

Universidade Brasil
Campus Descalvado

ELDA ELY GOMES DE SOUZA

**PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS EM CAMUNDONGOS OBESOS
SUPLEMENTADOS COM CROMO**

HEMATOLOGICAL PARAMETERS IN OBESE MICE SUPPLEMENTED WITH
CHROMIUM

Descalvado - SP
2018

Elda Ely Gomes de Souza

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS EM CAMUNDONGOS OBESOS
SUPLEMENTADOS COM CROMO

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Mauricio Peruca de Melo
Co-orientadora: Profa. Dra. Liandra Maria Abaker Bertipaglia

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Produção Animal da Universidade Brasil, como complementação dos créditos
necessários para obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Descalvado - SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

S714p Souza, Elda Ely Gomes de
Parâmetros hematológicos em camundongos obesos
suplementados em cromo / Elda Ely Gomes de Souza. --
Descalvado, 2018.
45 f. : il. ; 29,5cm.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Animal da Universidade Brasil, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Mauricio Peruca de Melo
Co-orientadora: Profa. Dra. Liandra Maria Abaker Bertipaglia

1. Complexo. 2. Hematologia. 3. Obesidade. I. Título.

CDD 636.0852

FOLHA DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DO TEXTO NA PÁGINA
UNIVERSIDADE BRASIL E BANCO DE TESES DA CAPES E REPRODUÇÃO DO
TRABALHO



Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respetivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://universidadebrasil.edu.br/portal/cursos/ppgpa/>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: **"Parâmetros Hematológicos em camundongos obesos suplementados com cromo."**

Autor(es):

Discente: Elda Ely Gomes de Souza

Assinatura: Elda Ely Gomes de Souza

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Mauricio Peruca de Melo

Assinatura: Gabriel Mauricio Peruca de Melo

Co-orientador: Profa. Dra. Liandra Maria Abaker Bertipaglia

Assinatura: Liandra Maria Abaker Bertipaglia

Data: 07 de fevereiro de 2018

TERMO DE APROVAÇÃO

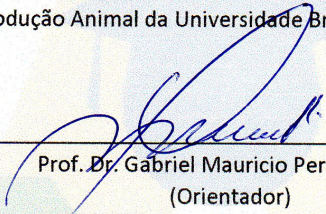


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

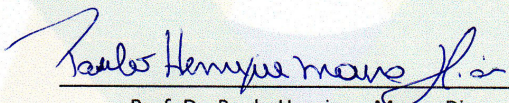
Elda Ely Gomes de Souza

“Parâmetros Hematológicos em camundongos obesos suplementados com cromo.”

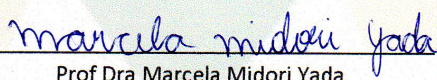
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Produção Animal da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Gabriel Mauricio Peruca de Melo
(Orientador)
Programa de Pós-Graduação em Produção Animal



Prof. Dr. Paulo Henrique Moura Dian
Programa de Pós-Graduação em Produção Animal



Prof. Dra Marcela Midori Yada
FCAV/UNESP

Descalvado, 07 de fevereiro de 2018

Prof. Dr. Gabriel Mauricio Peruca de Melo
Presidente da Banca

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a DEUS, nosso grande arquiteto, pela possibilidade de vivenciar uma nova experiência.

Agradeço em especial ao meu orientador, Prof. Dr. Gabriel Mauricio Peruca de Melo e co-orientadora Profa. Dra. Liandra Maria Abaker Bertipaglia, por terem me dado à oportunidade da orientação e contribuírem com a realização deste trabalho.

À querida professora Dra. Cassia Orlandi pelo apoio, seu excelente trabalho, ética e profissionalismo.

A empresa NewAgri® pelo desenvolvimento das fontes de cromo utilizadas no experimento.

Aos Professores da Pós-Graduação da Universidade Brasil pela orientação, amizade e valiosos ensinamentos ao longo do curso.

A secretária do Programa de Pós-Graduação em Produção Animal, Juliana, pela atenção e colaboração.

Aos colegas de curso pelos ótimos momentos que passamos juntos.

A todos vocês, muito obrigada!

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS EM CAMUNDONGOS OBESOS SUPLEMENTADOS COM CROMO

RESUMO

O cromo tem sido empregado na suplementação alimentar promovendo perda de gordura corporal. Devido à escassez de dados na literatura, este trabalho busca avaliar os parâmetros hematológicos de camundongos, obesos e não obesos sob o tratamento de duas fontes de cromo, complexado com aminoácido e inorgânico. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema de análise fatorial, com três tratamentos principais e dois tratamentos secundários, sendo cada tratamento composto por seis unidades experimentais, totalizando 36 unidades experimentais. Os tratamentos principais avaliados foram: **TC** (tratamento controle – ração comercial); **TI** (cromo na forma de cloreto de cromo); **TO** (cromo orgânico complexado com metionina). Os valores de inclusão na dieta foram estabelecidos com o intuito de obter um consumo médio diário de 0,5 a 0,7 mg/kg⁻¹ de cromo (consumo médio de ração de 7 gramas). O experimento teve duração de 35 semanas, dos quais 28 semanas foram utilizadas para diferenciação de peso entre indivíduos, que constituíram o tratamento secundário (obesidade), uma semana para adaptação a dieta e seis semanas de avaliação experimental. Ao final do período experimental, no 42º dia de suplementação, os camundongos foram insensibilizados utilizando anestesia inalatória, em seguida, foi realizada coleta de sangue por punção cardíaca para determinação dos parâmetros hematológicos. Utilizando-se um analisador automatizado hematológico foram avaliados: contagem de células vermelhas do sangue e contagem de células brancas. A série vermelha não foi alterada em animais suplementados com cromo ou pela condição corporal. A série branca, com exceção dos monócitos, sofreu influência dos dois fatores experimentais, sendo os resultados modulados pela interação entre eles. A suplementação com cromo apresentou efeito sobre os animais obesos, apresentando resultados variáveis na contagem de células brancas.

Palavras-chave: complexo, hematologia, obesidade.

HEMATOLOGICAL PARAMETERS IN OBESE MICE SWISS SUPPLEMENTED WITH CHROMIUM

ABSTRACT

Chromium has been used in dietary supplementation promoting loss of body fat. Because of limited data in the literature, this work seeks to evaluate the hematologic parameters of obese mice under treating of two sources of complex and inorganic chromium. Thirty-six swiss mice were used in this study, they were distributed in six treatments. The experimental design used in this study was completely randomized, in a factor analysis scheme, with three main treatments and two secondary treatments, each one had six experimental units. The main treatments evaluated were: TC (control group - received commercial ration); TI (chromium as chromium chloride); TO (organic chromium-methionine). The levels of chromium inclusion in the diet were established to obtain an average daily consumption of 0.5 to 0.7 mg/kg (average consumption of 7 grams of rations). The experiment lasted thirty-five weeks, of which twenty-eight weeks were used to differentiate the weight among individuals that constituted the secondary treatment (obesity), one week to adapt to the diet, and six weeks to experimental evaluation. After experimental period (forty-second day of supplementation), the mice were numbed with inhalation anesthesia, next, carried out blood sampling by cardiac puncture with objective to analyze the hematologic parameters. Red-blood cell count and white-blood cell count was evaluate by an automated haematological analyzer. The red blood cell did not show significant changes in both treatments type. The white blood cell, except monocytes, suffered the influence of the experimental facts, thus, the results were modulate by the interaction between them. The chromium supplement showed effect about the obese animals, showing variables results in white blood cell count.

Keywords: complex, haematology, obesity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração do receptor transmembrana de insulina	18
Figura 2: Mecanismo proposto da participação do cromo na ação da insulina	20
Figura 3: Na parte superior animal representativo do tratamento obeso classificado com escore corporal de 4,5, e na parte inferior, animal considerado como não obeso classificado com escore corporal 3,5, segundo Ullman-Culleré [70].	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição bromatológica das rações utilizadas no experimento. Dados expressos na matéria seca.....	28
Tabela 2: Peso vivo corpóreo expresso em gramas de camundongos Swiss normais ou obesos, suplementados com diferentes fontes de cromo.....	29
Tabela 3: Consumo de ração expresso em gramas/animal.dia ⁻¹ de camundongos Swiss normais ou obesos, suplementados com diferentes fontes de cromo.	29
Tabela 4: Parâmetros hematológicos da série vermelha de camundongos Swiss não obesos e obesos, suplementados com diferentes fontes de cromo.....	32
Tabela 5: Parâmetros hematológicos de camundongos Swiss não obesos e obesos, suplementados com diferentes fontes de cromo.	34
Tabela 6: Parâmetros hematológicos da série branca de camundongos Swiss senis não obesos e obesos, suplementados com diferentes fontes de cromo.	35

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

GLUTs	Transportadores de glicose
DM	Diabetes mellitus
Ppb	Partes por bilhão
Ppm	Partes por milhão
TC	Tratamento controle
TI	Cromo na forma de cloreto de cromo
TO	Cromo inorgânico complexado com metionina
NRC	<i>National Research Council</i>
RBP-4	Proteína ligada ao retinol 4
GTF	Fator de tolerância à glicose
LMWCr	Low-molecular weight chromium-binding substance
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
IL-6	Interleucina-6

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Relevância do tema.....	13
1.2	Fundamentação.....	14
1.2.1	Cromo.....	14
1.2.2	Interação metabólica cromo e insulina	17
1.2.3	Biodisponibilidade de fontes de cromo	20
1.2.4	Suplementação de cromo e alterações hematológicas	22
1.2.5	Suplementação de cromo e obesidade	24
1.3	Hipótese	25
1.4	Objetivos	25
1.4.1	Objetivo geral	25
1.4.2	Objetivos específicos.....	25
2	MATERIAIS E MÉTODOS	26
2.1	Condução experimental.....	26
2.2	Coleta de sangue	30
2.3	Análise hematológica	30
2.4	Análise estatística.....	31
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
3.1	Hematologia série vermelha.....	32
3.2	Hematologia série branca.....	35
4	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1 INTRODUÇÃO

1.1 Relevância do tema

O cromo consiste num mineral essencial para manutenção da taxa normal de glicose. Conhecido por controlar os níveis de açúcar no sangue, sendo especialmente utilizado no tratamento de diabetes [1].

Apesar do reconhecimento do cromo como um nutriente essencial, pouco se sabe ainda, sobre a funcionalidade do mesmo no organismo humano e animal, com exceção do seu papel no metabolismo da glicose, dado que sua ausência pode ocasionar resistência à ação da insulina impedindo-a de captar a glicose [2].

Neste sentido, estudos significativos dos efeitos antidiabéticos do cromo *in vivo*, vem demonstrando que as propriedades e os mecanismos dos compostos do cromo, têm agido como um potencializador no controle dos índices glicêmicos, além de fornecer energia ao corpo e o controle do peso [3].

A deficiência de cromo na dieta coopera para a intolerância à glicose e mudanças relacionadas ao perfil lipídico. Este fato ocorre porque a função primária do cromo é a de potencializar os efeitos da insulina, com melhor tolerância à glicose e, conseqüentemente, melhorias no metabolismo de carboidratos e lipídios [3].

Segundo Maletto [4], os elementos orgânicos minerais apresentam diversas vantagens em relação às fontes inorgânicas, pois estes exprimem maior absorção no organismo; elevada estabilidade; baixa toxicidade e menor interação com outros macros e microminerais da dieta e com outros componentes tais como a gordura e as fibras.

Em razão da sua afinidade pela fibra da dieta, a suplementação de cromo na forma de sal inorgânico não é um método eficiente, sendo assim, é aconselhável a utilização deste mineral na forma de quelatos ou complexos, uma vez que esta afinidade interfere na absorção [3].

No entanto, mecanismos exatos e/ou medidores das ações do cromo no organismo, ainda não são totalmente elucidados. Fatores estes que têm gerado grandes interesses terapêuticos sobre a ação do cromo *in vivo*.

Devido a dados controversos na literatura, em função da diversidade de fontes deste elemento, pouco se sabe sobre os efeitos sobre parâmetros

hematológicos, o que dificulta estabelecer os níveis seguros de suplementação diária tanto para humanos como para animais.

Desta forma, trabalhos ligados à suplementação da dieta do cromo são pertinentes e necessários para fornecer subsídios para a correta suplementação deste mineral no organismo.

Assim, o objetivo é avaliar os efeitos da suplementação do cromo complexado com metionina em fêmeas de camundongos Swiss obesas e não obesas sobre os atributos hematológicos. Os dados gerados servirão como bases para estudos com suplementação deste elemento em humanos e animais.

1.2 Fundamentação

1.2.1 Cromo

O cromo é um elemento mineral descoberto por Vaquelin em meados de 1.797 [5], seu nome deriva do grego “*chroma*”, que significa “cor”, devido às diferentes colorações dos compostos de cromo [2]. O cromo pode se apresentar em diferentes formas de oxidação: o cromo III ou Cr(III) que é essencial para a manutenção da taxa normal de glicose, lipídeos e proteínas em animais e seres humanos e o cromo VI ou Cr(VI) são altamente tóxicos por serem um agente carcinogênico [2, 6]. Apresentam valências de -2 (Cr^{2-}) a +6 (Cr^{6+}), respectivamente. Dentre os vários estados de oxidação do cromo, apenas a forma trivalente (Cr^{3+}) possui interesse na saúde humana, por não apresentar carcinogenicidade aos humanos [7-9].

Por consistir num mineral essencial no metabolismo humano, suas funções consistem principalmente em manter o metabolismo normal da glicose, carboidratos, do sistema nervoso periférico, e do metabolismo lipídico, reduzindo a concentração plasmática de colesterol em indivíduos com dislipidemias [10].

Para Mertz e Schwarz [11], no que diz respeito ao metabolismo dos carboidratos, o cromo age na forma de um complexo orgânico de baixo peso molecular, denominado “fator de tolerância da glicose” (GTF), que é formado pelo Cr^{3+} , associado a ácido nicotínico, glicina, cisteína e ácido glutâmico, que estimulam a captação de glicose pelas células de tecidos-alvo, ou seja, trata-se de uma

substância que trabalha com a insulina para facilitar a entrada de glicose nas células [12].

Neste sentido, a insulina tem como função participar do metabolismo energético, permitindo glicose à disposição nos músculos e atuando no metabolismo das gorduras e na regulação do colesterol [13].

O mecanismo pelo qual o cromo potencializa a ação da insulina ainda não está totalmente esclarecido na literatura, mas ele pode aumentar a fluidez da membrana celular, facilitando a ligação da insulina com seu receptor e a internalização da mesma [14].

Em humanos, o cromo ainda inibe indiretamente as enzimas de síntese de ácidos graxos que são responsáveis pela lipogênese, modificando o armazenamento dos triglicérides mediadas pela insulina, resultando em menor deposição de gordura e efetuando positivamente sobre a utilização e incorporação dos aminoácidos e proteínas no organismo, melhorando a transcrição dos ácidos ribonucleicos (RNA) [14,15].

Estudos relacionados à deficiência do cromo nos organismos, definem ainda que a ação da insulina é deprimida a ponto de alterar o metabolismo de carboidratos, lipídios e aminoácidos, além da rápida perda de peso de forma inexplicada; e o aumento nas necessidades de insulina e intolerância à glicose; podendo levar a um quadro de diabetes do tipo 2 e a um funcionamento anormal do sistema nervoso [1,16].

Desta forma, a suplementação de cromo pode ser feita nas situações em que interferem a ação da insulina. Ademais, a potencialização da insulina estimula a absorção da glicose, lipídeos e o metabolismo de proteínas, garantindo diferentes efeitos metabólicos no organismo [17].

Estudos observaram que o cromo inibe a fosfatase fosfotirosina, que separa o fosfato do receptor de insulina e conseqüente diminuição da sensibilidade à insulina [18]. Frente a importância do cromo como um agente potencializador da sinalização da insulina no organismo, pressupõe-se que a sua deficiência na dieta possa contribuir para o desenvolvimento da resistência insulínica e do diabetes mellitus tipo II [19].

O cromo também já se revelou útil na diminuição de stress oxidativo, o que é importante para evitar a progressão de comorbidades associadas ao diabetes, uma

vez que a resistência à insulina acaba por desencadear aumentos desse stress [19, 20-22].

A utilização da glicose plasmática e da insulina para determinar o efeito do cromo no organismo, não é eficiente, visto que a concentração de ambos é regulada de forma harmônica. No entanto, alguns trabalhos têm relatado efeitos benéficos da suplementação de cromo na glicemia, sendo este uma alternativa positiva para pacientes com diabetes mellitus tipo II [23-25].

Podendo ser encontrado mesmo que em pequenas quantidades, as fontes mais ricas de cromo são: pimenta, suco de uva e vinhos, levedo de cerveja, carnes processadas, fígado bovino, frango, gema de ovo, pimentão, brócolis, feijão verde, cenoura, batata, alho, maçã, banana, espinafre, cogumelos, nozes, mariscos, ostras, café, manteiga, melaço, grãos e cereais integrais [1,26].

Complementarmente, o cromo também está presente em suplementos nutricionais e plurimineral, disponível na forma de sais de cloreto, citrato, picolinato e nicotinato. O cloreto de cromo é absorvido pelo organismo em menor quantidade, cerca de 0,4%, enquanto que o picolinato possui absorção estimada em 0,7 a 5,2% [26].

Dado sua funcionalidade, os suplementos minerais, têm sido utilizados como suplementos dietéticos para pacientes que necessitam de controle glicêmico, tais como diabéticos; pessoas com resistência à insulina; gestantes; pessoas que se alimentam compulsivamente de doces e massas; atletas que praticam atividades de alta densidade; pessoas que vivem sob stress constante; pessoas com problemas intestinais que possam prejudicar a absorção do nutriente e pessoas com baixa ingestão alimentar [1,3].

Segundo a *National Research Council*, os aportes recomendados para a ingestão diária do cromo em adultos variam de 50mcg a 200mcg [2]. Em dietas normais, o consumo pode ser de 50mcg a 80mcg, porém segundo a Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos, esta quantidade é insuficiente para o bom funcionamento do organismo, sendo recomendado uma ingestão diária de 100mcg a 200mcg por adultos [27].

Ademais as recomendações variam segundo a faixa etária, sendo sugerido até 35mcg para homens com faixa etária de 19 a 50 anos e 30mcg para homens acima de 50 anos. Já para as mulheres com faixa etária de 19 a 50 anos a

recomendação diária é de 35mcg e acima de 50 anos ingestão diária de apenas 20mcg [26].

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária estabelece, porém que o nível seguro e o limite máximo de ingestão de cromo é de 1.000mcg/dia para adultos [28].

Neste sentido, acredita-se que o suplemento de cromo é essencial para os seres humanos e animais, especialmente os diabéticos, visto que estes pacientes apresentam uma deficiência maior deste tipo de nutriente, necessitando de maior quantidade de suplemento nutritivo devido a sua maior assimilação [27].

1.2.2 Interação metabólica cromo e insulina

Um dos efeitos mais conhecido da insulina é a atuação vital na conservação da homeostase de glicose. Esse hormônio é secretado após as refeições em resposta a elevação da concentração dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos pelas células β das ilhotas pancreáticas. Desde 1921, data de sua descoberta, muitos estudiosos se dedicaram ao entendimento do mecanismo de ação desta molécula. É imprescindível entender a ação da insulina devido à prevalência de células resistentes a essa hexose, estando presente na patogênese de diversas doenças, a exemplo da diabetes mellitus, bem como compreender sua correspondência com fatores nutricionais como macro e microminerais [29].

A ação da insulina inicia ao se ligar a um receptor específico presente na membrana plasmática da célula. Estes receptores são proteínas com atividade quinase, composta por quatro subunidades, duas α e duas β , respectivamente com extensão extracelular e intracelular (Figura 1). Estas subunidades trabalham como uma enzima alostérica na qual a subunidade α inibe a atividade tirosina-quinase da subunidade β . No momento em que ocorre a ligação da insulina à subunidade α , a subunidade β passa a ter atividade quinase mudando sua conformação e autofosforilação, ocasionando um aumento na atividade quinase do receptor [30].

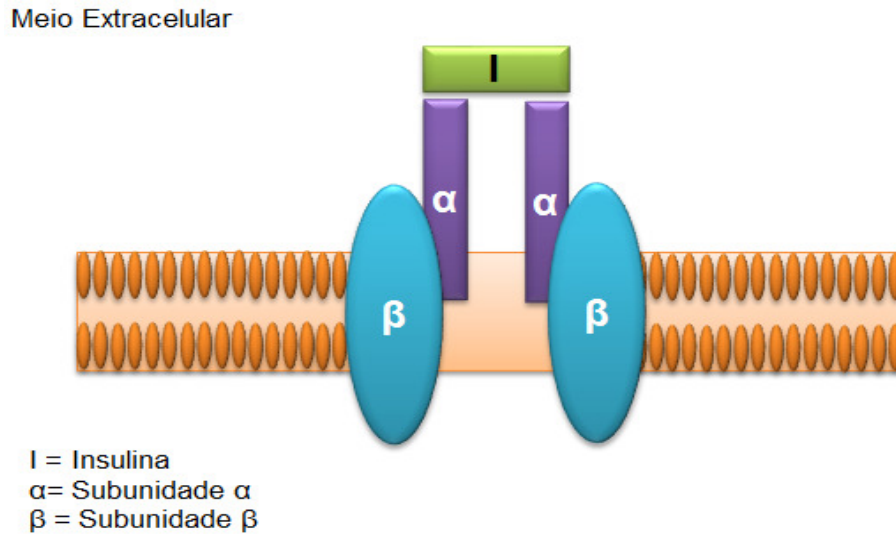


Figura 1: Ilustração do receptor transmembrana de insulina

Fonte: Elaborado pelo Autor

Uma vez ativado, o complexo hormônio-receptor fosforila vários substratos proteicos em tirosina e gera um sinal que resulta na ação da insulina sobre a glicose, até o momento foi identificado um total de dez substratos do receptor de insulina [31]. Além da sua capacidade de ser fosforilado em tirosina, o receptor de insulina é capaz de se fosforilar no aminoácido serina, que por sua vez enfraquece a capacidade de auto fosforilação em tirosina do receptor pós-estímulo da ligação insulina-receptor [32]. O mecanismo de ação inibitório da fosforilação da tirosina gera um *feedback* negativo na sinalização insulínica podendo resultar na resistência à insulina [33].

O conceito de sensibilidade à insulina foi introduzido por *Sir Harold Himsworth*, em 1939, ao estudar a resposta de pacientes diabéticos ao estímulo glicêmico e à insulina [34]. Pode-se definir resistência à insulina como uma perturbação das vias de sinalização, mediadas pela insulina em que as concentrações normais do hormônio produzem uma resposta biológica subnormal, ocorrendo então aumento da função das células beta pancreáticas para compensar a resistência à insulina, resultando em níveis sanguíneos elevados de insulina e mais tarde de glicose [29, 35, 36].

Pretendendo elucidar novas alternativas terapêuticas e melhorias metabólicas, há estudos que avaliam a interferência de alguns minerais no mecanismo de ação da insulina. As relações desses elementos no que diz respeito ao sinergismo ainda são desconhecidas, não havendo até mesmo informações sobre uma dose segura. O desfecho de algumas pesquisas aponta que o magnésio,

molibdênio, zinco, vanádio e manganês facilitam o catabolismo da glicose, enquanto que o cromo, vanádio, zinco, molibdênio e magnésio podem melhorar a atividade da insulina [37].

Nos últimos anos, houve considerável interesse em pesquisas sobre a utilização de Cromo (Cr) na alimentação animal. A idealização de conceituar o cromo como mineral essencial à nutrição animal iniciou em 1954, onde um estudo demonstrou que a síntese de colesterol e ácidos graxos em células de ratos era maior na presença de íons de cromo [11]. A partir de então, foi crescendo o número de estudos sobre as consequências da adição de cromo na dieta animal, provocando benefícios a diversas espécies, permitindo aos pesquisadores acreditar que a suplementação com este elemento pode ser um fator adicional de melhoria na produção de tilápia [38].

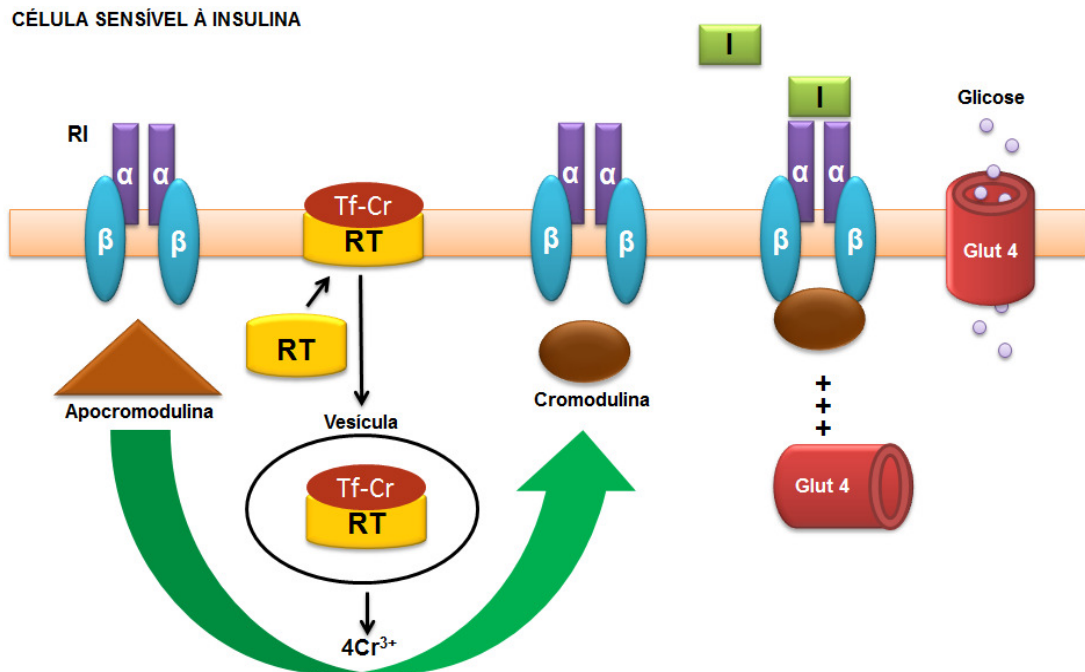
A partir de então, vários estudos estão sendo combinados com os resultados da relação do cromo em resposta aos desafios de glicose e insulina. O mecanismo de participação do cromo na ação da insulina começou a ser esclarecido em meados dos anos 1980 por meio do isolamento e da caracterização de um oligopeptídeo ligador de cromo, que inicialmente foi denominado substância ligadora de cromo de baixo peso molecular (*low-molecular weight chromium-binding substance* – LMWCr) [39,40], sendo hoje conhecida por cromodulina, pelo fato da semelhança em estrutura e função com a calmodulina. Essa estrutura é formada por quatro íons de Cr^{+3} ligados a resíduos de glicina, cisteína, glutamato e aspartato e foi isolada em tecidos de várias espécies de mamíferos [3].

Este mineral participa ativamente do metabolismo de carboidratos, principalmente co-atuando com a insulina de modo a potencializar a ação da mesma, melhorando a tolerância à glicose, levando então a uma absorção de glicose mais eficiente [8, 41]. Segundo achados pelos quais o cromo age, se propôs que esse mineral aumente a fluidez da membrana celular, amplificando a sinalização celular de modo a facilitar a ligação da insulina com o seu receptor [42, 43].

Recentemente, o cromo foi caracterizado como componente do mecanismo de amplificação da sinalização intracelular de insulina, responsável pelo estímulo da translocação de GLUT-4, ou seja, um fator colaborador do aumento da sensibilidade de receptores insulínicos na membrana plasmática [43].

Quando ocorre um aumento na glicemia, a insulina é rapidamente secretada para a circulação e liga-se na subunidade alfa de seu receptor localizada na face

externa da membrana plasmática (Figura 2). Esta alteração desencadeia uma série de reações de fosforilação em cascata com objetivo de estimular a translocação dos transportadores de glicose (GLUTs) para a membrana plasmática [44].



RI = receptor de insulina; RT = receptor de transferrina; Tf-Cr = transferrina ligada ao cromo; I = Insulina; α = subunidade α; β = subunidade β

Figura 2: Mecanismo proposto da participação do cromo na ação da insulina

Fonte: Adaptada [39, 45]

Após a insulina ligar-se ao receptor da membrana plasmática, ocorre um estímulo ao movimento do cromo sanguíneo para as células insulino-dependentes, resultando na ligação da apocromodulina ao cromo. A cromodulina então se liga ao receptor de insulina, ativando a tirosina quinase. No entanto, o estímulo à ação da insulina é dependente do conteúdo de cromo na cromodulina [40].

1.2.3 Biodisponibilidade de fontes de cromo

O cromo possui de modo geral uma baixa biodisponibilidade. Os mais diversos aspectos causam interferência na absorção do cromo, a exemplo do fator inibição podemos citar minerais como zinco, ferro e vanádio, no entanto, outras substâncias apresentam ação estimulante sobre este elemento como os aminoácidos, o oxalato e a vitamina C [46].

Depois de ser absorvido, o cromo pode ser armazenado em diversos órgãos, a maior quantidade fica distribuído no fígado, rim e baço [47]. O resultado de um estudo realizado em ratos com injeção de cromo marcado foi constatado que houve maior retenção deste mineral no fígado [48].

Fazendo uma comparação entre as duas apresentações dos microelementos (orgânica ou inorgânica), a forma orgânica aumenta a biodisponibilidade da maioria dos minerais em comparação às formas inorgânicas. O cromo na sua forma inorgânica de cromatos (hexavalente), apresenta um potencial tóxico variável entre as diferentes espécies. O *Mineral Tolerance of Domestic Animals*, editado pelo NRC (1980), menciona que a quantidade de 30 ppm no fígado já é capaz de produzir toxicidade neste órgão afetando as funções hepáticas [49].

Os minerais orgânicos são íons metálicos ligados quimicamente a uma molécula orgânica (aminoácidos, peptídeos ou complexo polissacarídeos), formando estruturas com características únicas, proporcionando a esses íons maior estabilidade e alta biodisponibilidade mineral, portanto, esses minerais orgânicos tratam-se de complexos [50].

Deve-se salientar, porém, que os minerais na forma quelada nem sempre apresentam melhor biodisponibilidade que a forma de sal simples, caso do cromo levedura e do cloreto de cromo, do ferro EDTA e do sulfato de ferro. O efeito do quelato vai depender basicamente das características do agente quelante, sendo de suma importância sua estabilidade no trato gastrintestinal e a solubilidade em água ou lipídeos [51].

O requerimento mineral pode ser atendido pelos minerais presentes nos alimentos ou pela adição de minerais à dieta, na forma de sal simples ou complexado. A simples ingestão destes não implica na consequente absorção por inúmeros fatores. Sabe-se que os minerais na forma de sais solúveis são mais biodisponíveis que os presentes nos alimentos. Os elementos minerais na forma de sulfatos são mais absorvidos que óxidos e carbonatos. Um fator importante com relação à biodisponibilidade de minerais inorgânicos diz respeito à solubilidade, ou seja, quanto maior a solubilidade em água, maior será a biodisponibilidade [52].

Os minerais metálicos na forma de sal simples, para serem absorvidos no intestino delgado, devem, durante o trânsito no trato gastrintestinal, dissociarem-se liberando íons metálicos (cátions) [52].

O simples fato de se dissociarem não garante a absorção, pois o processo de passagem pela membrana celular, no intestino delgado, é dependente de proteínas transportadoras, também denominadas ligantes. O complexo formado entre a molécula transportadora e o íon metálico deverá apresentar carga total neutra, caso contrário, não ocorrerá absorção. Os diversos microminerais competem entre si pelas proteínas transportadoras, sendo que o excesso de certos elementos minerais poderá reduzir a biodisponibilidade de um ou mais elementos [52].

A absorção de minerais como zinco, cálcio e cromo no intestino delgado podem ser afetados por fatores como a presença de agentes infecciosos ou enteropatias e fatores relacionados ao hábito alimentar como a presença de óleo mineral, laxativos, consumo de grande quantidade de fibra, fitatos, oxalatos, micotoxinas e presença de elementos que complexam outros minerais [53].

Após a absorção, o cromo pode ser estocado em vários tecidos do organismo, sem possuir um local específico necessariamente, mas totalizando, em média, de 4 a 6 mg de cromo no organismo [54]. A maior quantidade de cromo parece estar distribuída no fígado, rins, baço e epidídimo [55].

Chen et al. [56], testaram a influência de agentes quelantes (oxalato, fitato, citrato e EDTA) na absorção intestinal do cromo em ratos. Os autores observaram redução na absorção *in vitro* e *in vivo*, quando foi incluído o fitato, e aumento na absorção, quando foi utilizado o oxalato.

1.2.4 Suplementação de cromo e alterações hematológicas

O sangue possui uma porção sólida formada por glóbulos vermelhos também denominados de hemácias ou eritrócitos; leucócitos e plaquetas, sua outra porção é líquida, chamado de plasma. O plasma é constituído de 91,5% de água; 7,5% de sólidos orgânicos, de modo que as proteínas como o fibrinogênio, albumina, globulinas e fatores de coagulação correspondem a aproximadamente 93%, os 7% restantes é composto por elementos nitrogenados, colesterol, gorduras, fosfolípídeos, glicose, enzimas e hormônios. Somente 1% do plasma dispõe de sólidos inorgânicos, minerais como o cromo [57].

De acordo com Viana et al [58], conhecer a hematologia é essencial para determinar o estado de saúde dos animais, dispondo do hemograma como um

método que concede informações que auxiliam no diagnóstico e prognóstico de afecções, sendo este, um meio simples de se obter dados qualitativos e quantitativos dos eritrócitos, dos leucócitos e plaquetas a partir de análises laboratoriais.

O perfil hematológico da série vermelha do sangue é definido através do eritograma, uma fração do hemograma que corresponde à avaliação quantitativa da massa de eritrócitos e hemoglobina circulante. A missão do eritrócito é promover o transporte de oxigênio (O_2) para os tecidos por meio da ligação deste gás a molécula de hemoglobina, essas células equivalem aproximadamente a 40,0% de todo volume sanguíneo [59].

O volume de oxigênio transportado está diretamente relacionado à concentração de hemoglobina presente na célula (Concentração de Hemoglobina Globular Média – CHGM). Outro parâmetro importante possível de ser analisado através do eritograma é o hematócrito, que consiste na porcentagem de volume ocupado pelos glóbulos vermelhos, onde, em casos de anemia o hematócrito se encontra abaixo dos índices normais [59].

O perfil hematológico da série branca do sangue é analisado através do leucograma, este exame é composto pela contagem global e diferencial dos leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos), células que respondem aos diferentes processos inflamatórios atuando no reconhecimento, sinalização e neutralização de antígenos [58].

Os neutrófilos conferem a maior porção dos leucócitos, essas células são especializadas em fagocitar e eliminar bactérias por intermédio da ativação de peroxidases e proteínas existentes em seu citoplasma e grânulos tais como lisozimas, proteínas catiônicas e defensinas. Por outro lado, os eosinófilos atuam na defesa do organismo contra doenças de origem parasitárias, alérgicas e neoplásicas [60].

Os linfócitos também participam do mecanismo de defesa do sistema imune promovendo reconhecimento e resposta a antígenos específicos, eventualmente, essas células são responsáveis por causar danos ao próprio organismo, resultando na doença autoimune. Os monócitos são fagócitos mononucleares que se originam na medula óssea, essas células circulam pelos vasos sanguíneos e posteriormente migram para os tecidos, onde realizam suas funções [60].

Através do plaquetograma é possível realizar a contagem das plaquetas, sendo esta expressa em $PLT \times 10^3/mm^3$. Estas células participam do mecanismo de

coagulação sanguínea por meio de formação de tampões em lesões que provoquem extravasamento de sangue da circulação. As plaquetas possuem uma sobrevivência de 10 dias, em pacientes acometidos de doenças como diabetes, aterosclerose e AIDS essa sobrevivência apresenta-se diminuída [58].

Além dos parâmetros sanguíneos permitem avaliar a condição de saúde do animal, ele pode apresentar de que forma a dieta está influenciando organismo, entretanto, poucos trabalhos utilizam estes parâmetros para avaliar quais alterações hematológicas ocorrem quando os animais são submetidos à distintas fontes de cromo. O excedente de cromo no sangue implica diretamente na capacidade de reabsorção deste mineral pelos rins, em consequência disto ocorre a excreção do elemento pela urina. As perdas urinárias de cromo geralmente não são restabelecidas rapidamente, em função da absorção intestinal deste mineral não ser suficiente para suprir o cromo perdido [13, 61].

1.2.5 Suplementação de cromo e obesidade

A mudança na sensibilidade da célula à insulina ocorre durante um ciclo de vida normal, ocorrendo resistência à insulina naturalmente com o envelhecimento [62]. A condição mais crítica na manifestação de doenças metabólicas é a obesidade. Além da sua capacidade de estocar energia, o tecido adiposo tem capacidade de sintetizar e secretar adipocinas, hormônio relacionado com substâncias ligadas em resistência à insulina [63, 64].

Na obesidade, a produção de muitos desses produtos é aumentada, tendo como exemplo a proteína ligada ao retinol quatro (RBP-4), substância que em seu mecanismo fisiológico atua na via de sinalização da insulina, inibindo a fosforilação da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), suprimindo a translocação celular do GLUT-4 [65, 66]. Em obesos, também ocorre liberação aumentada do fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), citocinas que também possuem papel no desenvolvimento da resistência à insulina [66, 67].

Estudos de suplementação com cromo revelaram que este mineral inibe o aumento de TNF- α em níveis elevados de estresse oxidativo em culturas de monócitos exposto por níveis elevados de glicose [68, 69]. O efeito inibitório de Cr sobre a secreção de TNF- α em monócitos tem sido associado aos monócitos

tratados com peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) e, também, ao efeito antioxidante do Cr [68].

1.3 Hipótese

O cromo é um agente que acelera o metabolismo e atua diretamente na ação da insulina promovendo redução da gordura corporal. Na forma de complexo, o cromo pode apresentar maior absorção e segurança clínica, quando comparado com a forma inorgânica e, desta forma, não alterará os parâmetros hematológicos de camundongos obesos.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo geral

Avaliar os parâmetros hematológicos de camundongos obesos e não obesos, sob o tratamento de duas fontes de cromo, complexado com aminoácido ou inorgânico (cloreto de cromo).

1.4.2 Objetivos específicos

1. Avaliar os efeitos da suplementação com cromo sobre a série branca e vermelha do sangue;
2. Avaliar alterações sobre a série branca e vermelha do sangue em função da obesidade;
3. Avaliar os efeitos da interação obesidade e formas de suplementação de cromo sobre os parâmetros sanguíneos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo faz parte de uma segunda fase do projeto de pesquisa do Prof. Dr. Gabriel Mauricio Peruca de Melo, para avaliação da suplementação de cromo em camundongos obesos como agente hipoglicemiante e de redução de gordura corpórea. Diante de tal fato, será descrita a condução experimental do estudo como um todo, no entanto, o objetivo do presente é restrito aos parâmetros hematológicos, resultado das amostras do sangue colhidas na fase final da condução experimental.

Da condução experimental, na primeira fase experimental, foram avaliados o consumo e alterações de peso dos camundongos com a suplementação de cromo, cujos resultados fazem parte da dissertação orientada pelo Prof. Dr. Gabriel, de Janaina Regina Rigobello Imediato da Silva Santos, intitulada “Complexo cromo metionina como agente hipoglicemiante em camundongos obesos”, do Programa de Mestrado Profissional em Produção Animal, da Universidade Brasil, no ano de 2016.

2.1 Condução experimental

O experimento e as análises laboratoriais foram conduzidos no laboratório de PD&I situado na Universidade Brasil, Campus de Descalvado e no Laboratório de Biogeoquímica, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal.

No estudo, foram utilizadas 60 fêmeas de camundongos da espécie Swiss com idade média de quatro semanas. Estas foram separadas em três grupos com 20 unidades. Cada grupo ficou confinado em gaiolas separadas pelo período de 28 semanas, alimentados com água filtrada e ração comercial (Probiotério MP77), *ad libitum*, disponibilizadas nos comedouros e bebedouros das gaiolas com o objetivo de promover a diferenciação corpórea (obesidade).

Transcorridas 32 semanas de idade, os animais foram separados em pares, sendo então os animais pesados e classificados de acordo com seu peso corpóreo. Para definir a condição corporal dos camundongos, foi utilizada a metodologia de Ullman-Culleré [70] onde os escores corporais (EC) variam entre 1 a 5.

Animais com peso superior a 60 gramas foram classificados como obesos e, por sua vez, animais com peso entre 45 e 50 gramas foram considerados não

obesos (Figura 3). A partir deste ponto, somente 36 animais foram selecionados para prosseguirem no experimento. Estes foram então submetidos a um período de adaptação ao novo alojamento e a nova dieta pelo período de uma semana. Após a adaptação, os animais foram novamente pesados e, então, se iniciou o período de seis semanas de avaliação.

O delineamento experimental do estudo foi inteiramente casualizado, baseado em análise fatorial com três tratamentos principais e dois tratamentos secundários. Seis unidades experimentais foram utilizadas em cada tratamento. Os tratamentos principais avaliados foram: TC (tratamento controle - ração comercial), TI (cromo na forma de cloreto de cromo - 100 mg.kg⁻¹ ração) e TO (cromo orgânico complexado com metionina - 100 mg.kg⁻¹ ração).



Figura 3: Na parte superior animal representativo do tratamento obeso classificado com escore corporal de 4,5, e na parte inferior, animal considerado como não obeso classificado com escore corporal 3,5, segundo Ullman-Culleré [70].

Fonte: SANTOS [71]

Os tratamentos secundários foram realizados com animais não obesos e com animais obesos. Os valores de inclusão na dieta foram estabelecidos com o intuito de obter consumo médio diário de 0,5 a 0,7 mg/kg⁻¹ de cromo. As fontes de cromo avaliadas, foram elaboradas pela empresa NewAgri® alocada no município de Descalvado.

A ração comercial (Probiotério MP77) e as fontes de cromo (cloreto de cromo e cromo metionina) foram trituradas, peneiradas e pesadas. Após esse processo, foram transferidos para um misturador do tipo *ribbon blender* e adicionado água (60% do peso da ração), sendo homogeneizado por 20 minutos. O material processado foi então submetido à formação de pellets e pigmentados de acordo com o tipo de cromo adicionado.

A Tabela 1 apresenta a composição bromatológica das rações utilizadas.

Das 35 semanas de duração do experimento, 28 foram utilizadas para a diferenciação do peso entre os indivíduos, uma semana para o período de adaptação e as seis semanas restantes utilizadas na avaliação experimental. Na fase de avaliação experimental, o peso vivo médio e o consumo de ração dos animais, estão apresentados na Tabela 2 e 3, respectivamente [71].

Tabela 1: Composição bromatológica das rações utilizadas no experimento. Dados expressos na matéria seca

Atributos	Tratamentos/Rações		
	Controle	TI	TO
Matéria seca, %	11,25	12,55	11,10
Proteína bruta, % MS	24,33	23,99	23,95
Fibra bruta, % MS	9,82	9,55	9,91
Matéria mineral, % MS	6,82	7,22	6,99
Cálcio, % MS	0,77	0,75	0,79
Fósforo, % MS	0,52	0,49	0,54
Cromo, mg/kg MS	0,21	103,56	101,64
Cobre, mg/kg MS	1,82	1,95	1,83
Ferro, mg/kg MS	10,22	11,15	10,90
Manganês, mg/kg MS	55,23	56,90	53,23
Selênio, mg/kg MS	0,088	0,094	0,099
Zinco, mg/kg MS	38,56	39,45	37,02

Ração enriquecida com 9.000 UI/kg de vitamina A, 12 mcg/kg de vitamina B12, 5 mcg/kg de vitamina B2; 1.500 UI/kg de vitamina D3, 4 mg/kg de vitamina E, 2 mg/kg de vitamina K3, 300 mg/kg de cloreto de colina, 400 mg/kg de metionina, 30 mg/kg de niacina, 10 mg de pantotenado de cálcio e BHT como antioxidante (10 mg/kg).

Fonte: Santos [71]

De acordo com Santos [71], não houve diferença significativa entre os tratamentos principais TC e TI em todo o período experimental, no entanto, nas pesagens realizadas aos 28^o e 42^o dias os animais dos tratamentos TO apresentaram pesos inferiores aos animais do tratamento TC independente do BC (índice de condição corpórea). Em todo período experimental houve efeito significativo para o tratamento secundário (animais não obesos e animais obesos), sendo a diferença média entre estes dois grupos de 11,66 gramas.

Tabela 2: Peso vivo corpóreo expresso em gramas de camundongos Swiss normais ou obesos, suplementados com diferentes fontes de cromo.

Períodos	Peso	Suplementação					Médias
		TC	TI	TO			
Dia zero	Normal	50,66	50,30	48,78	49,91	B	
	Obesos	62,51	60,73	61,48	61,57	A	
	Médias	56,59	a 55,51 a	55,13	a		
14 ^o dia	Normal	52,93	50,56	48,37	50,62	B	
	Obesos	62,21	59,45	58,91	60,19	A	
	Médias	57,57	a 55,00 a	53,64	a		
28 ^o dia	Normal	54,43	53,73	48,88	52,35	B	
	Obesos	62,70	60,23	59,03	60,65	A	
	Médias	58,56	a 56,98 ab	53,95	b		
42 ^o dia	Normal	54,21	52,61	48,46	51,76	B	
	Obesos	62,45	59,78	59,10	60,44	A	
	Médias	58,33	a 56,20 ab	53,78	b		

Letras minúsculas comparam média na linha (tratamento principal, fontes de cromo) e, letras maiúsculas comparam médias na coluna (tratamento secundário, condição corporal) pelo teste SNK ($p < 0,05$). TC=ração controle; TI= ração com adição de cromo inorgânico; TO= ração com adição de cromo orgânico.

Fonte: Santos [71]

Tabela 3: Consumo de ração expresso em gramas/animal.dia⁻¹ de camundongos Swiss normais ou obesos, suplementados com diferentes fontes de cromo.

Períodos	Peso	Suplementação/Tratamentos					Médias
		TC	TI	TO			
0 - 14 ^o dia	Normal	4,96	5,58	5,94	5,49	A	
	Obesos	4,63	4,65	6,06	5,12	A	
	Médias	4,80	b 5,12 ab	6,00	a		
14 ^o - 28 ^o dia	Normal	6,52	6,96	6,48	6,65	A	
	Obesos	5,66	5,60	6,54	5,93	A	
	Médias	6,09	a 6,28 a	6,51	a		
28 ^o - 42 ^o dia	Normal	6,38	6,20	5,80	6,12	A	
	Obesos	5,94	5,29	6,05	5,76	A	
	Médias	6,16	a 5,75 a	5,92	a		

Letras minúsculas comparam média na linha (tratamento principal, fontes de cromo) e, letras maiúsculas comparam médias na coluna (tratamento secundário, condição corporal) pelo teste SNK ($p < 0,05$). TC=ração controle; TI= ração com adição de cromo inorgânico; TO= ração com adição de cromo orgânico.

Fonte: Santos [71]

Segundo Santos [71], no consumo de ração não foram observados efeito de interação entre a condição corpórea e a suplementação de diferentes fontes de cromo. Houve efeito significativo, somente para o primeiro período de amostragem, das fontes de suplementação de cromo, em que, os animais suplementados com cromo orgânico apresentaram consumo de ração superior aos do tratamento controle. A condição corpórea não influenciou o consumo de ração, expresso em g/animal dia⁻¹.

2.2 Coleta de sangue

Ao final do período experimental, no 42º dia de suplementação, os camundongos foram insensibilizados utilizando anestesia inalatória com isoflurano, em seguida, foi realizada coleta de sangue por punção cardíaca para determinação dos parâmetros hematológicos, utilizando seringas de 1 mL heparinizadas.

No procedimento de anestesia foi utilizado o isoflurano, adicionado em algodão estéril e alocado na câmara de inalação de forma isolada, evitando o contato direto com o produto. Neste método, a quantidade precisa de anestésico oferecida ao animal não é conhecida e o plano anestésico do animal deve ser observado através da câmara de inalação. Se houver reflexo presente, ou seja, se o animal responder a estímulos, a anestesia não está no plano anestésico adequado para a intervenção cirúrgica. Confirmado que o plano anestésico foi efetivado, foi realizado a exsanguinação por punção cardíaca, imediatamente após a insensibilização e antes do animal restabelecer a consciência. A confirmação de morte do animal foi realizada pela ausência de movimento respiratório (apneia) e ausência de batimentos cardíacos (assistolia).

2.3 Análise hematológica

Utilizando-se um analisador automatizado hematológico (contador hematológico veterinário), foram avaliados os parâmetros: contagem de células vermelhas (RBC), hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), contagem de células brancas do sangue (WBC) e plaquetas. A

diferenciação da série branca (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos) foi realizada por esfregação de sangue em lâminas.

2.4 Análise estatística

Os resultados obtidos foram representados pela média e a comparação entre elas realizada por teste estatístico Student-Newman-Keuls (SNK) e análise de variância (ANOVA). Foi considerado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção os resultados atingidos após aplicação da condução experimental são apresentados, bem como a discussão desses, relacionando-os com trabalhos encontrados na literatura. Iniciam-se com os resultados obtidos na série vermelha em seguida os resultados da série branca.

3.1 Hematologia série vermelha

Os resultados dos parâmetros hematológicos da série vermelha (hematócrito, hemoglobina e eritrócitos) divididos pelos grupos experimentais (não obesos e obesos) bem como divididos pelo tipo de suplementação fornecida (ração controle, ração com adição de cromo inorgânico e ração com adição de cromo orgânico) e os valores das médias estão expostos na Tabela 4.

Tabela 4: Parâmetros hematológicos da série vermelha de camundongos Swiss não obesos e obesos, suplementados com diferentes fontes de cromo.

Grupos experimentais	Suplementação			Médias
	TC	TI	TO	
Hematócrito (%)				
Não obesos	47,86	49,53	47,46	48,28
Obesos	50,66	52,26	49,06	50,66
Médias	49,26	50,89	48,26	
Hemoglobina (g/dL)				
Não obesos	14,17	15,36	15,00	14,84
Obesos	15,57	15,97	15,26	15,60
Médias	14,87	15,66	15,13	
Eritrócitos (10⁶/mm³)				
Não obesos	8,33	9,73	10,23	9,43
Obesos	10,40	9,67	9,14	9,73
Médias	9,36	9,70	9,68	

TC=ração controle; TI= ração com adição de cromo inorgânico (cloreto de cromo); TO= ração com adição de cromo orgânico (cromo complexado com metionina). Hematócrito, expresso em porcentagem (%); Hemoglobina, expressa em gramas por decilitro (g/dL); Eritrócitos, expresso em (10⁶/mm³).

Fonte: Elaborada pela autora.

Os valores de hematócrito não foram influenciados pelas fontes de cromo ou pela condição corporal. As médias do percentual de hematócrito pelo tipo de suplementação foram de 49,26% para ração controle, 50,89% para ração com

adição de cromo inorgânico e 48,26% para a suplementação com adição de cromo orgânico na ração. Por sua vez, a média dos grupos experimentais dependendo da suplementação realizada foi de 48,28% para o grupo de animais não obesos e 50,66% para o grupo considerado obeso.

Os valores do hematócrito obtidos no presente trabalho estão coerentes com os encontrados em camundongos Swiss, entre 42 a 47% [72, 73]. Fisiologicamente, a elevação do hematócrito acima dos índices considerados normais para a espécie, sugere um quadro de desidratação, enquanto índices abaixo dos fisiológicos referem-se à anemia [59].

Não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) nos valores de hemoglobina. Considerando o fator suplementação, as diferenças entre as médias foram de 5,31% para suplementação com ração contendo cromo inorgânico e 1,74% para suplementação com adição de cromo orgânico em relação ao grupo controle.

Os resultados de hemoglobina encontrados nesta pesquisa corroboram com dados publicados obtidos para camundongos Swiss, que variaram de 12,9 a 15,1 g/dl [72, 73]. A hemoglobina desempenha a importante missão de realizar o transporte de oxigênio e a sua diminuição é um indicativo de anemia [59].

Os valores médios de eritrócito não apresentaram diferença estatística significativa entre as distintas fontes de cromo ou condição corporal ($p > 0,05$). Os valores de eritrócitos se apresentaram dentro dos limites normais para a espécie, de $7,75$ a $9,3 \times 10^6/\text{mm}^3$ [72].

Um elevado índice de massa corporal é considerado um forte fator de risco para o estabelecimento de doença renal crônica porque em indivíduos obesos ocorre uma hiperfiltração compensatória para atender a demanda metabólica do aumento de peso corporal. É comum ocorrer decréscimo na síntese de eritrócitos em animais com doenças renais como consequência da produção ineficiente de eritropoietina, hormônio secretado pelas células justaglomerulares em resposta a hipóxia [74].

Foi observada uma divergência em relação aos valores de referência apresentadas por outros autores, no entanto, é importante salientar que não há valores hematológicos de referência exatos descritos para camundongos Swiss [73].

Os valores dos parâmetros hematológicos para o Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) e Plaquetas (PLT) estão expostos na Tabela 5.

Tabela 5: Parâmetros hematológicos de camundongos Swiss não obesos e obesos, suplementados com diferentes fontes de cromo.

Grupos experimentais	Suplementação			Médias
	TC	TI	TO	
VCM (fl)				
Não obeso	53,40	50,90	52,30	52,20
Obesos	53,50	54,20	53,70	53,70
Médias	53,50	52,50	53,00	
HCM (pg)				
Não obeso	17,00	15,80	16,60	16,50
Obesos	16,50	16,60	16,70	16,60
Médias	16,80	16,20	16,70	
CHCM (g/dL)				
Não obeso	31,80	31,10	31,70	31,50
Obesos	30,90	30,60	31,20	30,90
Médias	31,40	30,80	31,50	
Plaquetas (10³/μL)				
Não obeso	1642,00	1243,00	1322,00	1402,00
Obesos	1419,00	1428,00	1055,00	1300,00
Médias	1530,00	1335,00	1188,00	

TC=ração controle; TI= ração com adição de cromo inorgânico (cloreto de cromo); TO= ração com adição de cromo orgânico (cromo complexado com metionina). Volume corpuscular médio (VCM), expresso em fentolitros (fl); Hemoglobina corpuscular média (HCM), expresso em picogramas (pg); Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), expresso em gramas por decilitro (g/dL); Plaquetas (PLT), expressa em dez ao cubo por microlitro (10³/μL).

Fonte: Elaborada pela autora.

Os parâmetros hematológicos para Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) e Plaquetas (PLT) observados neste estudo, encontram-se dentro dos valores de referência para a espécie [72,73]. Os valores médios das amostras de sangue não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes fontes de suplementação e condição corpórea ($p > 0,05$).

As características hematológicas da série vermelha não sofreram variações marcantes de acordo com a suplementação de cromo ou da condição corporal.

As obras existentes revelam que o cromo não intervém no volume globular médio (VGM), tampouco nos níveis de hemoglobina, estes estudos corroboram com os achados encontrados neste trabalho para os índices relacionados à série vermelha do sangue [75, 76].

3.2 Hematologia série branca

Os parâmetros hematológicos da série branca, com exceção dos monócitos, foram modulados pela interação entre os fatores avaliados (suplementação e condição corporal). Os valores dos parâmetros hematológicos para a série branca do sangue estão expostos na Tabela 6.

Tabela 6: Parâmetros hematológicos da série branca de camundongos Swiss senis não obesos e obesos, suplementados com diferentes fontes de cromo.

Grupos experimentais	Suplementação						Médias
	TC		TI		TO		
Leucócitos (células/mm³)							
Não obeso	2933,3	a A	4114,7	a A	3333,3	a A	3460,7
Obesos	6322,0	b A	3903,3	a AB	3756,7	a B	4660,7
Médias	4627,7		4009,0		3545,0		
Eosinófilos (células/mm³)							
Não obeso	58,0	a A	54,1	a A	33,3	b A	48,5
Obesos	63,2	a B	39,0	a B	112,7	a A	71,6
Médias	60,6		46,6		73,0		
Neutrófilos (células/mm³)							
Não obeso	831,3	a A	600,3	a A	733,3	a A	721,7
Obesos	1003,8	a A	912,7	a A	405,6	a B	774,0
Médias	912,6		756,5		569,5		
Linfócitos (células/mm³)							
Não obeso	2201,7	a A	3230,0	a A	2479,0	a A	2636,9
Obesos	4521,0	b A	3099,3	a B	3022,2	a B	3547,5
Médias	3361,4		3164,7		2750,6		
Monócitos (células/mm³)							
Não obeso	66,8		68,2		61,7		61,7
Obesos	63,2		117,1		91,2		91,2
Médias	64,9		92,6		76,5		76,5

TC=ração controle; TI= ração com adição de cromo Inorgânico (cloreto de cromo); TO= ração com adição de cromo orgânico (cromo complexado com metionina). Letras minúsculas comparam média na coluna e maiúsculas na linha (fontes de suplementação) pelo teste de SNK ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

Entre os animais não suplementados com cromo, a obesidade promoveu aumento nos leucócitos e, com a inclusão de cromo na dieta (inorgânico ou orgânico) tais efeitos foram amenizados não havendo diferença estatística entre as fontes de cromo avaliadas.

Nos animais não obesos, a suplementação não influenciou significativamente os resultados de leucócitos, no entanto, entre os animais obesos somente a suplementação com cromo orgânico reduziu significativamente o número de leucócitos ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle, sendo a diferença de valores de 40%.

Segundo Latimer e Meyer [77], os leucócitos participam na defesa do hospedeiro contra os patógenos e na vigilância e remoção dos antígenos não próprios. Em animais obesos, os níveis de leucócitos apresentam-se aumentados em virtude de o tecido adiposo ser um expressivo local de síntese e liberação de adipocinas, uma proteína de baixo peso molecular que participa da inflamação e resposta do sistema imune através do recrutamento de leucócitos [61]. Este fato deixa subtendido que indivíduos obesos podem apresentar alterações nesta fração sanguínea.

Em relação aos eosinófilos, a suplementação com cromo não promoveu diferenças estatísticas no grupo de animais não obesos, por sua vez, a incorporação do cromo orgânico na suplementação dos animais obesos levou a um aumento significativo do número eosinófilos ($p < 0,05$). A diferença estabelecida foi de 43%.

O eosinófilo é a principal célula efetora em infecções helmínticas, alérgicas e virais, eles desempenham várias funções como a produção de citocinas e quimiocinas resultando em uma exacerbação da resposta inflamatória [78]. No entanto, o mecanismo de ação do cromo sobre os eosinófilos é desconhecido, mas há vários trabalhos sobre os efeitos do cromo dietético sobre a imunidade celular [16, 75, 76].

Para a variável neutrófilos, a suplementação com cromo não apresentou diferença significativa para o grupo de animais não obesos. Entretanto, os animais obesos que receberam ração contendo a fonte de cromo orgânico apresentaram uma redução de 59,59% ($p < 0,05$) do número de neutrófilos quando comparado aos animais submetidos à ração controle.

Quando ocorre o processo inflamatório, os neutrófilos rapidamente chegam aos sítios inflamatórios e englobam partículas estranhas, que sofrem ação de enzimas com objetivo de neutralizar o antígeno [78]. A obesidade tem sido considerada um processo de inflamação crônica caracterizada por infiltrações de células pró-inflamatórias [79]. Neste trabalho, a suplementação com ração contendo cromo metionina (TO) em camundongos obesos sugere que esta fonte promove

redução do processo inflamatório. Tem sido sugerido que a elevação na contagem de glóbulos brancos possui relação com aumento de risco da doença cardiovascular e este efeito está provavelmente relacionado à liberação de enzimas proteolíticas por monócitos e neutrófilos, além disso, essas células têm sido associadas à aterosclerose [80, 81].

Os linfócitos desempenham funções variadas no organismo, e todas elas são de grande importância para o sistema imune. Estas células dividem-se em linfócitos T, linfócitos B e linfócitos NK (Natural Killers), estando o linfócito T incumbido em auxiliar o sistema imunitário e resposta imunitária celular, já o linfócito B é encarregado pela resposta imunitária humoral e os linfócitos NK responsáveis pela resposta imunitária inespecífica [60].

O tecido adiposo produz proteínas associadas ao sistema imune como: TNF- α (fator de necrose tumoral, IL (interleucina) 6, adiponectina e leptina. Na obesidade a produção de TNF- α , IL-6 e IL-1 β encontra-se bastante aumentada no tecido adiposo branco demandando maior resposta imunitária e conseqüentemente aumento dos linfócitos [82].

Os linfócitos apresentaram comportamento semelhante aos demais parâmetros da série branca para os animais não obesos quando submetidos às distintas fontes de suplementação, não apresentando diferença significativa com a adição do cromo à dieta, independente da fonte. Nos animais obesos, a incorporação de cromo inorgânico reduziu em 31,44% os linfócitos e a incorporação de cromo orgânico reduziu em 33,15%, não existindo diferença significativa entre as duas fontes avaliadas ($P > 0,05$). Os monócitos não foram influenciados pelos tratamentos avaliados ($P > 0,05$).

Brown Júnior et al. [83] em seu trabalho realizado com ruminantes, reforçam a hipótese que o mineral cromo age positivamente na resposta imune, havendo assim um aumento de anticorpos e intensificando a função linfocitária. No entanto, neste trabalho os resultados encontrados em animais obesos apontam que a utilização de cromo na suplementação provoca uma diminuição na resposta linfocitária.

O cromo aparentemente atua na inibição do TNF- α , assim como na diminuição a insensibilidade à insulina em pacientes diabéticos [66]. Dessa maneira, o cromo atua na redução dos leucócitos em animais obesos, uma vez que promove a inibição de um fator pró-inflamatório secretado pelos adipócitos.

4 CONCLUSÃO

A suplementação com cromo e a obesidade não afetam os parâmetros hematológicos da série vermelha. Em relação à série branca a suplementação com cromo foi alterada somente no grupo de animais obesos no que se refere aos eosinófilos, neutrófilos e linfócitos. A fonte orgânica apresenta resultado superior na redução de monócitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dicas de saúde. O que é o Crômio? [Internet]. 2017 [Acesso em 2017 Set 03]. Disponível em: <http://dicasdesaude.eco.br/o-que-e-o-cromio/>.
2. Food Ingredients Brasil. Dossiê: Os minerais na Alimentação. Revista Fi [internet]. 2008 [Acesso em 2017 Set 10]; (4). Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/52.pdf>.
3. Gomes M, Rogerio M, Tiragegui M. Considerações sobre cromo, insulina e exercício físico. Rev Bras Med Esporte. 2005; 11(5): 262-266.
4. Maletto S. Absorção e interferência dos elementos minerais no organismo animal - microelementos: Importância na sanidade. In: I Simpósio sobre Nutrição Mineral. São Paulo: SNIDA; 1984. 9-18p.
5. Barceloux DG. Chromium. J Toxicol Clin Toxicol. 1999; 37(2):173–194.
6. Sussulini A, Arruda MAZ. Determinação de cromo (VI) por espectrometria de absorção atômica com chama após a extração e pré-concentração no ponto nuvem. Ecl Quím [Internet]. 2006 [Acesso em 2017 Ago 11]; 31(1): 73-80. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/%0D/eq/v31n1/29332.pdf>.
7. Lourenço LM. Estudo espectrofotométrico do sistema crômio (III) / azoteto e seu aproveitamento analítico. Dissertação (Mestrado). Ribeirão Preto (SP): Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto; 2003. 113 p.
8. Mitchell HS, Rynbergen HJ, Anderson L, Dibble MV. Nutrição. 16a. ed. Rio de Janeiro: Interamericana; 1978. 71 p.
9. Mertz WE. Chromium occurrence and function in biological systems. Physiology Reviews [Internet]. 1969 [Acesso em 2017 Set 01]; 49(2): 163- 239. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4888391>.
10. Khosravi-Boroujeni H, Rostami A, Ravanshad S, Esmailzadeh A. Favorable effects on metabolic risk factors were observed with a daily intake of brewer's yeast in type 2 diabetic patients with hypercholesterolemia: a semi-experimental study. Journal of Diabetes. Richmond, 2011.
11. Mertz W, Schwarz K. A glucose tolerance factor and its differentiation from factor 3. Arch Biochem Biophys. 1957; 72(2): 515-518.

12. Gomes MR, Rogero MM, Tirapegui J. Considerações sobre cromo, insulina e exercício físico. Rev Bras Med Esporte [Internet]. 2005 [Acesso em 2017 Set 03]; 11(5). Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Julio_Tirapegui/publication/253639511_Consideracoes_sobre_cromo_insulina_e_exercicio_fisico/links/00463530ddcd501982000000/Consideracoes-sobre-cromo-insulina-e-exercicio-fisico.pdf.
13. Anderson RA. Chromium, History and nutritional importance. Biol Trace Elem Res. 1988; 32(3): 409-421.
14. Kaats GR, Blum K, Pullin D, Keith SC, Wood R. A randomized, double-masked, placebo-controlled study of the effects of chromium picolinate supplementation on body composition: a replication and extension of a previous study. Curr Ther Res. 1988; 59 (Issue 6): 379-388.
15. Okada S, Tsukada H, Ohba H. Enhancement of nucleolar RNA synthesis by chromium (III) in regenerating rat liver. J Inorg Biochem. 1984; 21: 113-124.
16. Mowat DN. Organic chromium in animal nutrition. Chromium books: Guelph, Ontario; 1997. 258 p.
17. Phama Nostra. Picolinato de Cromo: Informativo Técnico [Internet]. 2017 [Acesso em 2017 Set 10]. Disponível em: [https://www.farmacibiotipo.com.br/img/produtos/arquivos/Picolinato%20de%20Cromo\(2\).pdf](https://www.farmacibiotipo.com.br/img/produtos/arquivos/Picolinato%20de%20Cromo(2).pdf).
18. Pasmam WJ, Westerterp-Plantenga MS, Saris WHM. The effectiveness of long-term supplementations of carbohydrate, chromium, fibre and caffeine on weight maintenance. Int J Obes. 1997; 21 (12): 1143-1151.
19. IDF Diabetes Atlas. International Diabetes Federation. 6th Ed. Brussels, Belgium; 2013.
20. Evans JL. Antioxidants: do they have a role in the treatment of insulin resistance? Indian J Med Res [Internet]. 2007 [Acesso em 2017 Ago 29]; 125(3): 355-72. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17496361>.
21. Yang X, Li SY, Dong F, Ren J, Sreejayan N. Insulin-sensitizing and cholesterol-lowering effects of chromium (D-Phenylalanine). J Inorg Biochem [Internet]. 2006 [Acesso em 2017 Ago 28]; 100(7):1187-93. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16545457>.
22. Jain SK, Rains JL, Croad JL. High glucose and ketosis (acetoacetate) increases, and chromium niacinate decreases, IL-6, IL-8, and MCP-1 secretion and oxidative stress in U937 monocytes. Antioxid Redox Signal [Internet]. 2007 [Acesso em 2017 Set 01]; 9(10): 1581-90. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17665966>.

23. Morris BW, Kouta S, Robinson R, MacNeil S, Heller S. Chromium Supplementations improves insulin resistance in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine*. 2000; 17: 684-686.
24. Hayirli A, Bremmer DR, Bertics SJ, Socha MT, Grummer RR. Effects of chromium supplementation on production and metabolic parameters in periparturient dairy cow. *J Dairy Sci*, Champaign. 2001; 84: 1218-1230.
25. Pimentel GD, Zemdegs JCS, Sachs A. Fibras Alimentares previnem o Diabetes Mellitus tipo 2. *Rev Nutrição em Pauta*, 2009.
26. Anguiano A, Gascón M, Cruz A. Evidencias del efecto del cromo en personas con diabetes: revisión sistemática. *Rev Biomed*. 2007; 18(2):117-126.
27. Jaramillo R. Importância del cromo em el organismo de personas com diabetes tipo II. *Rev Tec Univ Bolivia*. 2007; 5(5):5.
28. Brasil. Ministério da saúde. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Normas para Níveis de Dosagens de Vitaminas e Minerais em Medicamentos. [Internet]. Portaria nº 40 de 13 de janeiro de 1998 [Acesso em 2017 Fev 27]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portaria/40_98.htm.
29. Lau FC, Bagchi M, Sen CK. Nutrigenomic basis of beneficial effects of chromium on obesity and diabetes. *Mol Cell Biochem*. 2008; 317(1-2):1-10.
30. Patti M, Kahn C. The Insulin Receptor - A Critical Link in Glucose Homeostasis and Insulin Action. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 1998; 9(2-4).
31. White M. The IRS-1 Signaling System. *Curr Opin Genet Dev*. 1994; 4(1):47-54.
32. Hotamisligil G, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White M, Spiegelman B. IRS-1-Mediated Inhibition of Insulin Receptor Tyrosine Kinase Activity in TNF-alpha and Obesity-Induced Insulin Resistance. *Scienc*. 1996; 271(5249): 665-670.
33. Carvalheira J, Ribeiro E, Araujo E, Guimarães R, Telles M, Torsoni M. Selective impairment of insulin signalling in the hypothalamus of obese Zucker rats. *Diabetologia*. 2003; 46(12):1629-1640.
34. Himsworth HP, Kerr RB. Insulin-sensitive and insulin-insensitive types of diabetes mellitus. *Clin Sci*. 1939; 4:119-52.
35. Carvalheira JBC, Saad MJA. Doenças associadas à resistência à insulina/hiperinsulinemia, não incluídas na síndrome metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006; 50(2):360-7.

36. Taylor SI, Accili D, Imai Y. Insulin resistance or insulin deficiency: which is the primary cause of NIDDM? *Diabetes*. 1994; 43(6): 735-40.
37. Mwititi Kibiti C, Jide Afolayan A. The Biochemical Role of Macro and Micro-Minerals in the Management of Diabetes Mellitus and its Associated Complications: A Review. *Int J Vitam Nutr Res*. 2015; 85 (1-2):88-103.
38. Pires KA. Efeitos de Diferentes Fontes e Concentrações de Cromo Sobre Aspectos Metabólicos e Desempenho em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Mestrado. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2010. 51p.
39. Vincent JB. The biochemistry of chromium. *J Nutr*. 2000; 130(4):715-8.
40. Yamamoto A, Wada O, Manabe S. Evidence that chromium is an essential factor for biological activity of low-molecular-weight chromium-binding substance. *Bio-chem Biophys Res Commun*. 1989; 163:189-93.
41. Marangon AFC, Fernandes LGM. O uso do picolinato de cromo como coadjuvante no tratamento da diabetes mellitus. *Universidade ciências da saúde*. 2005; 3(2): 253-260.
42. Evans G, Bowman TD. Chromium picolinate increases membrane fluidity and rate of insulin internalization. *J. Inorg. Biochem*. 2002; 6:243-250.
43. Vincent JB. Mechanisms of chromium action: low-molecular-weight chromium - binding substance. *J Am Coll Nutr*. 1999; 18:6-12.
44. Cavalleira JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de sinalização de insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2002; 46 (4): 419 - 425.
45. Sun Y, Ramirez J, Woski AS, Vincent JB. The binding of trivalent chromium to low-molecular-weight, chromium binding substance (LMW Cr) and the transfer of chromium from transferrin and chromium picolinate to LMW Cr. *J Biol Inorg Chem*. 2005; 5 (1):129-36.
46. Kobla HV, Volpe SI. Chromium, exercise, and body composition. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2000; 40(4): 291-308.
47. Hopkins LL JR. Distribution in the rat of physiological amounts of injected ^{51}Cr (III) with time. *Am J Physiol*. 1965; 209:731-5.
48. Hepburn DDD, Vincent JB. In vivo distribution of chromium from chromium picolinate in rats and implications for the safety of the dietary supplement. *Chem Res Toxicol*. 2002; 15: 93-100.

49. National Research Council. Mineral tolerance of animals. 1st ed. Washington, D.C.: National Academies Press; 2005. 495 p.
50. Morais SS. Novos microelementos minerais e minerais quelatados na nutrição de bovinos. Documentos 119. Campo Grande: Embrapa; 2001. 11p.
51. Shah BG. Chelating agents and bioavailability of minerals. *Nutr Res.* 1981; 1 (6): 617-622.
52. Mello CA. O que há de novo na mineralização. *Leite Brasil.* 1998; 1(6): 8-14.
53. Erdman JW. Factors that limit or enhance bioavailability of minerals from food. *Nutr and the M.* 1983; 9(2): 1-2.
54. Gibson RS. Principles of nutrition assessment. New York: Oxford University Press; 1990.
55. Hopkins LL. Distribution in the ratio of physiological amounts of injected Cr (III) with time. *Am J Physiol.* 1965; 209:731-5.
56. Chen NSC, Tasi A, Dyer IA. Effect of chelating agents on chromium absorption in rats. *J Nutr, Bethesda.* 1973; 103: 1182-1186.
57. Feldman BF, Zinkl JG, Jain N. *Schalman's Veterinary Hematology*, 50.ed. Philadelphia: Ed. Lippincott Williams and Wilkins; 2000. 1221p.
58. Viana RB, Birgel Junior EH, Ayres MCC. Influência da gestação e do puerpério sobre o leucograma de caprinos da raça Saanen, criados no Estado de São Paulo. *Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science.* 2002; 39:196-201.
59. GARCIA-NAVARRO, Carlos Eugenio Kantek. *Manual de hematologia veterinária.* 2.ed. São Paulo: Varela; 2005. 206 p.
60. Messoria LB. Influência dos níveis plasmáticos de lipoproteínas de alta densidade na inflamação cardiovascular, na resistência insulínica e no hemograma de camundongos knockout para o gene de receptor de LDL. Dissertação (Mestrado). Alfenas (MG): Universidade José do Rosário Villano; 2010. 71p.
61. Clarkson PM. Effects of exercise on chromium levels: Is supplementation required. *Sports Med.* 1997; 23(6):341-349.
62. De Fronzo RA. Glucose intolerance of aging. Evidence for tissue insensitivity to insulin. *Diabetes.* 1979; 28(12): 1095–1101.

63. Wellen K, Hotamisligil G. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*. 2005; 115(5):1111-1119.
64. Shoelson S, Herrero L, Naaz A. Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance. *Gastroenterology*. 2007; 132(6): 2169-2180.
65. Scherer PE. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes*. 2006; 55(6):1537–1545.
66. Kadowaki T. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2006; 116(7):1784-1792.
67. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*. 2004; 145 (5): 2273–2282.
68. Jain SK, Kannan K. Chromium chloride inhibits oxidative stress and TNF- α secretion caused by exposure to high glucose in cultured monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 289: 687-691.
69. Jain S, Lim G. Chromium Chloride Inhibits TNF α and IL-6 Secretion in Isolated Human Blood Mononuclear Cells Exposed to High Glucose. *Horm Metab Res*. 2006; 38(1):60-62.
70. Ullman-Culleré MJ, Foltz C. Body Condition Scoring: A Rapid and Accurate Method for Assessing Health Status in Mice. *Laboratory Animal Science*. 1999; 49(3):319-323.
71. Santos JRRIS. Complexo Cromo Metionina como agente hipoglicemiante em camundongos Swiss obesos. Dissertação (Mestrado). Descalvado (SP): Universidade Brasil; 2016. 40 p.
72. Araújo FTM, Teixeira ACP, Araújo MSS, Silva CH, Negrão-Corrêa DA, Martins-Filho OA, Peruhype-Magalhães V, Teixeira-Carvalho A. Establishment of reference values for hematological and biochemical parameters of mice strains produced in the animal facility at centro de pesquisas René Rachou/Fiocruz. *RESBCAL*. 2015; 3(2):95-102.
73. Castelo Branco ACS, Diniz MFFM, Almeida RN, Santos HB, Oliveira KM, Ramalho JA, Dantas JG. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos Wistar e camundongos Swiss do biotério Professor Thomas George. *RBCS*. 2011;15 (8):209-214.
74. Pinto-Sietsma S, Navis G, Janssen W, de Zeeuw D, Gans R, de Jong P. A central body fat distribution is related to renal function impairment, even in lean subjects. *American Journal of Kidney Diseases*. 2003; 41(4): 733-741.

75. Kegley E, Spears J, Brown T. Effect of shipping and chromium supplementation on performance, immune response, and disease resistance of steers. *Journal of Animal Science*. 1997;75(7):1956.
76. Arthington J, Corah L, Minton J, Elsasser T, Blecha F. Supplemental dietary chromium does not influence ACTH, cortisol, or immune responses in young calves inoculated with bovine herpesvirus-1. *Journal of Animal Science*. 1997; 75(1): 217-223.
77. Latimer K.S, Meyer D.J. Os leucócitos na saúde e na moléstia. In: ETTINGER, S.J. *Tratado de medicina Interna Veterinária*. 3. ed. São Paulo: Manole; 1992. p. 2616-2664.
78. Rodrigues GSC. Papel da imunidade na imunomodulação da infecção experimental por *Mycobacterium bovis* BCG. Dissertação (Mestrado). Juiz de Fora (MG): Universidade Federal de Juiz de Fora; 2014. 72p.
79. Tanaka A, Nomura Y, Matsuda A, Ohmori K, Matsuda H. Mast cells function as an alternative modulator of adipogenesis through 15-deoxy-delta-12, 14-prostaglandin J2. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011; 301(6): C1360-7.
80. Brost SE. The role of TNF- alpha in insulin resistance. *Endocrine*. 2004; 23(2-3):177-82. Review.
81. Madjid M, Fatemi O. Component of the complete blood count as risk predictors for coronary heart disease: in-depth review and update. *Tex Heart Inst J*. 2013; 40(1): 17-29.
82. Milner JJ, Beck MA. The impact of obesity on the immune response to infection. *Proc Nutr Soc*. 2012; 71(2): 298-306.
83. Bowman J, Sowell B. Delivery method and supplement consumption by grazing ruminants: a review. *Journal of Animal Science*. 1997; 75(2): 543.