidroxiapatita. A parcela restante encontra-se distribuída nos vários tecidos e líquidos extracelulares, desempenhando funções importantes na manutenção da vida, incluindo a coagulação sanguínea, a condução neuromuscular, a excitabilidade da musculatura esquelética e cardíaca, a ativação enzimática e a conservação da integridade e permeabilidade da membrana celular (CARREIRO, 2011; GROPPER; SMITH; GROFF, 2011; COZZOLINO, 2007).

Esse importante mineral é o único que apresenta regulação hormonal, pois sua concentração no sangue precisa obedecer a parâmetros bem definidos, fora dos quais sobrevêm desequilíbrios funcionais, com risco de morte (CARREIRO, 2011).

No sangue circulante, a concentração normal de cálcio varia de 2,25 a 2,5 mmol/L, sendo que 40% a 45% desse mineral apresenta-se ligado a proteínas plasmáticas, 8% a 10% encontra-se complexado com íons, tais como citrato, e 45% a 50% está dissociado sob a forma de íons livres. A concentração de cálcio no líquido extracelular é regulada pelo próprio mineral, seja por meio de seu receptor ou por ação dos sistemas de controle hormonais, dos quais os mais importantes são o do hormônio da glândula paratiroide, ou paratormônio (PTH), o da 1,25-di-hidroxivitamina D_3 ($1,25(OH)_2$ D_3), ou calcitriol, e o da calcitonina (SHILS *et al.*, 2003; EMKEY; EMKEY, 2012).

O cálcio só pode ser absorvido por meio da ingestão alimentar. Sua absorção é influenciada pela idade do indivíduo, por fatores genéticos, pela própria ingestão alimentar, pela presença de doenças e pelo uso de medicamentos (PIRES; COZZOLINO, 2013).

Dentre as fontes alimentares de cálcio, destacam-se o leite e seus derivados. Nos alimentos e suplementos dietéticos, o elemento comparece na forma de sais relativamente insolúveis. As leguminosas e seus derivados (especialmente o tôfu, ou coalhada de soja) e as frutas desidratadas também são fontes relativamente ricas nesse elemento (GROPPER; SMITH; GROFF, 2011).

O requerimento de cálcio pelo organismo depende da quantidade necessária para reposição das perdas, variando com necessidades particulares, como descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de referência para consumo diário (*dietary reference intake*) de cálcio, por faixa etária

Faixa etária	RDA, Al (mg/dia)	UL (mg/dia)
Lactentes		
0-6 meses	210	ND[4]
7-12 meses	270	ND
Crianças		
1-3 anos	500	2500
4-8 anos	800	2500
Homens		
9-18 anos	1300	2500
19-50 anos	1000	2500
>51 anos	1200	2500
Mulheres		
9-18 anos	1300	2500
19-50 anos	1000	2500
>51 anos	1200	2500
Gestantes		
≤18 anos	1300	2500
≥19 anos	1000	2500
Lactantes		
≤18 anos	1300	2500
≥19 anos	1000	2500

RDA (*recommended dietary allowance*): ingestão dietética recomendada; AL (*adequate intake*): ingestão adequada; UL (*tolerable upper intake level*): limite máximo tolerável de ingestão.

Fonte: Food and Nutrition Board (1998).

Nota: A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece os seguintes níveis mMáximos de segurança: adultos: 1 500 mg; lactentes: 150 mg/kg de peso corporal, até o limite de 1 200 mg; pediátrico: 80 mg/kg de peso corporal, até o limite de 1500 mg.

Há correlação funcional entre cálcio, potássio, sódio e magnésio para a manutenção da normalidade metabólica. Um aumento significativo no nível de cálcio sérico pode causar insuficiência cardíaca ou respiratória; sua diminuição resulta em tetania. De modo geral, quanto maior a necessidade e menor o fornecimento dietético, mais eficiente será a absorção desse mineral, principalmente se os níveis de Vitamina D estiverem adequados (CARREIRO, 2011).

São dois os processos de transporte responsáveis pela absorção do cálcio. Um é o transporte ativo, ou transcelular, saturável, controlado por ação da 1,25-di-hidroxivitamina D. Este hormônio aumenta a captura do cálcio na borda em escova da mucosa intestinal, o que ocorre principalmente no duodeno e na porção superior do jejuno. Um segundo mecanismo de transporte é a difusão passiva, ou paracelular, não saturável, que também sofre interferência da vitamina D_3 e ocorre em todo o intestino delgado, principalmente no íleo, e também em cerca de 5% no intestino grosso (CARREIRO, 2011; WEAVER; HEANEY, 2003). Em baixas

concentrações, a absorção se faz basicamente por via transcelular; em maiores concentrações, por via paracelular (SCHLINGMANN; KONRAD; SEYBERTH, 2004).

O cálcio é absorvido apenas em sua forma hidrossolúvel em meio ácido e sem estar precipitado com outros constituintes da dieta, como os fitatos e os oxalatos. O mineral não absorvido é excretado nas fezes (CARREIRO, 2011).

Deficiências no consumo de cálcio a longo prazo têm sido associadas não só ao desenvolvimento de osteoporose, mas também de obesidade e sobrepeso.

2.3.1.1 Cálcio e peso corporal

Estudos epidemiológicos identificaram haver relação inversa entre o consumo de cálcio e o IMC. O baixo consumo de cálcio pode contribuir para o desenvolvimento da obesidade, a resistência à insulina e a hipertensão, ainda que de forma indireta. Isso pode decorrer do consumo inadequado do mineral, com consequências sobre vários tecidos, incluindo aqueles não relacionados à homeostase desse mineral (PASCHOAL *et al*., 2009).

Além de seu papel na manutenção da homeostasia mineral óssea, o cálcio atua na cinética lipídica adipocitária. O aumento de sua concentração nos adipócitos altera o balanço entre a síntese e a utilização de lipídios, favorecendo a lipogênese. Estima-se que variações de 3% a 10% do peso corporal adulto possam estar associadas a altos níveis de ingestão de cálcio (HEANEY *et al.*, 2000; SHI; DIRIENZO; ZEMEL *et al*, 2000).

A concentração do cálcio intracelular pode ser regulada pelos níveis de hormônios calcicotrópicos, como a 1,25-di-hidroxivitamina D_3 e o PTH, os quais, por sua vez, são modulados pela ingestão de cálcio. O consumo insuficiente desse elemento aumenta a concentração destes hormônios, causando influxo de cálcio nos adipócitos e consequente aumento da lipogênese e redução da lipólise, ao estimular a expressão da ácido-graxo-sintase, enzima-chave da lipogênese. A suplementação de cálcio a seres humanos pode causar supressão significativa do PTH, da 1,25-dihidroxivitamina D_3 e de íons Ca^{2+} em eritrócitos e plaquetas (PARIKH; YAHOVSKI, 2003; XUE *et al*., 2001; ZEMEL, 1998; ZEMEL *et al*., 2000).

Os níveis plasmáticos desse elemento são regulados por um complexo sistema fisiológico, apresentado na Figura 1, o qual inclui interação entre hormônios calcicotrópicos,

como o paratormônio (PTH), o di-hidrocolecalciferol (vitamina D_3) e a calcitonina, que atuam em receptores específicos nos rins, ossos e intestino e mantêm o equilíbrio entre as três formas de cálcio. Decréscimos na concentração plasmática de cálcio provocam aumento da secreção de PTH, que remove esse mineral dos ossos e aumenta sua reabsorção renal (CASHMAN; FLYNN, 1999).

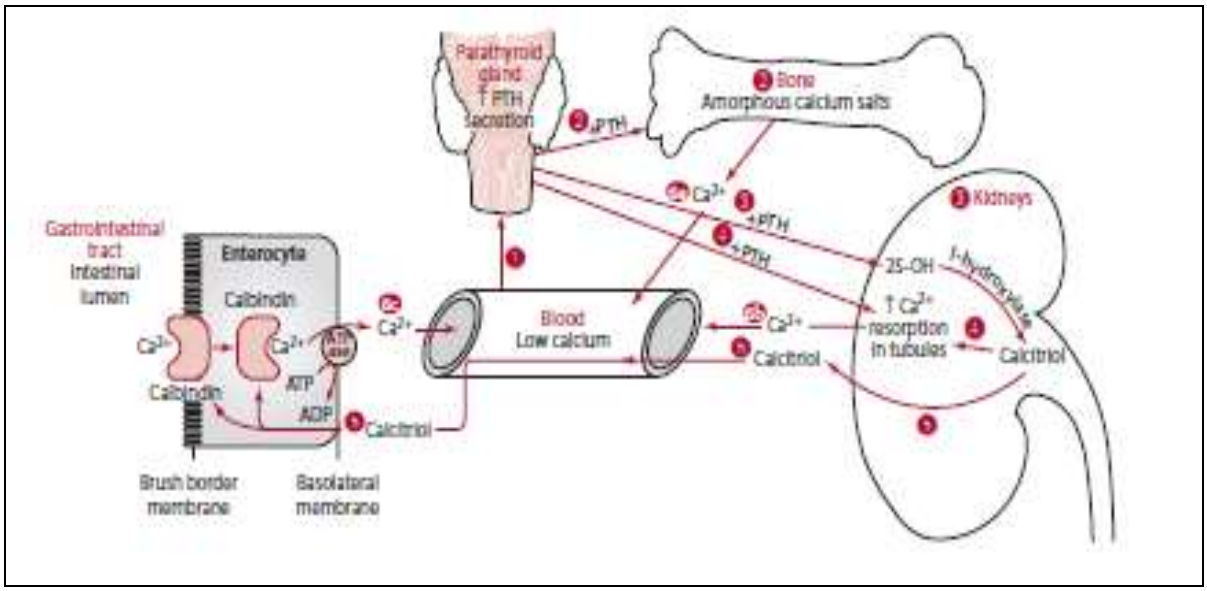


Figura 1. Mecanismo de regulação de cálcio no sangue.
Fonte: Gropper, Smith e Groff (2011, p. 434.)

A secreção do hormônio PTH é diretamente influenciada pelas concentrações plasmáticas de cálcio e de magnésio (GROPPER; SMITH; GROFF, 2011).

Na década de 1980, estudos epidemiológicos já evidenciavam uma associação negativa entre o consumo de cálcio e determinadas medidas antropométricas, apontando que o mecanismo mais provável da associação entre cálcio e obesidade envolveria a proteína relacionada ao gene agouti (AGRP), que é expressa nos adipócitos (SANTOS *et al.*, 2007). Já Metz *et al.* (1988) demonstraram a diminuição da gordura corporal em ratos com hipertensão arterial submetidos a dieta com alta suplementação de cálcio.

Diferentemente do cálcio dietético, o cálcio intracelular tem sido apontado como fator contribuinte para aumento dos adipócitos. Pesquisas utilizando ratos revelaram que a expressão de AGRP aumenta a síntese e a atividade da enzima ácido-graxo-sintase, que desempenha importante função na lipogênese e é regulada por hormônios e nutrientes (ZEMEL *et al.*, 2000), processo este que diminui a lipólise, com consequente elevação de peso. Incrementos na ingestão de cálcio dietético contribuem para aumentar a excreção fecal

de ácidos graxos, devido à capacidade do mineral em formar sabões de gordura no intestino (SANTOS, 2008).

Estudos de Zemel *et al.* (1999) e Teegarden *et al.* (1999) estimularam novas pesquisas voltadas a elucidar a relação entre cálcio dietético e peso corporal.

Segundo Rude *et al.* (2003), o cálcio atua no organismo como antagonista do magnésio, competindo com este pela absorção intestinal.

2.3.2 MAGNÉSIO

Participante de mais de 300 reações metabólicas essenciais, o magnésio é o principal cátion bivalente intracelular (Mg^{2+}), apresentando no citosol concentração livre de cerca de 0,5 mmol/L, inferior apenas à do potássio. Importante para diversas reações celulares, tem participação em quase todas as reações anabólicas e catabólicas. Sua concentração no organismo humano varia de 20 a 28 g (1 mol), sendo que 60-65% deste mineral encontram-se no tecido ósseo, 27% no tecido muscular e 6% nos demais tecidos. Sua concentração plasmática varia de 1,5 a 2,5 mmol/L. É indispensável à respiração celular, particularmente na fosforilação oxidativa, que conduz à formação de adenosina trifosfato (ATP) (CARREIRO, 2011; COZZOLINO, 2007; SHILS *et al.*, 2003).

O mineral tem sido objeto de estudos clínicos, por controlar grande número de funções celulares, incluindo o transporte de íons cálcio e potássio, a modulação de sinais de transdução, o metabolismo de energia e a proliferação celular. Sua concentração é maior nos órgãos que desempenham maior atividade metabólica, como coração, cérebro, fígado e rins (BORGES *et al.*, 2006; CARREIRO, 2011; COZZOLINO, 2007).

O magnésio e o cálcio formam complexos estáveis e, dependendo de suas concentrações, podem agir sinérgica ou antagonicamente. Na depleção de magnésio, o cálcio intracelular se eleva, alterando várias ações hormonais, enzimáticas e de neurotransmissores (CARREIRO, 2011).

Na circulação, o magnésio apresenta-se sob três formas: dissociado-ionizado, ligado a albumina ou complexado com fosfato, citrato ou outros ânions. Apresenta-se biologicamente ativo sob forma livre e ionizada. Em condições fisiológicas, a concentração de magnésio no soro se mantém praticamente constante (SHILS *et al.*, 2003).

O magnésio é encontrado em uma ampla gama de alimentos vegetais e animais, em diferentes concentrações, sendo os vegetais folhosos as melhores fontes, seguidos de legumes, produtos marinhos, nozes, cereais e laticínios (COZZOLINO, 2007). É um dos minerais mais carentes na alimentação humana atual, embora seja um dos mais exigidos em processos de estresse (CARREIRO, 2011).

A esse respeito, Rayssiguier *et al.* (2010) apontam o processo de refinação dos alimentos como uma das causas da redução dos minerais na alimentação ocidental, particularmente no caso do magnésio, cuja ingesta tem se tornado apenas marginal. Além disso, as dietas ricas em produtos de origem animal e pobres em vegetais induzem à acidose, que acarreta excreção de magnésio.

As necessidades de magnésio são afetadas por fatores ligados à biodisponibilidade. Os níveis recomendados para sua ingestão estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Valores de referência para consumo diário (*dietary reference intake*) de magnésio, por faixa etária.

Faixa etária	EAR (mg/dia)	RDA (mg/dia)	UL (mg/dia)
Lactentes			
7 a 12 meses	ND	ND	ND
Crianças			ND
1 a 3 anos	65	80	
4 a 8 anos	110	130	
Homens			350
9-13 anos	200	240	
14-18 anos	340	410	
19-30 anos	330	400	
>30 anos	350	420	
Mulheres			350
9-13 anos	200	240	
14-18 anos	300	360	
19-30 anos	255	310	
>30 anos	365	320	
Gestantes			350
14-18 anos	355	400	
19-30 anos	290	350	
31-50 anos	300	360	
Lactantes			350
14-18 anos	300	360	
19-30 anos	255	310	
31-50 anos	265	320	

ND: não determinado; EAR (*estimated average requirement*): recomendação média estimada; RDA (*recommended dietary allowance*): ingestão dietética recomendada; UL (*tolerable upper intake level*): limite máximo tolerável de ingestão.

Fonte: Food and Nutrition Board (1998).

Nota: A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece os seguintes níveis mMáximos de segurança: adultos: 700 mg; lactentes: 10 mg/kg de peso corporal, até o limite de 80 mg; pediátrico: 10 mg/kg de peso corporal, até o limite de 200 mg.

O magnésio apresenta interrelações com diversos nutrientes, principalmente com o cálcio, sendo necessário para a secreção de PTH, hormônio importante para a homeostase do cálcio, da vitamina D e da calcitonina. Como já exposto, esses elementos podem, dependendo de suas concentrações, agir sinérgica ou antagonicamente (CARREIRO, 2011).

Dados epidemiológicos e estudos experimentais sugerem existir relação inversa entre pressão sanguínea e ingestão de magnésio. Embora não esteja ainda elucidado o mecanismo de controle desse elemento sobre os níveis de pressão, sabe-se que este promove relaxamento da musculatura lisa e interage com o cálcio (GROPPER; SMITH; GROFF, 2011).

2.3.2.1 Magnésio e peso corporal

O envolvimento do magnésio na regulação do peso é ainda controversa, e os estudos têm apontado tanto relações negativas quanto positivas entre a ingesta desse mineral e IMC.

O magnésio pode ter efeito antiobesidade semelhante ao do cálcio porque também pode formar sais com ácidos graxos no intestino e desta maneira reduzir o conteúdo de energia da dieta. Estudos recentes mostram que indivíduos obesos apresentam maior resistência à insulina e menores concentrações de magnésio sérico e eritrocitário (COZZOLINO, 2007).

Em estudo realizado por McKeown *et al*. (2008) com 179 homens e 386 mulheres, a ingestão de magnésio foi avaliada com registros de três dias, revelando correlação entre os quartis de ingestão do mineral e a prevalência de síndrome metabólica e peso corporal excessivo. Os indivíduos que fizeram maior ingestão de magnésio mostraram-se menos propensos ao excesso de peso ou à obesidade.

Tendo em conta esse conjunto de informações, buscou-se com o presente estudo focalizar os mecanismos envolvidos na patogênese do excesso de peso corporal, considerando sua possível relação com os níveis de ingesta de cálcio e magnésio.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a influência dos minerais cálcio e magnésio sobre o peso corporal em ratos Wistar.

3.2 Objetivos específicos

– Realizar ensaio biológico em ratos Wistar utilizando as rações em estudo.
– Registrar e analisar a evolução do peso corporal dos animais.
– Registrar e analisar a ingestão alimentar e calórica.
– Determinar o coeficiente de eficácia alimentar.
– Analisar os efeitos dos dois minerais sobre o ganho de peso corporal.
– Avaliar os níveis séricos dos dois minerais.
– Avaliar os parâmetros bioquímicos ao final do experimento.
– Efetuar a análise morfológica de fígado e rim ao final do experimento.

4 METODOLOGIA

O estudo atendeu às normas estabelecidas no *Guide for the care and use of laboratory animals* do National Research Council (NRC, 1996) e os *Princípios éticos na experimentação animal* do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991) e foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), sob o protocolo 575/2013 (Anexo A).

4.1 ANIMAIS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 24 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar recém-desmamados, com peso médio de 33 g, provenientes de colônias do Biotério da UFMS. Os animais foram inicialmente agrupados aleatoriamente por três dias para aclimatação.

Durante todo o experimento, os animais tiveram acesso *ad libitum* a ração e água deionizada (para que não houvesse a interferência de minerais provenientes desta fonte). A alimentação obedeceu ao protocolo de dieta AIN-93G do American Institute of Nutrition (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993), quadruplicando-se, porém, os teores de cálcio (na forma de carbonato) e magnésio (na forma de óxido), caracterizando assim a suplementação pretendida para o experimento, apresentada na Tabela 3.

Após a aclimatação, os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos de seis indivíduos. Cada grupo foi subdividido em dois conjuntos de três animais, sendo cada subgrupo acomodado em uma caixa de polietileno, de modo a evitar superlotação, permitir melhor controle do consumo de ração e facilitar a verificação do peso, conforme Figura 2.

Os animais foram mantidos sob fotoperíodo controlado (12 h de claridade e 12 h no escuro), em temperaturas de 20 a 24 °C.

Todo o experimento foi realizado nas dependências do Biotério da UFMS, no setor destinado a experimentações, de setembro a outubro de 2013, totalizando um período de 35 dias.

A

B

C

Figura 2. Distribuição e organização dos grupos.
(A) aclimatação inicial de cinco dias, em grupos de seis; (B) subdivisão em dois grupos de três; (C) alojamento dos subgrupos.
Fotos: A autora.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para verificar a influência das variáveis independentes cálcio, magnésio e lipídeo sobre o ganho de peso corporal, foi elaborado o planejamento experimental indicado na Tabela 3.

Tabela 3. Matriz do delineamento experimental.

Grupos	**Variáveis originais (mg/1 000 g de ração)**			**Variáveis codificadas**		
	Cálcio	**Magnésio**	**Lipídeo (g por 100 g de ração)**	**Cálcio**	**Magnésio**	**Lipídeo**
GI	5 000	500	7,0	–1	–1	–1
GII	20 000	500	7,0	+1	–1	–1
GIII	5 000	2 000	7,0	–1	+1	–1
GIV	5 000	500	14,0	–1	–1	+1

GI: grupo-controle, que não recebeu nenhuma suplementação de cálcio ou magnésio.
GII: grupo que recebeu suplementação de cálcio.
GIII: grupo que recebeu suplementação de magnésio.
GIV: grupo que recebeu dieta suplementada com lipídeo, mas sem suplementação de minerais.

Ao grupo GI foi fornecida a ração de controle AIN-93G, contendo os níveis recomendados de cálcio e magnésio e a concentração de lipídeo adequada para manter as concentrações isocalóricas.

Na ração fornecida ao grupo GII, a concentração de cálcio foi elevada até quatro vezes o requerido, enquanto as demais concentrações se mantiveram como na ração de controle. Naquela fornecida ao grupo GIII, elevou-se a concentração de magnésio em quatro vezes o requerido, mantendo-se as demais concentrações como na ração de controle. Na ração do grupo GIV, dobrou-se a concentração de lipídeo, mantendo-se as demais concentrações.

Uma vez preparadas, as rações foram submetidas a análise química, como descrito na seção 4.3.1

Os resultados das variáveis dependentes (respostas) de cada grupo foram submetidos a análise de variância de uma via (*one-way ANOVA*), seguida de teste de Bonferroni.

4.3 RAÇÕES EXPERIMENTAIS

As dietas foram elaboradas de acordo com os procedimentos descritos pelo American Institute of Nutrition (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993), conforme Tabela 4.

Tabela 4. Composição das rações, conforme AIN-93G.

Componentes	%
Amido de milho	53,0
Proteína	20,0
Sacarose	10,0
Óleo de soja	7,0
Fibra (celulose)	5,0
Mistura vitamínica	1,0
Mistura salina (mineral)	3,5
L-cistina	0,30
Bitartarato de colina	0,20

Fonte: Reeves, Nielsen e Fahey (1993).

Para o experimento, foram manipulados quatro tipos de rações, que foram mantidas isocalóricas, alterando-se porém as concentrações de lipídeos (para o dobro do requerido, ou seja, para 14%), de cálcio (na forma de carbonato, $CaCo_3$, peso molar 100,09, Dinâmica) e de magnésio (na forma de óxido, MgO, peso molar 40,30, Dinâmica).

Os componentes de cada ração foram separados, pesados e misturados, acrescentando-se água até se formar uma massa homogênea e de consistência adequada para formar *pellets*. Após a peletização, as rações foram mantidas em estufa de ventilação a 45 °C, até que apresentassem umidade inferior a 7%. Ao fim de 18 h de estufa, a umidade foi medida

com aparelho específico munido de lâmpada infravermelha. O produto obtido foi embalado e identificado em sacos plásticos e armazenado.

4.3.1 DETERMINAÇÃO QUÍMICA

As composições químicas das rações e das amostras foram determinadas em triplicata, segundo método da Official Analytical Chemists (AOAC, 1996) e de acordo com as *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz* (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). Foram avaliados os seguintes parâmetros: umidade, minerais totais, lipídeos, carboidratos e proteínas.

4.3.1.1 Umidade

A umidade foi determinada pelo método gravimétrico, segundo normas do Instituto Adolfo Lutz (BRASIL, 2005).

A amostra foi pesada em cápsula de porcelana previamente tarada e em seguida aquecida em estufa a 105 °C por 3 h. Após resfriamento em dessecador até a temperatura ambiente, procedeu-se à pesagem, que foi repetida até obtenção de peso constante.

4.3.1.2 Minerais totais

Para determinação do resíduo mineral fixo (cinzas), foi utilizado o método gravimétrico, segundo normas do Instituto Adolfo Lutz (BRASIL, 2005).

Cada amostra foi pesada em cadinho de porcelana previamente tarado e aquecido em mufla. Por incineração em bico de Bunsen, a amostra foi totalmente carbonizada e então mantida em mufla a 550 °C até destruição de toda a matéria orgânica. O cadinho contendo as cinzas foi resfriado em dessecador até a temperatura ambiente e então pesado.

4.3.1.3 Lipídeos

Os lipídeos foram determinados pelo método de extração, segundo normas do Instituto Adolfo Lutz (BRASIL, 2005).

A amostra foi transferida para o cartucho para extração com éter de petróleo em aparelho de Soxhlet por 6 h. O resíduo obtido após evaporação do solvente foi mantido em estufa a 105 °C, resfriado em dessecador até a temperatura ambiente e pesado.

4.3.1.4 Proteínas

O teor de nitrogênio foi determinado pelo método micro-Kjeldahl. Para obtenção do teor proteico, aplicou-se o fator 6,25 para conversão de nitrogênio em proteína, conforme método proposto pela AOAC (1992).

4.3.1.5 Carboidratos

Os carboidratos foram avaliados com o método de Lane–Eynon, utilizando solução de Fehling, de acordo normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (BRASIL, 2005). Os resultados foram expressos como porcentagens de sacarose e de amido.

4.3.1.6 Minerais (cálcio e magnésio)

As concentrações dos dois minerais na ração oferecida a cada grupo foram determinadas por espectrofotometria. As amostras dos resíduos de cinza foram previamente diluídas em água desmineralizada e acondicionadas em balões de 25 mL para posterior leitura espectrofotométrica em sistema automatizado Cobas Integra 400 Plus (Roche).

4.3.1.7 Valor calórico total

O valor calórico total das amostras (VCT) foi calculado aplicando-se a Equação 1, utilizando-se fatores de conversão de 4 kcal/g para proteínas, 4 kcal/g para carboidratos e 9 kcal/g para lipídeos.

Equação 1:

VCT (kcal/100 g) = (% proteínas × 4) + (% carboidratos × 4) + (% lipídeos × 9)

4.4 EFICÁCIA ALIMENTAR

Para avaliar a capacidade de conversão de energia alimentar consumida em peso corporal, calculou-se a eficácia alimentar (EA), dividindo-se a variação ponderal total dos animais pela energia total ingerida (Equação 2) (SOUZA, 2003).

Equação 2:

$$EA = \frac{\text{variação de peso do animal (g)}}{\text{quantidade de ração ingerida pelo animal (g)}}$$

4.5 INGESTÃO CALÓRICA

A ingestão calórica (IC) em cada grupo foi determinada multiplicando-se o consumo semanal de ração pelo valor calórico de cada dieta, conforme a Equação 3 (SOUZA, 2003).

Equação 3:

IC = ingestão alimentar (g) × valor calórico (kcal)

4.6 ACOMPANHAMENTO DE PESO E CONSUMO DE RAÇÃO

As pesagens da ração consumida e de cada animal foram realizadas em balança semianalítica digital Shimadzu BL 3200H, com capacidade máxima de 3 200 g e sensibilidade de 0,5 g.

Os pesos corporais foram medidos no início do experimento e novamente ao final dos três dias de aclimatação. Para acompanhamento da evolução de peso de cada animal, todos foram numerados na cauda. Essa marcação foi reforçada a cada pesagem semanal.

Ao longo do experimento, o consumo de ração foi calculado a cada semana, por meio da diferença entre o peso da ração oferecida e o de suas sobras no interior das caixas.

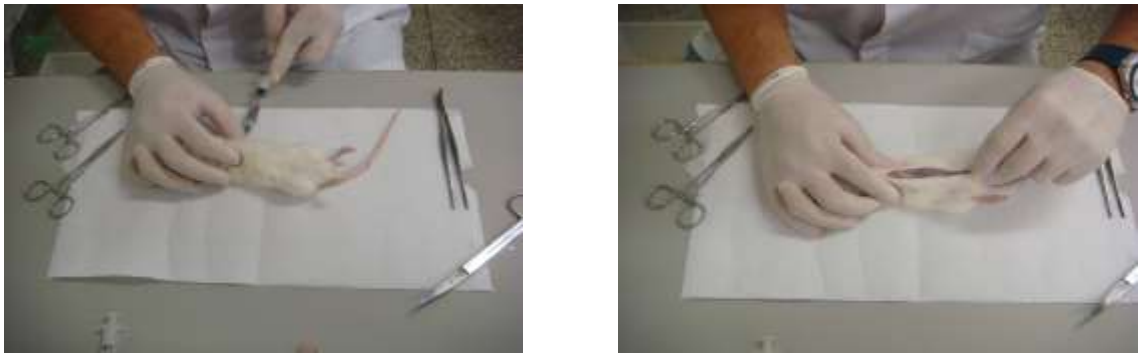
4.7 EXAMES BIOQUÍMICOS

Concluído o período experimental, procedeu-se à coleta de sangue após jejum de 12 h. Para tanto, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com solução de xilazina (Virbaxil 2%) e quetamina (Vetaset), na dosagem de 0,2 mL/kg de peso corporal. Verificada a ausência de reflexo ao pinçamento plantar, abriu-se o abdômen do animal por incisão na linha média, conforme Figura 3.

As amostras de sangue foram coletadas pela veia porta, acondicionadas em tubos Vacutainer heparinizados e encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas da UFMS para centrifugação e extração de soro, sendo em seguida armazenadas a –80 ºC até a análise.

As concentrações séricas de triglicérides e de lipoproteínas de alta densidade (HDL), baixa densidade (LDL) e muito baixa densidade (VLDL), foram determinadas utilizando-se *kits* específicos em sistema automatizado Cobas Integra 400 Plus (Roche).

Os níveis séricos de cálcio e magnésio foram determinados por espectrofotometria.

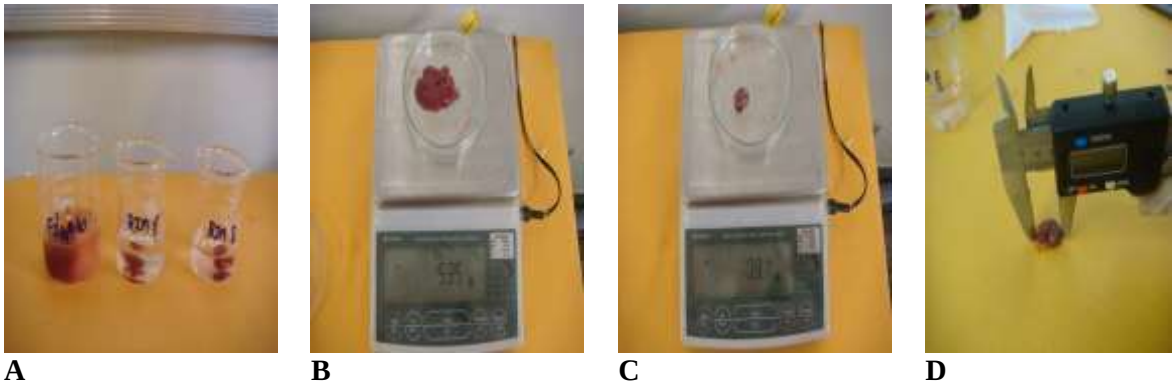


A **B**

Figura 3. Procedimentos para a coleta de sangue.
(A) punção cardíaca; (B) incisão na linha média abdominal.
Fotos: A autora.

4.8 ANÁLISE MORFOLÓGICA

Ao fim dos 35 dias do experimento, o fígado e os rins foram retirados, lavados em solução fisiológica e pesados em balança semianalítica Shimadzu BL 3200H. Seus tamanhos foram medidos com paquímetro Digital Caliper, com precisão de 150 mm, conforme Figura 4. Para conservação, foram mantidos por 24 horas em formol 10% e então transferidos para solução de álcool 70% para posterior processamento.



A **B** **C** **D**

Figura 4. Procedimentos de análise histológica de órgãos.
(A) imersão em solução fisiológica; (B) pesagem do fígado; (C) pesagem do rim; (D) mensuração com paquímetro digital.
Fotos: A autora.

Os órgãos foram preparados de modo a preservar ao máximo sua estrutura original, utilizando técnicas histológicas de fixação, desidratação, inclusão, microtomia e coloração.

A fixação, mostrada na Figura 5, paralisa o metabolismo celular e enrijece as estruturas teciduais, preservando-as para tratamentos posteriores. O processo impede a autólise celular e a proliferação de microrganismos.

Para a inclusão, os tecidos foram criteriosamente preparados para receber parafina histológica Histosec em pastilhas (Merck). Os blocos de incrustação foram submetidos a microtomia e as seções assim obtidas foram montadas em lâminas de vidro e coradas com hematoxilina e eosina.

As lâminas foram observadas em microscopia óptica com objetiva 20×.

A **B** **C**

Figura 5. Processamento das estruturas teciduais.
(A) bancada de preparo, com peças anatômicas separadas em grupos e etiquetadas; (B) fígado armazenado em formol, pronto para corte e inclusão em parafina; (C) rim armazenado em formol, pronto para corte e inclusão em parafina.
Fotos: A autora.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como médias ± desvios-padrão da média e submetidos a ANOVA de uma via, seguida de teste de Bonferroni. Os resultados foram discutidos considerando-se um nível de significância estatística $p < 0,05$. O *software* utilizado foi Sigma Stat (BAYLEY, 1977).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E CALÓRICA DAS DIETAS ADMINISTRADAS

As composições químicas das dietas utilizadas estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Composição química das rações utilizadas no experimento, por grupo de animais.

Componentes (g/100 g)	**GI**	**GII**	**GIII**	**GIV**
Umidade	4,42 ± 0,03	3,66 ± 0,01	5,39 ± 0,06	3,47 ± 0,15
Cinzas	2,58 ± 0,07	4,62 ± 0,01	2,76 ± 0,02	2,88 ± 0,03
Proteína	19,74 ± 0,65	18,97 ± 0,27	18,93 ± 0,69	22,62 ± 0,31
Lipídeo	7,48 ± 0,01	7,52 ± 0,05	7,33 ± 0,10	14,57 ± 0,40
Carboidrato				
Amido	43,24 ± 0,84	39,16 ± 0,60	37,73 ± 1,43	30,24 ± 0,86
Sacarose	9,40 ± 0,08	7,76 ± 0,24	9,59 ± 0,37	9,76 ± 0,45
Valor calórico total (kcal/100 g)	**356,84**	**331,24**	**330,97**	**381,61**

Valores expressos como médias e desvios-padrão.

GI: grupo-controle, que não recebeu nenhuma suplementação de cálcio ou magnésio.

GII: grupo que recebeu suplementação de cálcio.

GIII: grupo que recebeu suplementação de magnésio.

GIV: grupo que recebeu dieta suplementada com lipídeo, mas sem suplementação de minerais.

Os valores obtidos confirmam que as rações se assemelharam em termos de umidade, cinzas, proteína, lipídeo e carboidrato (amido e sacarose). As concentrações calóricas também se assemelharam. No grupo GIV, que foi suplementado com o dobro de lipídeo, diminuiu-se da concentração de carboidrato a fim de que a ração se mantivesse isocalórica em relação às demais dietas.

As concentrações de cálcio e magnésio nas rações, determinadas por espectrofotometria, encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6. Concentrações dos minerais nas rações utilizadas no experimento.

Grupos	Cálcio (mg/1 000 g)	Magnésio (mg/1 000 g)
GI	5 383,07 ± 83,37	496,90 ± 3,23
GII	**18 739,36 ± 1225,26**	594,95 ± 7,31
GIII	5 503,23 ± 52,00	**1 796,90 ± 52,90**
GIV	6 790,75 ± 100,92	570,35 ± 53,81

Valores expressos como médias e desvios-padrão.
GI: grupo-controle, que não recebeu nenhuma suplementação de cálcio ou magnésio.
GII: grupo que recebeu suplementação de cálcio.
GIII: grupo que recebeu suplementação de magnésio.
GIV: grupo que recebeu dieta suplementada com lipídeo, mas sem suplementação de minerais.

Os resultados confirmam que na ração de controle (GI) as concentrações de cálcio e magnésio mantiveram-se muito próximas à de referência (AIN-93G), e que nas rações suplementadas dos grupos GII e GIII os teores de cálcio e de magnésio, respectivamente, alcançaram cerca de quatro vezes os da ração de referência, atendendo desta forma à suplementação pretendida no delineamento experimental.

De acordo com Cozzolino (2007), estudos epidemiológicos indicam que, mundialmente, a ingestão de minerais é muito variável, diferindo conforme o país, a etnia e a renda familiar. Na população brasileira, a ingestão de cálcio varia de 300 a 500 mg/dia; a de magnésio, de 122 a 313 mg/dia. Tais níveis estão muito abaixo dos recomendados pelas DRIs (*dietary reference intakes*, referências para consumo diário).

Sichieri e Souza (2008) apontam que o papel exercido pelos micronutrientes, particularmente os minerais, tem sido objeto de pesquisas voltadas ao controle do peso corporal. No caso do cálcio, ensaios clínicos e experimentais mostram que o mecanismo mais provável de sua atuação nesse aspecto envolve sua maior disponibilidade intracelular, a qual promove aumento da lipogênese e inibição da lipólise (COZZOLINO, 2007; SANTOS, 2008).

Além do consumo frequentemente inadequado pela população, substâncias presentes na dieta podem alterar a absorção dos minerais, limitando sua biodisponibilidade. Altos níveis de suplementação permitem melhor avaliar a interação entre os nutrientes e a possível relação com o peso corporal.

5.2 INGESTÃO ALIMENTAR E CALÓRICA TOTAL

A Tabela 7 expõe os valores de ingestão alimentar nos grupos de estudo.

Tabela 7. Ingestão alimentar (g) em ratos Wistar, por grupo de estudo e momento de avaliação.

Grupo	Momento de avaliação (semanas do experimento)				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**
GI	$28 \pm 0,0^{aA}$	$63 \pm 3,4^{bA}$	$88 \pm 0,76^{cA}$	$104 \pm 0,85^{dA}$	$175 \pm 0,53^{eA}$
GII	$19 \pm 0,0^{aA}$	58 ± 10^{bA}	$65 \pm 4,1^{cB}$	$78 \pm 7,5^{cB}$	$128 \pm 0,42^{dB}$
GIII	$22 \pm 0,0^{aA}$	$50 \pm 2,3^{bA}$	$73 \pm 4,6^{cA}$	$91 \pm 1,2d^{cA}$	$160 \pm 2,1^{eA}$
GIV	$24 \pm 0,0^{aA}$	57 ± 16^{bA}	79 ± 13^{cA}	$98 \pm 9,8^{dA}$	156 ± 46^{eA}

Valores expressos como médias e desvios-padrão.

GI: grupo-controle, que não recebeu nenhuma suplementação de cálcio ou magnésio.

GII: grupo que recebeu suplementação de cálcio.

GIII: grupo que recebeu suplementação de magnésio.

GIV: grupo que recebeu dieta suplementada com 14% de lipídeo, mas sem suplementação de minerais.

A, B: resultados das comparações entre grupos; *a, b, c, d, e*: resultados de comparações entre momentos do experimento. Letras distintas na mesma linha ou coluna indicam diferenças estatisticamente significantes (ANOVA, modelo de medidas repetidas, complementada com teste de Bonferroni; $p < 0,05$).

Analisando-se a ingestão alimentar por grupo de estudo e momento de avaliação, observou-se similaridade em todos os grupos na primeira semana. Tal comportamento pode ser explicado pelo fato de que esse período inicial corresponde ao de aclimatação, geralmente de três a cinco dias, durante o qual os animais se adaptam às novas dietas (SGARBIERI, 1987).

Da primeira para a segunda semana do experimento, houve aumento semelhante na ingesta alimentar em todos os grupos.

Segundo De Luca *et al*. (1996), a referência para o consumo médio de ração situa-se na faixa de 12 a 15 g/dia para animais recém-desmamados. No presente estudo, o consumo em todos os grupos foi superior à média, e não só no grupo GIV, no qual se esperava que a dieta suplementada com lipídeo acarretasse maior consumo, em razão da melhor palatabilidade.

No grupo-controle (GI), a ingestão aumentou durante todas as semanas do experimento, inclusive em relação aos demais grupos.

No grupo GII, a ingestão também aumentou no decorrer das semanas do experimento, mas da terceira para a quarta semana o consumo diminuiu em relação aos demais grupos, comportamento que se manteve até o final do experimento.

Também nos grupos GIII e GIV a ingesta se assemelhou à do grupo GI, com aumento ao longo das semanas e também na comparação entre os grupos.

Os dados da ingestão calórica total ao final das cinco semanas do experimento estão apresentados na Figura 6.

Figura 6. Ingestão calórica total por indivíduo, por grupo de estudo.
GI: grupo-controle, que não recebeu nenhuma suplementação de cálcio ou magnésio.
GII: grupo que recebeu suplementação de cálcio.
GIII: grupo que recebeu suplementação de magnésio.
GIV: grupo que recebeu dieta suplementada com 14% de lipídeo, mas sem suplementação de minerais.

5.3 EFICIÊNCIA ALIMENTAR

A Figura 7 sumariza os resultados da eficiência alimentar (conversão da ingesta de ração em ganho de massa corporal), revelando que o menor índice foi obtido no grupo GII.

Nos grupos GI, GIII e GIV, os valores de eficiência alimentar foram semelhantes, o que pode ser explicado pela metodologia utilizada, que manteve as concentrações isocalóricas, de modo a minimizar as diferenças introduzidas com a suplementação de lipídeo e de minerais.

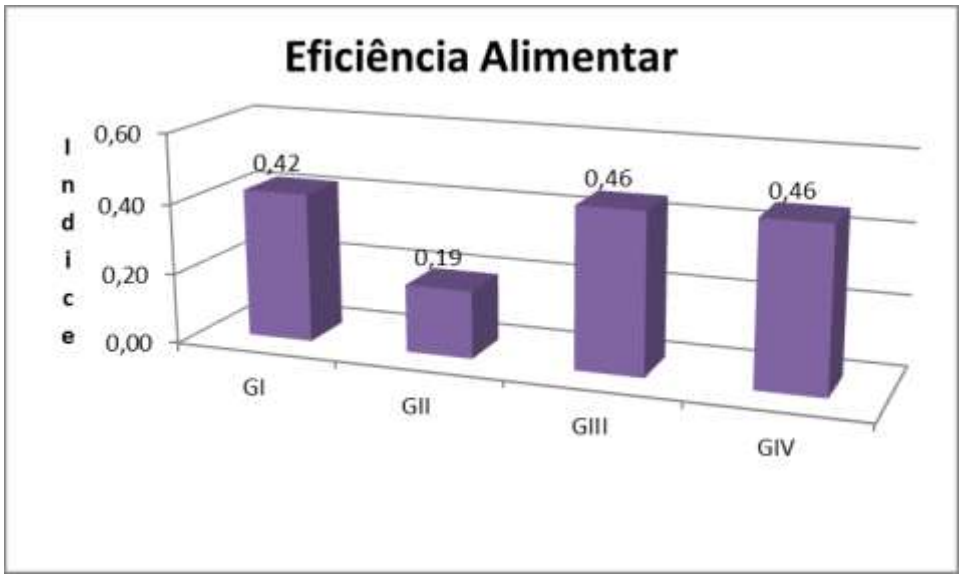


Figura 7. Índices de eficiência alimentar observados nos grupos de estudo.

GI: grupo-controle, que não recebeu nenhuma suplementação de cálcio ou magnésio.

GII: grupo que recebeu suplementação de cálcio.

GIII: grupo que recebeu suplementação de magnésio.

GIV: grupo que recebeu dieta suplementada com 14% de lipídeo, mas sem suplementação de minerais.

5.3.1 COMPORTAMENTO PONDERAL

Os dados referentes ao peso e à evolução corporal dos animais são apresentados na Tabela 8 e na Figura 8.

Tabela 8. Ganho de massa corporal (g), por grupo e momento de avaliação.

Grupo	Peso inicial	Peso final	Ganho de peso
GI	33,1 ± 4,0 ^{aA}	227 ± 8,2 ^{bA}	193,9
GII	33,3 ± 4,2 ^{aA}	100 ± 20 ^{bB}	66,7
GIII	32,5 ± 5,6 ^{aA}	213 ± 17 ^{bA}	180,5
GIV	32,9 ± 7,5 ^{aA}	224 ± 29 ^{bA}	191,1

Valores expressos como médias e desvios-padrão.

GI: grupo-controle, que não recebeu nenhuma suplementação de cálcio ou magnésio.

GII: grupo que recebeu suplementação de cálcio.

GIII: grupo que recebeu suplementação de magnésio.

GIV: grupo que recebeu dieta suplementada com 14% de lipídeo, mas sem suplementação de minerais.

A, B: resultados das comparações entre grupos; *a, b*: resultados de comparações do peso entre momentos do experimento (inicial e final). Letras distintas na mesma linha ou coluna indicam diferenças estatisticamente significantes.

* $p < 0,05$ *vs.* controle. ANOVA de uma via complementada com teste de Bonferroni.

Os pesos corporais dos animais no início do experimento foram semelhantes nos diferentes grupos, sem diferenças significativas. Ao final das cinco semanas, porém, os animais do grupo GII foram os únicos a apresentar ganho de peso menor que os demais. Isso se assemelha ao observado por Pérez-Gallardo *et al*. (2008) em um experimento com camundongos machos alimentados por seis semanas com duas dietas enriquecidas com cálcio, suplementadas com 4 g/kg de ração (na forma de carbonato de cálcio) e 12 g/kg (sendo 42% na forma de leite em pó e 58% como carbonato de cálcio). Esta última também continha maiores teores de magnésio e zinco (pela adição de leite em pó). Nesse experimento, os animais que ingeriram a ração com alto teor de cálcio (12 g/kg) tiveram menor ganho de peso corporal.

Zhang e Tordoff (2004) administraram a ratos dietas com diferentes concentrações de cálcio (0,2%, 0,6% e 1,8%) e densidades calóricas (3,8 e 4,7 kcal/g), constatando que a dieta com 1,8% de cálcio na forma de carbonato foi a que melhor controlou o ganho de peso corporal.

Zemel *et al*. (2000), em estudo observacional realizado com 7 494 indivíduos (380 mulheres e 7 494 homens) participantes da pesquisa NHANES III, constataram redução progressiva no risco de peso corporal elevado a cada quartil de ingestão de cálcio, com valores de 255 ± 20 mg/dia para o quartil 1, de 484 ± 13 mg/dia para o quartil 2, de 773 ± 28

mg/dia para o quartil 3 e de 1346 ± 13 mg/dia para o quartil 4, sendo o maior quartil de cálcio equivalente às recomendações para esse mineral.

A Figura 8 apresenta a evolução do peso corporal dos animais no decorrer do presente experimento.

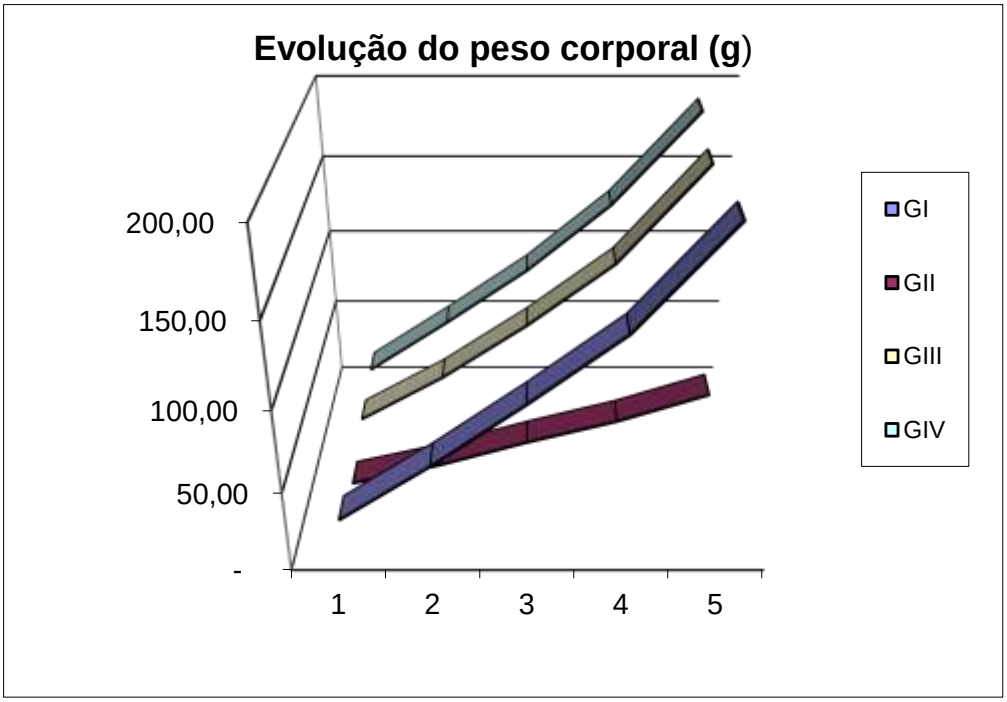


Figura 8. Evolução do peso corporal dos animais (g) ao longo das cinco semanas, por grupo.

Desde a década de 1980 vários estudos experimentais foram realizados na tentativa de identificar a correlação entre a alta ingestão de cálcio e o controle do ganho de peso corporal. Zemel *et al*. (2000), utilizando quatro concentrações de cálcio em dietas administradas a ratos transgênicos por seis semanas (com baixo nível de cálcio, de 0,4%, como dieta basal de referência; com aumento de 1,2% de cálcio, na forma de $CaCO_3$; com acréscimo de cálcio de 1,2% na forma de laticínio; com acréscimo de 50% na forma de leite em pó, correspondendo a acréscimo de 2,4% de cálcio), constataram diminuição de peso nos animais que receberam suplementação de 2,4% de cálcio.

Davies *et al*. (2000), com base em análise retrospectiva com seres humanos, sugerem que a ingestão de cálcio poderia explicar até 3% da variabilidade de peso corporal em adultos.

Em estudo de Soares *et al.* (2004) realizado em população australiana, verificou-se a contribuição da ingestão de cálcio tanto para o IMC quanto para a circunferência da cintura, em homens e mulheres. Os resultados mostraram que a ingestão dos minerais apresentava relação inversa com a adiposidade.

No Brasil, estudos realizados por Santos *et al.* (2005, 2007) identificaram associação inversa entre a ingestão de cálcio e a massa corporal, em estudo caso-controle realizado com 96 adolescentes pós-púberes, sendo 47 eutróficos e 49 obesos. Constatou-se que a ingestão de cálcio foi significativamente menor nos indivíduos com excesso de peso.

Em outro estudo (SANTOS *et al.*, 2008), as análises de quartis de ingestão de cálcio revelaram que meninas do maior quartil de ingestão desse mineral apresentavam menor adiposidade.

5.4 PERFIL BIOQUÍMICO

De acordo com Spinelli *et al.* (2011), animais de laboratório criados em diferentes biotérios acabam por apresentar variações em seus parâmetros bioquímicos em razão de diferenças na dieta, no manejo, no estado sanitário, na idade e nas vias de coleta de sangue, entre outras variáveis.

A Tabela 9 expõe os resultados das determinações bioquímicas séricas de colesterol total (CT), lipoproteínas de alta densidade (HDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), triglicérides (TG), cálcio (Ca) e magnésio (Mg).

Tabela 9. Médias e desvios-padrão dos perfis bioquímicos, por grupo de estudo.

Parâmetros (mg/dL)	**GI**	**GII**	**GIII**	**GIV**	**Valor *p***
CT	69 ± 14	62 ± 24	69 ± 19	65 ± 15	0,908
HDL	52 ± 9,5	44 ± 15,5	51 ± 11	47 ± 11	0,601
LDL	9,2 ± 5,0	5,3 ± 5,1	17,5 ± 17	10 ± 5,1	0,189
VLDL	6,9 ± 1,7	12,7 ± 5,9*	9,0 ± 2,0	7,4 ± 1,1	0,027
TG	35 ± 8,8	63 ± 29,5*	45 ± 10	37 ± 5,5	0,027
Ca	11 ± 0,66	14 ± 1,3*	10,7 ± 0,55	10,0 ± 0,6	<0,001
Mg	2,7 ± 0,30	1,7 ± 0,26*	3,5 ± 0,21*	2,9 ± 0,08	<0,001

Valores expressos como média e desvio-padrão.

GI: grupo-controle, que não recebeu nenhuma suplementação de cálcio ou magnésio.

GII: grupo que recebeu suplementação de cálcio.

GIII: grupo que recebeu suplementação de magnésio.

GIV: grupo que recebeu dieta suplementada com 14% de lipídeo, mas sem suplementação de minerais.

CT: colesterol total; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; TG: triglicérides; Ca: cálcio; Mg: magnésio

* *vs*. controle. ANOVA de uma via complementada pelo teste de Bonferroni.

Comparando-se os valores do grupo-controle (GI) com os obtidos por Guimarães e Mazaro (2004) para identificação de parâmetros de referência, podem-se observar semelhanças nos níveis séricos de CT (62,8 ± 13 mg/dL), porém diferenças no perfil lipídico para os níveis séricos de HDL (16 ± 4,9 mg/dL), LDL (15,3 ± 8,3 mg/dL), VLDL (19,9 ± 5,1 mg/dL) e TG (83,7 ± 11 mg/dL). Já em relação aos valores obtidos pelo Centro de Bioterismo da FMUSP (2008), também com o objetivo de obter parâmetros de referência, também se constataram diferenças para CT (98,9 ± 110,2 mg/dL), HDL (11,4 ± 20,4 mg/dL), LDL (76,3 ± 88,5 mg/dL) e VLDL (15,2 ± 26,5 mg/dL). Tais diferenças podem ser atribuídas às diferentes padronizações nas dietas adotadas nesses estudos e as condições de manejo dos animais.

Os resultados mostrados na Tabela 9 revelam que a dieta suplementada com cálcio, administrada aos animais do grupo GII, elevou os níveis de VLDL, TG e cálcio sérico em relação aos dos controles. Em contrapartida, o nível de magnésio no grupo GII foi menor que no de controle, fenômeno este que pode ser explicado pelo antagonismo competitivo desses minerais pelos sítios de absorção.

Os resultados evidenciam hipercalcemia no grupo GII, acompanhada de hipomagnesemia, com níveis de magnésio próximos a 1,5 mg/dL, baixos segundo Silva e Seguro (2002).

Rude *et al*. (2003), em ensaio experimental com dietas que induziram depleção de magnésio (0,002%), mantendo os demais níveis dos nutrientes na ração nos valores requeridos, observaram a ocorrência de hipercalcemia.

A hipertrigliceridemia e as mudanças metabólicas observadas no grupo GII poderiam, segundo Rayssiguier *et al.* (2010), ser explicadas pela deficiência marginal de magnésio, que induziria uma síndrome inflamatória clínica. A deficiência de magnésio há muito vem sendo associada a concentrações aumentadas de fosfolipídeo sérico/plasmático e de triglicerídeos, bem como a concentrações variadas de colesterol total (CUNNANE *apud* SHILS *et al.*, 2003; GEUEX *apud* SHILS *et al.*, 2003).

A depleção clínica de magnésio pode ser induzida por distúrbios metabólicos que levam à excreção renal desse mineral. A hipercalcemia seria um desses distúrbios (SHILS *et al.*, 2003).

No grupo GIII constatou-se alta concentração de magnésio, como esperado, porém com baixos níveis de cálcio, caracterizando hipermagnesemia acompanhada de hipocalcemia.

De acordo com Carreiro (2011), a relação entre cálcio e magnésio sérico pode ser entendida pelo sinergismo entre esses minerais. No comportamento alimentar atual, pode-se apontar uma razão de cálcio para magnésio de 4:1, devido ao aumento do consumo dos produtos lácteos e industrializados, em detrimentos de alimentos mais naturais, que são ricas fontes de magnésio, e por ser o cálcio mais conhecido que o magnésio, sendo sua suplementação amplamente divulgada para minimizar ou prevenir os efeitos da osteoporose. No entanto, a suplementação exclusiva com cálcio pode ser mais prejudicial que benéfica, visto que altos níveis desse mineral acarretam baixos níveis de magnésio, também um importante mineral.

Embora alguns suplementos para o tratamento da osteoporose tragam esses minerais associados, normalmente o fazem na razão 2:1 de cálcio para magnésio. No entanto, para compensar os desequilíbrios causados pela alimentação atual, essa razão deveria ser de 2:1 de magnésio para cálcio (CARREIRO, 2011).

5.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA

A análise histológica consiste no estudo de tecidos animais ou vegetais no contexto da estrutura tecidual e sua interrelação com os constituintes da matriz tecidual (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Os achados histopatológicos em pesquisas no campo da nutrição justificam-se pelo auxilio que a histopatologia oferece para entender ou propor hipóteses de efeitos e/ou mecanismos pelos quais as intervenções dietéticas atuam sobre os órgãos e suas funções.

As seções representativas de cortes histológicos teciduais de fígado e rim dos animais são mostradas nas Figuras 9 e 10.

5.5.1 FÍGADO

A maioria das lesões hepáticas produzidas por drogas e/ou traumatismo são cálcio-dependentes, promovendo formação de metabólitos e radicais livres que podem ser reativos e tóxicos para as células.

Dentre as enzimas que são ativadas pelo cálcio, podemos citar as fosfolipases, as proteases e as ATPases, envolvidas no transporte trasmembrânico, na síntese de proteínas e na lipogênese. Desse processo decorrem alterações em diversas enzimas, proteínas e lipídeos, dentre os quais podemos citar colesterol total, colesterol HDL, LDL e VLDL e os triglicerídeos (NICOTERA; BELLOMO; ORRENIUS, 1990; GINCEL; ZAID; SHOSHAN, 2001).

Puderam-se observar algumas alterações nos grupos de estudo que receberam suplementação de cálcio, magnésio e lipídeos.

As seções obtidas do grupo-controle (grupo GI) mostraram hepatócitos com estruturas morfológicas normais e preservação das arquiteturas hepáticas, sem obstrução ou congestão vascular, com cromatina normal e sem aumento das células de Kupfer.

As imagens dos grupos que receberam suplementação mostram hepatócitos com núcleos aumentados e mais volumosos, com diversidade de tamanhos e apresentando vacúolos característicos da degeneração hidrópica e consequente balonização celular (Figura 9D). Além disso, ao compararmos o tecido hepático de animais que receberam dieta

suplementada com cálcio e magnésio, observamos alterações relevantes no grupo suplementado com magnésio, mostrando um quadro de esteatose com macro e microgotículas de gordura, conforme Figuras 9B e 9C, sendo que na Figura 9D a parede do vaso mostra-se também espessada.

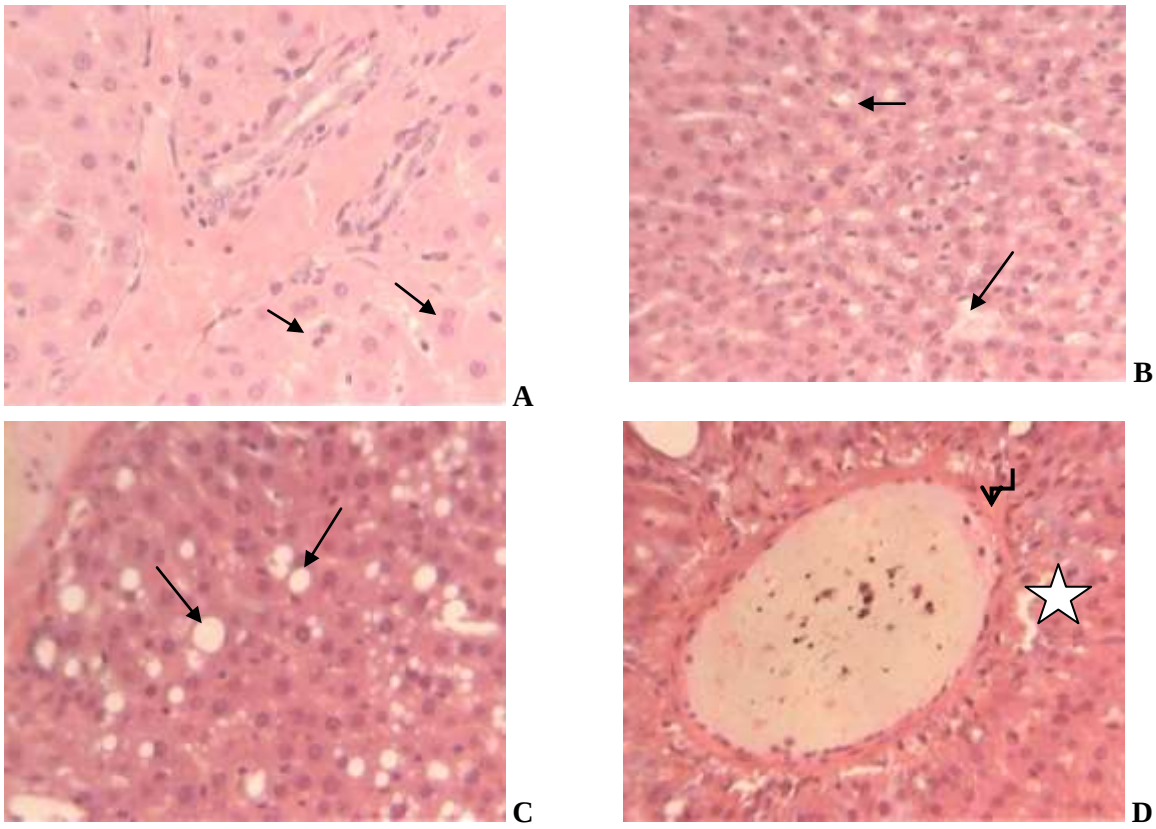


Figura 9. Seção hepática de ratos Wistar.
(A) GI (dieta-padrão AIN-93G), com vasos sanguíneos e ducto biliar preservados e sem congestão, e algumas células com dois núcleos (setas); (B) GII (suplementação de cálcio), degeneração hidrópica (setas); (C) GIII (suplementação de magnésio), com degeneração hidrópica (setas); (D) GIV (suplementação de 14% de lipídeo), com a parede da veia central dilatada e necrose do hepatócito. Hematoxilina-eosina; 20×.

De acordo com Jubb, Kennedy e Palmer (2007), graus discretos de esteatose hepática são achados comuns em fígados de roedores de laboratório mantidos em confinamento, podendo decorrer do estresse a que os animais são submetidos.

5.5.2 RIM

Os rins são orgãos complexos, essencialmente reguladores, que exercem uma gama de funções primordiais para a homeostase orgânica. Alguns compostos químicos e determinadas complicações patológicas são responsáveis por danificar as estruturas e diminuir a atividade funcional dos rins (BRENNER; BRADY; LIEBERTHAL, 1998; BELLOMO *et al*., 2004).

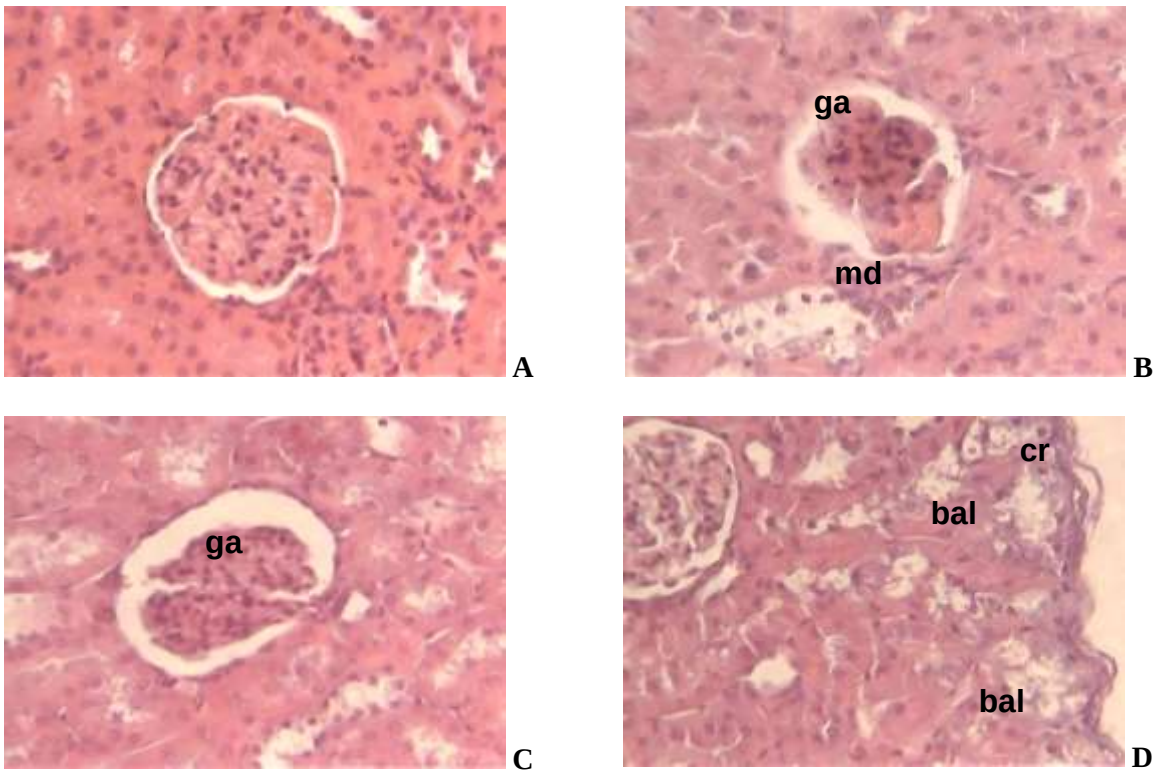


Figura 10. Seção renal de ratos Wistar.
(A) Grupo I: tratado com dieta padrão AIN-93G, com glomérulos preservados; (B) Grupo II: tratado com suplementação de cálcio, com glomérulos atrofiados (ga), mácula densa evidente caracterizando degeneração hidrópica com balonização; (C) Grupo III: tratado com suplementação de magnésio com glomérulos atrofiados (ga); D: Grupo IV, tratado com suplementação de 14% de lipídeo, com presença de balonização (bal) e desorganização da cápsula renal (cr). Hematoxilina-eosina; 20×.

A análise histológica dos rins do grupo-controle (GI) revelou parâmetros de normalidade, com glomérulos preservados, ausência de congestão vascular e organização da cápsula renal, diferentemente do que pôde ser observado nos demais grupos, como evidenciam as imagens, que revelam vacuolização. Tal vacuolização estaria diretamente relcionada à degeneração hidrópica provocada por transtornos no equilíbrio hidroeletrolitico,

que resultaria em retenção de água nas células, levando a disfunção renal e degeneração hidrópica (BOGLIOLO, 1998).

A vacuolização ou degeneração dos hepatócitos (esteatose hepática) ocorre sempre que um agente interfere no metabolismo dos ácidos graxos da célula, aumentando a síntese destes ou dificultando sua utilização, transporte ou excreção (BRASILEIRO FILHO, 2004).

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitiram extrair as seguintes conclusões:

- A suplementação de cálcio reduziu a eficiência da conversão alimentar no grupo-controle (GI).
- Os níveis séricos de VLDL, TG e Ca tiveram seus valores aumentados no grupo suplementado com cálcio (GII).
- No grupo suplementado cálcio (GII) ocorreu hipercalcemia seguida de hipomagnesemia.
- A análise histológica de fígado e rim evidenciou alterações teciduais significativas entre nos grupos suplementados com cálcio (GII), magnésio (GIII) e lipídeo (GIV), tendo como resultado mais marcante a degeneração hidrópica.
- A suplementação com cálcio, realizada no nível adotado (GII), possivelmente controlou o ganho de peso.
- A suplementação com magnésio, realizada no nível adotado (GIII), não controlou o ganho de peso.
- O grupo suplementado com lipídeo (GIV) não apresentou consumo maior que os demais grupos e, em consequência, manteve peso corporal semelhante aos dos grupos GI e GIII.

REFERÊNCIAS

AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry*. 16. ed. Washington: Arlington, 1996. 2 v.

BARRETO, M.L.; CARMO, E.H. Mudanças em padrões de morbimortalidade: conceitos e métodos. In: MONTEIRO, C.A. (Org.). *Velhos e novos males na saúde do Brasil*. 2. ed. São Paulo, 2000.

BATISTA FILHO, M.; RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 19, supl. 1, p. 181-191, 2003.

BATISTA FILHO, M.; ASSIS, A.M.; KAC, G. Transição nutricional: conceito e características. In: KAC, G.; SICHIERI, R.; GIGANTE, D.P.. (Orgs.). *Epidemiologia nutricional*. Rio de Janeiro: Fiocruz; Atheneu, 2007. p. 445-460.

BAYLEY, B.J.R. Tables of the Bonferroni *t* statistic. *J. Am. Stat. Assoc*., v. 72, p. 469-478, 1977.

BELLOMO, R.; RONCO, C.; KELLUM, J.A.; MEHTA, R.L.; PALEVSKY, P. Acute renal failure definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second Internacional Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Critical Care*, v. 8, n. 4, R204-212, 2004.

BOGLIOLO, G.B.F. *Patologia geral*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

BORGES, V.C.; FERRINI, M.T.; WAITZBERG, D.L.; OLIVEIRA, G.P.C.; BOLTONI A. Minerais. In: *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica*. São Paulo: Atheneu, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição (INAN). *Pesquisa nacional sobre saúde e nutrição*: perfil de crescimento da população brasileira de 0 a 25 anos. Brasília: Ministério da Saúde, 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição (INAN). *Pesquisa nacional sobre saúde e nutrição*: condições nutricionais da população brasileira: adultos e idosos. Brasília: Ministério da Saúde, 1991.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-Fiocruz. *Curso de manipulação de animais de laboratório.* Salvador: Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação Geral da Política de Alimentação e Nutrição. *Guia alimentar para a população brasileira*: promovendo a alimentação saudavel. Brasilia: Ministério da Saúde, 2006.

BRASILEIRO FILHO, G. *Bogliolo*: patologia geral. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

BRENNER, M.A.; BRADY, H.R.; LIEBERTHAL, W. Acute renal failure: pathogenesis of renal disease. *The kidney*, v. 28, 1998.

CARREIRO, D.M. *Cálcio, na forma, na medida e no lugar certo*. São Paulo, 2011.

CASHMAN, K.D.; FLYNN, A. Optimal nutrition: calcium, magnesium and phosphorus. *Proceedings Nutr. Soc.*, v. 58, n. 2, 1999.

CENTRO DE BIOTERISMO DA FMUSP. *Parâmetros bioquímicos de ratos do Centro de Bioterismo da FMUSP*. 2008. Disponível em:

<http://www.biot.fm.usp.br/index.php?mpg=03.00.00&tip=RATO&id_ani=17&parametros=sim>. Acesso em: 12 abr. 2014.

COBEA – COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. *Princípios éticos na experimentação animal*. 1991. Disponível em: <http://www2.fcfar.unesp.br/Home/ComitedeEtica/principios%20eticos%20na%20experimentacao%20animal%20cobea.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2014

COUZI, F.; KEEN, C.; GERSHWIN, M.E.; MARESCHI, J.P. Nutritional implications of the interactions between minerals. *Progress in Food and Nutrition Science*, v. 17, 1993.

COZZOLINO, S.M.F. *Biodisponibilidade de nutrientes.* 2. ed. Barueri: Manole, 2007.

DAVIES, K.M.; HEANEY, R.P.; RECKER, R.R.; LAPPE, J.M.; BARGER-LUX, M.J.; RAFFERY, K.; HINDERS, S. Calcium intake and body weight. *J. Clin. Endocrinol. Metab*., v. 85, n. 12, p. 4635-4638, 2000.

DE LUCA, R.R.; ALEXANDRE, S.R.; MARQUES, T.; SOUZA, N.L.; MERUSSE, J.L.B.; NEVES, S.P. *Manual para técnicos em bioterismo.* São Paulo: Winner Graph, 1996.

EMKEY, R.D.; EMKEY, G.R. Calcium metabolism and correcting calcium deficiencies. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.*, 2012

FLASO – FEDERAÇÃO LATINO-AMERICANA DE SOCIEDADES DE OBESIDADE. Consenso latino-americano de obesidade. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* [online], v. 43, n. 1, 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0004-27301999000100006&script=sci_arttext>. Acesso em: 24 mar. 2014.

FOOD AND NUTRITION BOARD. *Dietary reference intakes*: recommended levels for individual intake. Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Washington, DC: National Academy of Sciences, 1998.

GINCEL, D.; ZAID, H.; SHOSHAN, V.B. Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion Chanel: a possible regulation in mitochondrial function. *Biochem. J.* V. 358. 2001.

GROPPER, S.S.; SMITH, J.L.; GROFF, J.L. *Nutrição avançada e metabolismo humano.* 5. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2011.

GUIMARÃES, M.A.; MAZARO, R. *Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação*. São Paulo: Unifesp, 2004.

HEANEY, R.P.; DOWELL, M.S.; RAFERTY, K.; BIERMAN, J. Bioavailability of the calcium in fortified soy imitation milk, with some observations on method. *Am. J. Clin. Nutr*., v. 71, n. 5, p. 1166-1169, 2000.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Estudo nacional de despesa familiar (ENDEF)*. Rio de Janeiro, 1976.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Pesquisa sobre Padrões de Vida 1996-1997*. Brasília: IBGE, 1997.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Pesquisa de orçamentos familiares (POF) 2002-2003*: primeiros resultados. Rio de Janeiro: IBGE, 2004.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Pesquisa de orçamentos familiares (POF) 2008-2009*: análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2011.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.* 3. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985.

JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. *Pathology of domestic animals*. 3. ed., 2007. v. 2.

JUNQUEIRA, L.C.V.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*, 12. ed. Guanabara Koogan, 2013.

KAC, G.; VELASQUEZ-MELÉNDEZ, J.G. A transição nutricional e a epidemiologia da obesidade na América Latina. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 19, supl. 1: S4-S5, 2003.

KAIDAR-PERSON, O.; PERSON, B.; SZOMSTEIN, S.; ROSENTHAL, R.J. Nutritional deficiencies in morbidly obese patients: a new form of malnutrition? Part B: minerals. *Obes Surg.*, v. 18, n. 8, p. 1028-1034, 2008.

KALUZA, J.; ORSINI, N.; LEVITAM, E. B.; BRZOZOWSKS, A.; ROSZKOWSKI, W.; WOLK, A. dietary calcium and magnesium intake and mortality: a prospective study of men. *American Journal of Epidemiology*, 2009.

MAHAN, L.K.; ESCOTT-STUMP, S. *Alimentos, nutrição e dietoterapia*. 11. ed. São Paulo: Roca: 2005.

MALTHUS, T.R. *An essay on the principle of population*. Oxford: OUP, 1999.

MCKEOWN, N.M.; JACQUES, P.F,; ZHANG, X.L.; JUAN, W.; SAHYOUN, N.R. Dietary magnesium intake is related to metabolic syndrome in older americans. *Eur. J. Notr*., 2008.

METZ, J.A.; KARANJA, N.; TOROK, J.; MCCARRON, D.A. Modification of total body fat in spontaneouusly hypertensive rats and Wistar-Kyoto rats by dietary calcuim and sodium. *Am. J. Hypertens.*, v. 1, n. 1, p. 58-60, 1988.

MONTEIRO, C.A.; MONDINI, L.; SOUZA, A.L.M.; POPKIN, B.M. Da desnutrição para a obesidade: a transição nutricional do Brasil. In: MONTEIRO, C.A. *Velhos e novos males na saúde no Brasil*: a evolução do país e suas doenças. São Paulo: Hucitec, 1995.

NICOTERA, P.; BELLOMO, G.; ORRENIUS, S.; Role of calcium in cell kiling. *Chem. Res. Toxicol.*, v. 3, 1990.

NRC – NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Institute of Laboratory Animal Research. Commission on Life Sciences. *Guide for the care and use of laboratory animals.* 7. ed. Washington, D.C.: The National Academies, 1996.

PARIKH, S.J.; YAHOVSKI, J.A. Calcium intake and adiposity. *Am. J. Nutr*., 2003.

PASCHOAL, V.; MARQUES, N.; BRIMBERG, P.; DINIZ, S. *Suplementação funcional magistral*. São Paulo: VP, 2009.

PÉREZ-GALLARDO, L.; GÓMEZ, M.; PARRA, P.; SÁNCHEZ, J.; PALOU, A.; SERRA, F. Effect of calcium-enriched, high-fat diet on calcium, magnesium and zinc retention in mice. *Br. J. Nutr.*, v. 101, n. 10, p. 1463-1466, 2008.

POPKIN, B.M. Nutritional patterns and transition. *Population and Development Review*, v. 19, p. 138-157, 1993.

RAYSSIGUIER, Y.; LIBAKO, P.; NOWAOKI, W.; ROOK, E. Magnesium deficiency and metabolic syndrome: stress and inflammation may reflect calcium activation. *Magnes. Res.*, v. 23, n. 2, p. 73-80, 2010.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, 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. *Journal of Nutrition*, v. 123, n. 10, p. 1939-1952, 1993.

ROTH, J.; QIANG, X.; MARBAN, S.L.; REDELT, H.; LOWELL, B.C. The obesity pandemic: where have we been and where are we going? *Obesity Research*, v. 12, suppl., p. 88S-101S, 2004.

RUDE, R.K.; GRUBER, H.E.; WEI, L.Y.; FRAUSTO, A.; MILLS, B.G. Magnesium deficiency: effect on bone and mineral metabolism in the mouse. *Calcif. Tissue Int.*, v. 72, n. 1, p. 32-41, 2003.

SANTOS, L.C. *Ingestão de cálcio*: influência na adiposidade e alterações metabólicas. Disponível em: <http://www.nutricaoempauta.com.br/artigo_completo. Maio/Junho, 2008>. Acesso em: 15 maio 2011.

SANTOS, L.C.; MARTINI, L.A.; CINTRA IDE, P.; FISBERG, M. Relationship between calcium intake and body mass index in adolescentes. *Arch. Latinoam. Nutr*., v. 55, n. 4, p. 345-349, 2005.

SANTOS, L.C.; MARTINI, L.A.; FREITAS, S.N.; CINTRA IDE, P. Ingestão de cálcio e indicadores antropométricos entre adolescentes. *Rev. Nutr.* [online], v. 20, n. 3, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732007000300006>. Acesso em: 26 mar. 2014.

SCHLINGMANN K.P.; KONRAD, M.; SEYBERTH, H.W. Genetics of hereditary disordens of magnesium homeostasis. *Pediatr. Nephrol*., 2004.

SGARBIERI, V.C. *Alimentação e nutrição*. São Paulo: Almed, 1987.

SHI, H.; DIRIENZO, D.; ZEMEL, M.B. Effects of dietary calcium on adipocyte lipid metabolism and body weight regulation in energy-restricted aP2-agouti transgenic mice. *FASEB J.*, v. 15, n. 2, p. 291-293, 2001.

SHILS, M.E.; OLSON, J.A.,SHIKE, M.; ROSS, A.C. *Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença*. Barueri: Manole, 2003.

SICHIERI, R.; SOUZA, R.A.G. Epidemiologia da obesidade. In: KAC, G.; SICHIERI, R.; GIGANTE, D.P. *Epidemiologia nutricional.* Rio de Janeiro: Fiocruz; Atheneu, 2008.

SILVA, J.C.; SEGURO, A.C. Effect of hipomagnesemia and magnesium suplementation on postischemic renal failure. *Rev. med. (São Paulo)*, v. 81, n. 1/4, p. 1-7, 2002.

SILVA, S.M.C.S.; MURA, J.D.P. *Tratado de alimentação, nutrição & dietoterapia.* São Paulo: Roca, 2007.

SOARES, M.J.; BINNS, C.; LESTER, L. Higher intakes of calcium are associated with lower BMI and waist cincumference in Australian adults: an examination of the 1995 National Nutrition Survey. *Asia Pac. Clin. Nutr.*, v. 13, suppl., p. S85, 2004.

SOUZA, A.V.C. *Interpretando os índices de conversão alimentar (I.C.A.) e de eficiência alimentar (I.E.A.).* 2003. Artigo técnico. Disponível em: <http://www.polinutri.com.br/upload/artigo/161.pdf>. Acesso em: 24 mar. 2014.

SPINELLI, M.O.; GODOY, C.M.S.C.; MOTTA, M.C.; CRUZ, R.J.; JUNQUEIRA, M.S.; BORTOLATTO, J. *Perfil Bioquimico dos animais de laboratorio do biotério da faculdade de medicina da USP*. 2011.

SUTER, P.M.; RUCKSTUHL, N. Obesity during growth in Switzerland: role of early socio-cultural factors favouring sedentary activities. *Int .J. Obes. (Lond.)*, v. 30, suppl. 4, p. S4-S10, 2006.

TEEGARDEN, D.; LIN, Y.C.; WEAVER, C.M.; LYLE, R.M.; MCCABE, G.P. Calcium intake relates to change in body weight in young women. *FASEB J.*, v. 13, p. A873, 1999.

WEAVER, C.M.; HEANEY, R.P. Cálcio. In: SHILS, M.E.; OLSON, J.A.,SHIKE, M.; ROSS, A.C. *Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença*. Barueri: Manole, 2003.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food And Agriculture Organization of the United Nations. *Vitamin and mineral requeriments in human*: a joint report of FAO/WHO, 2006.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Obesity and overweight*. Genebra, 2011. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets>. Acesso em: 20 ago. 2011.

WIEGERT, E.V.M.; CALIXTO-LIMA, L.; COSTA, N.M.B. Minerais. In: CALIXTO-LIMA, L.; REIS, N.T. *Interpretação de exames laboratoriais aplicados à nutrição clínica*. Rio de Janeiro: Rubio, 2012.

XUE, B.; GREENBERG, A.G.; KRAEMER, F.B.; ZEMEL, M.B. Mechanism of intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) inhibition of lipolysis in human adipocytes., *FASEB J.*, v. 17, 2001.

ZEMEL, M.B. Nutritionaland endocrine modulation of intracellular calcium: inplications in obesity, insulin resistance and hypertension. *Mol. Cell. Biochem.*, v. 188, 1998.

ZEMEL, M.B.; SHI, H.; ZEMEL, P.C.; DIRIENZO, D. Calcium and calcium-rich dairy products reduce body fat. *FASEB J.*, v. 12, p. LB211, 1999.

ZEMEL, M.B.; SHI, H.; GREER, B.; DIRIENZO, D. Regulation of adiposity by dietary calcium. *FASEB J.*, v. 14, n. 9, p. 1132-1138, 2000.

ZHANG, Q.; TORDOFF, M.G. No effect of dietary calcium on body weight of lean and obese mice and rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v. 286, n. 4, p. R669-R677, 2004.

ANEXO