UNIVERSIDADE BRASIL
CURSO DE AGRONOMIA

CROMO METIONINA SUPLEMENTAR EM CAMUNDONGOS SWISS OBESOS: MASSA CORPÓREA E COLESTEROL TOTAL

CHROMO METIONINA SUPPLEMENTARY TO SWISS OBESOS MOLLUSS: TOTAL CORPSEUM AND TOTAL CHOLESTEROL

Lucas Taconelli Franchin

Descalvado, 2016

Lucas Taconelli Franchin

CROMO METIONINA SUPLEMENTAR EM CAMUNDONGOS SWISS OBESOS: MASSA CORPÓREA E COLESTEROL TOTAL

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Mauricio Peruca Melo

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

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Banca Examinadora, como parte das exigências da matriz curricular do curso de graduação em Engenharia Agronômica da Universidade Camilo Castelo Branco (Unicastelo) - Campus de Descalvado - SP

Descalvado, 2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Dedico este trabalho ao meu filho Yuri e a minha esposa Aline, pelo apoio incondicional e incentivo constante.

Dedico também ao meu orientador professor Dr. Gabriel Maurício Peruca de Melo, pela confiança, paciência, incentivo e apoio moral.

Aos meus amigos que fizeram parte desses momentos, sempre ajudando e incentivando.

A todos os colegas e professores pelo convívio e aprendizado.

A Deus por me dar saúde e paz durante a realização desse trabalho.
Ao meu orientador por toda dedicação e paciência durante esse período de trabalho.
A minha família por estar sempre ao me lado

Sumário

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS……VII
LISTA DE TABELAS……VIII
LISTA DE FIGURAS……IX
RESUMO……X
ABSTRAT……
1. INTRODUÇÂO 12
1.1. Relevância do tema 12
1.2. Fundamentação 13
1.2.1. Diabetes *mellitus* 13
1.2.2. Insulina 15
1.2.3. Cromo 16
1.2.3.1. Mecanismo de ação do cromo…… 19
1.2.3.2. Biodisponibilidade dos quelatos…… 21
1.3. Hipótese 22
1.4. Objetivo geral e objetivos específicos 22
2. MATERIAIS E MÉTODOS 23
2.1. Local de condução 23
2.2. Unidades experimentais e manejo 23
2.3. Delineamento experimental 25
2.4. Complexo Cromo 25
2.5. Duração experimental 27
2.6. Manejo semanal 27
2.7. Pesagem dos animais e consumo de ração 27
2.8. Colesterol total 27
3. RESULTADOS E DISCUÇÃO 28
3.1. Peso corpóreo 28
3.2. Consumo de ração 29
3.3. Colesterol total 30
4. CONCLUSÃO 31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 32

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

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição bromatológica das rações utilizadas no experimento. Dados expressos na matéria seca..... 26

Tabela 2: Peso vivo corpóreo, expresso em gramas, de camundongos swiss, normais ou obesos, suplementados com diferentes fontes de cromo..... 28

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: Colesterol sérico total, expresso em mg/dL, de camundongos swiss, normais ou obesos, suplementados com diferentes fontes de cromo em amostra obtida após 6 semanas de suplementação..... 30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo proposto da participação do cromo na ação da insulina..... 20

Figura 2: Na parte superior, animal representativo do tratamento obeso e, na parte inferior, animal considerado como peso normal (BC 3,5)..... 24

Figura 3: Ilustração do cronograma de execução do experimento com os principais marcos..... 24

Figura 4: Características dos pellets de rações (TC, TI e TO) utilizados. Da esquerda para a direita observa-se a ração controle (TC), ração contendo 100 mg/kg MS de cromo inorgânico (TI) e ração contendo 100 mg/kg MS de cromo orgânico (TO)..... 26

RESUMO

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema de análise fatorial, com 3 tratamentos principais e 2 tratamentos secundários, sendo cada tratamento composto por 6 unidades experimentais. Foram utilizados 36 camundongos Swiss senis, divididos em 6 tratamentos. Os tratamentos principais avaliados foram: **TC** (tratamento controle – ração comercial); **TI** (cromo na forma de cloreto cromo - 100 $mg.kg^{-1}$ ração); **TO** (cromo orgânico complexado com metionina – 100 $mg.kg^{-1}$ ração). 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 de7g/dia). 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), 1 semana para adaptação a dieta e 6 semanas de avaliação experimental. O peso dos animais e o consumo de ração foram determinados semanalmente e os resultados expostos em intervalos de 14 dias. Na determinação do colesterol total, no 42º dia de suplementação, os animais foram mantidos em jejum prévio de 3 horas através de punção da veia caudal lateral. Os efeitos da suplementação com cromo não foram influenciados pela obesidade. A obesidade promoveu concentrações séricas superiores de colesterol total nos camundongos Swiss ao término do experimento. A suplementação com complexo cromo/metionina não alterou a concentração sérica de colesterol total, no entanto, esta fonte promoveu redução no peso corpórea a partir do 28º dia de suplementação sem alterar o consumo de ração. A forma orgânica mostrou-se mais eficiente que a inorgânica para redução de peso corpóreo.

Palavras-chave: músculo, complexo, diabetes.

ABSTRACT

The experimental design, used in this study, was completely randomized, in a factor analysis scheme, there was three main treatments and two treatments secondary, each one had six experimental units. thirty-six senile swiss mice were used in this study, they were distributed in six treatments. The main treatments evaluated was: TC (control group - received commercial ration); TI (chromium as chromium chloride-100 mg. kg-1 ration); TO (organic chromium-methionine – 100 mg. kg-1 ration). The levels of chromium inclusion in the diet were established to obtain an average daily consumption of 0.5 to 0.7 mg/kg-1 (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. The weight of the animals and the ration consumption were measured weekly, and the results were demonstrated in an interval of fourteen days. The level of glycaemia was determined on the forty-second day of supplementation, the animals were kept fasting for 3 hours, the puncture was realized on the lateral tail vein using a glucometer. The effects of supplementation with chromium were not influenced by the obesity. Obesity promoted higher serum concentrations of total cholesterol in Swiss mice at the end of the experiment. Supplementation with chromium / methionine complex did not affect serum concentrations of total cholesterol, however, this source decreased the body weight from the 28th day of supplementation without changing the feed intake. The organic form was more efficient than inorganic to reduce body weight.

Keywords: muscle, complex, diabetes.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Relevância do tema

É de extrema necessidade o estudo da suplementação da dieta com cromo, pois é preciso obter com exata precisão os efeitos da suplementação deste elemento, onde ainda existe uma escassez de dados.

A suplementação de cromo na forma de sal inorgânico não é uma técnica eficiente, assim aconselha-se utilizá-lo na forma de quelatos ou complexos. Evidências científicas apontam que a sua deficiência na dieta contribui para a intolerância à glicose e alterações relacionadas ao perfil lipídico. Isto se explica porque a função primária do cromo é a de potencializar os efeitos da insulina, com melhora da tolerância à glicose e, consequentemente, do metabolismo de carboidratos e lipídios (GOMES et al., 2006).

O presente trabalho fornecerá informações sobre os efeitos da suplementação do cromo complexado com a metionina em fêmeas de camundongos Swiss senis normais e obesas, com o intuito de avaliar os efeitos sobre o peso corpóreo e o colesterol total. Os dados gerados servirão como bases para estudos com suplementação deste elemento em humanos e animais.

Desde as demonstrações iniciais dos efeitos antidiabéticos do cromo *in vivo*, há mais de 100 anos, avanços significativos foram feitos no entendimento das propriedades e dos mecanismos de ação dos compostos de cromo, como potencializador da ação da insulina. O mecanismo intracelular exato e/ou mediadores envolvidos nas ações do cromo ainda não estão totalmente elucidados, no entanto, tem aumentado o interesse no seu valor terapêutico sendo já conhecidos alguns mecanismos de ação.

Estudos relacionados à suplementação da dieta com o cromo se fazem pertinentes e necessários, de modo a fornecer subsídios para a correta suplementação deste elemento. A importância se dá pela escassez de dados com relação à suplementação deste mineral e pela diversidade de resultados.

A suplementação de cromo na forma de sal inorgânico não é uma técnica eficiente, fato este justificado pela afinidade da fibra na dieta, o que interfere na sua absorção.

O presente trabalho fornecerá informações sobre os efeitos da suplementação do cromo complexado com a metionina em fêmeas de camundongos Swiss senis e obesas, com o intuito de avaliar os efeitos sobre o peso corpóreo e colesterol total. Os dados gerados servirão como bases para estudos com suplementação deste elemento em humanos e animais.

1.2. Fundamentação

1.2.1. Diabetes *mellitus*

A diabetes *mellitus* (DM) atualmente é considerada uma das principais doenças crônicas que afeta o homem contemporâneo, acometendo populações de países em todos os estágios de desenvolvimento econômico e social (ORTIZ e ZANETTI, 2007).

O Diabetes *mellittus* é considerado uma doença crônica que pode ocorrer devido a defeitos na secreção ou na ação do hormônio insulina, que é produzido no pâncreas, pelas chamadas células beta. (GOMES et al., 2006).

Acomete o homem a nível mundial sendo que metade das pessoas ainda não chegaram ao diagnóstico final (ORTIZ e ZANETTI, 2007).

Denominada hiperglicemia em jejum, pode causar os seguintes sintomas : poliúria, polidipsia, sede, visão embaraçada, emagrecimento e cansaço sem razão. Estima-se um grande aumento do número de diabéticos pois associa-se ao estilo de vida atual, principalmente pelo sedentarismo e obesidade.

Diabetes tipo 1 acontece quando o sistema imunologico combate por um equivoco as células beta assim o nível de insulina diminui drasticamente ou até chega a não produzir mais e, assim, a glicose se acumula no sangue. Geralmente acomete indivíduos na adolescência ou na infância e, tornam-se insulina dependentes como tratamento para nivelar a glicose no sangue.

Diabetes tipo 2 não necessariamente torna o indivíduo dependente de insulina, 90% dos pacientes podem ser tratados com atividade física e alimentação controlada.

Atualmente,considerada a doença do século XXI, a diabetes é a 4ª causa principal de mortes nos países desenvolvidos e é considerada epidemia global que acomete 140 milhões de pessoas no mundo, sendo 50% desse total ainda não

diagnosticado. Estimativas indicam que este número chegará a 300 milhões nos próximos 25 anos (WHO, 2006). Este aumento está associado com alterações no estilo de vida de modo geral, marcado principalmente pelo sedentarismo e obesidade (ZIMMET et al., 2001).

Uma epidemia de diabetes *mellitus* está por vir, atualmente estima-se que a população mundial com diabetes é da ordem de 382 milhões de pessoas e que deverá atingir 471 milhões em 2035, sendo que cerca de 80% destes indivíduos com diabetes vivem em países desenvolvidos, onde a epidemia tem maior intensidade, fato este que vem associado ao sedentarismo e hábitos não saudáveis, causando resistência insulínica, que está envolvida na patogênese do diabetes (MALERBI et. al, 1992).

A obesidade é o principal fator de risco para o desenvolvimento da resistência à insulina (CHOI e KIM, 2010). Em situações de excesso de peso, a utilização periférica da insulina torna-se reduzida, alterando a regulação da homeostase da glicose. Assim a perda de peso é um objetivo terapêutico importante para indivíduos diabéticos (ADA, 2010).

O conceito de sensibilidade à insulina foi introduzido por Sir Harold Himsworht, em 1939, ao estudar a resposta de pacientes diabéticos ao estímulo glicêmico e à insulina (HIMSWORTH e KERR, 1939). 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 pancreática para compensar a resistência à insulina, resultando em níveis sanguíneos elevados de insulina e mais tarde de glicose (LAU et. al, 2006).

Não é caracterizada como uma doença, mais sim uma anomalia fisiopatológica que pode ter inúmeras consequências e está ligada a diversas situações fisiológicas como: puberdade, gravidez, menopausa, uso de corticosteroides, obesidade, diabetes *mellitus* tipo II, doenças cardiovasculares, dislipidemias, síndrome metabólica entre outras (KELLY, 2000).

Várias complicações podem ocorrer como: disfunção e falha renal, anormalidades cardíacas, retinopatia diabética, neuropatia, aterosclerose, entre outras. A etiologia da diabetes e as suas complicações continuam por clarificar. Contudo, vários fatores como a idade, obesidade e dano oxidativo têm sido implicados. Devido à prevalência da diabetes, estudos multidisciplinares que se

destinam a prevenir e a tratar diabetes são prioridades da investigação em todo o mundo (FLORES et. al, 2011).

Inicialmente conhecida como diabetes “juvenil”, a diabetes tipo I ocorre devido a destruição das células β por um processo autoimune (tipo A) ou por causa desconhecida (forma idiopática ou tipo B). Na forma autoimune que é a mais comum, ocorre um processo de insulite e a presença de auto-anticorpos (antidescarboxilase do ácido glutâmico, anti-ilhotas e anti-insulina), enquanto a forma idiopática caracteriza-se pela ausência de insulite e de auto-anticorpos. O fato de haver ausência absoluta de insulina na diabetes tipo I resulta em manifestações clínicas evidentes, possibilitando rápido diagnóstico quando comparada com a diabetes tipo II (GROSS et. al, 2002).

A diabetes tipo II é a mais comum, correspondendo a 90% dos casos. Este tipo ocorre devido a distúrbios na ação e secreção da insulina. Anteriormente conhecida como diabetes da maturidade, por ser muito frequente em indivíduos com idade acima de 40 anos, hoje esta denominação caiu em desuso, devido à alta incidência de diabetes tipo II em indivíduos jovens. O diabetes tipo II é uma doença multifatorial, sendo resultado de uma combinação de genes (“diabetogenes”) e de fatores ambientais (KAHN, 1994).

1.2.2. Insulina

A insulina é um hormônio capaz de induzir resposta anabólica no fígado, tecidos musculares e tecido adiposo, sendo importante para a homeostase de lipídios e carboidrato e, consequentemente, para o funcionamento do organismo. Além disso, a insulina regula vários processos fisiológicos em diferentes tipos celulares e tecidos como fluxo de íons, captação de aminoácidos, expressão gênica, proliferação celular, apoptose, rearranjo do citoesqueleto e regulação de enzimas celulares (MAASSEN e OUWENS, 1997; MYERS e WHITE, 1996).

É essencial para a manutenção da homeostase glicêmica, do crescimento e diferenciação celular, sendo esta secretada pelas células β das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento das concentrações circulantes de glicose (NOLAN et. al., 2011; WILLIAMS et. al, 2002).

A insulina é mais conhecida por seu papel na regulação sanguínea, pois ela suprime a neoglicogênese hepática e promove a síntese e armazenamento de

glicogênio no fígado e músculos (WILLIAMS et. al, 2002). Além disso, ela estimula a lipogênese no fígado e adipócitos e aumenta a síntese proteica (CAVALHEIRA et. al, 2002).

É o hormônio anabólico mais conhecido e é essencial para a manutenção da homeostase de glicose e do crescimento e diferenciação celular, é secretado pelas células β das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições. A insulina regula a homeostase de glicose em vários níveis, reduzindo a produção hepática de glicose (via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise) e aumentando a captação periférica de glicose, principalmente nos tecidos muscular e adiposo. A insulina também estimula a lipogênese no fígado e nos adipócitos e da reduz a lipólise, bem como aumenta a síntese e inibe a degradação proteica (PATTI e KAHN, 1998).

1.2.3. Cromo

O elemento cromo mineral foi descoberto por Vaquelin em 1797, e deu-lhe este nome porque para tratar com carvão que em temperaturas elevadas resultaram em um produto intensamente colorido (BARCELOUX, 1999).

O cromo é encontrado na natureza como Cromita ($FeCr_2O_4$) um óxido duplo de ferro e cromo de coloração amarelo ocre. É um mineral que ocorre nas valências de –2 a +6, sendo as mais comuns +2 (Cr^{2+}), +3 (Cr^{3+}) e +6 (Cr^{6+}). Sua forma mais comum presente nos alimentos é o Cr^{3+} (LOURENÇO, 2003; MITCHELL et. al, 1978).

As funções atribuídas ao cromo abrangem principalmente o metabolismo de carboidratos, mas também o metabolismo lipídico, reduzindo a concentração plasmática de colesterol em indivíduos com dislipidemias (KHOSRAVI-BOROUJENI et. al, 2011).

Tem como funções o metabolismo do carboidrato, dos lipídios contribuindo com o tratamento de dislipidemias (KHOSRAVI-BOROUJENI et. al, 2011). MERTZ e SCHWARZ (1957) identificaram o fator de tolerância a glicose (GTF), um complexo orgânico de baixo peso molecular contendo Cr^{+3} associado a aminoácidos (ácido nicotínico, glicina, ácido glutâmico e cisteína), que estimula a captação de glicose pelas células de tecidos-alvo.

A insulina atua fazendo com que ocorra a deposição de tecidos nos músculos, no metabolismo das gorduras e a utilização do colesterol. Se a insulina estiver com baixa ação a glicose é convertida em gordura e os aminoácidos não formam músculos (ANDERSON, 1988). É necessário a utilização da glicose junto a insulina para verificar a eficácia do cromo (CEFALU e HU, 2004).

Levedo de cerveja é o alimento que tem melhor fonte de cromo, porém carne, fígado de boi, ovos, ostras, trigo, pimentão, brócolis, suco de uva, batata e outros. Na forma de suplementos: cloreto, picolinato, nicotinato, pidolato e citrato. O picolinato tem sido muito utilizado em paciêntes que necessitam controlar os níveis de glicemia (GOMES et al., 2006). Sendo assim, o cromo é um suplemento indispensável principalmente em diabéticos pois absorvem mais do que não diabéticos pois excretam muito na urina.[37]

Sendo assim, a insulina tem como função participar do metabolismo energético, permitir a deposição de tecidos nos músculos, atuar no metabolismo das gorduras e regular a utilização do colesterol. Caso a glicose não seja utilizada pelas células do organismo devido à baixa atividade da insulina, esta é convertida em gordura. Caso os aminoácidos não consigam entrar no interior das células, os músculos não poderão ser formados (JARAMILLO, 2007).

Em humanos, o cromo inibe indiretamente as enzimas de síntese de ácido graxo, responsáveis pela lipogênese, modificando o armazenamento de triglicerídeos mediados pela insulina, resultando em menor deposição de gordura, tendo também um efeito positivo sobre a utilização e incorporação de aminoácidos e na síntese de proteínas, melhorando a transcrição do RNA (KAATS et. al, 1998).

Em muitos trabalhos relacionados à deficiência deste elemento, a ação da insulina é deprimida a ponto de alterar o metabolismo de carboidratos, aminoácidos e lipídios (MOWAT, 1997).

A suplementação de cromo pode ser feita em ambas as situações já que interferem na ação da insulina. Além deste efeito, a potencialização da ação da insulina estimula a absorção de glicose e aminoácidos, o que resulta em efeito anabólico, com consequente aumento na massa magra e diminuição da massa gorda (PASMAM et. al, 1997).

Cefalu e Hu (2004) observaram que o cromo inibe a fosfatase fosfotirosina, que separa o fosfato do receptor de insulina, promovendo uma diminuição da sensibilidade à insulina. Além disso, tem sido sugerido que o cromo aumenta a

ligação da insulina ao número de receptores insulínicos e, consequentemente, a sensibilidade das células beta pancreáticas.

A utilização somente da glicose ou da insulina para se determinar o efeito do cromo não são eficientes, porque a concentração de ambos é regulada de forma harmônica. As relações molares insulina/glicose e da taxa de desaparecimento de insulina e glicose foram mais eficientes do que a análise individual destes dois parâmetros. As relações molares insulina/glicose e da taxa de desaparecimento insulina/glicose sugerem aumento de sensibilidade do tecido à insulina. Em contraste aos animais no pós-parto, os animais no pré-parto não apresentaram efeito da suplementação de cromo, provavelmente efeito do tempo de suplementação (HAYIRLI et. al, 2001).

A maior parte do cromo ingerido através dos alimentos está na forma trivalente. A melhor fonte de cromo é o levedo de cerveja, no entanto, outras fontes incluem: carnes, fígado bovino, ovos, frango, ostras, trigo, pimentão, brócolis, suco de uva, batata, alho, maçã, banana, espinafre, pimenta, manteiga, melaço, etc (ANGUIANO et. al, 2007).

O cromo está presente em muitos suplementos nutricionais e plurimineral e encontra-se disponível na forma de sais: cloreto, picolinato, nicotinato, citrato e pidolato. O cloreto de cromo é absorvido em menor quantidade (0,4%) e o picolinato de cromo possui sua absorção aumentada (0,7-5,2%), (ANGUIANO et. al, 2007).

Atualmente, esse mineral tem sido utilizado como suplemento dietético em pacientes que necessitam de controle glicêmico. Evidências científicas apontam que a sua deficiência na dieta contribui para a intolerância à glicose e alterações relacionadas ao perfil lipídico. Isto se explica porque a função primária do cromo é a de potencializar os efeitos da insulina, com melhora da tolerância à glicose e, consequentemente, do metabolismo de carboidratos, lipídios (GOMES et al., 2006).

Em dietas normais, o consumo médio diário de uma pessoa é de 50 a 80 mg de cromo, quantidade insuficiente para o funcionamento normal do organismo. A Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos recomenda uma ingestão diária de 100 a 200 mg de cromo para o ser humano (JARAMILLO, 2007).

As recomendações variam de acordo com a faixa etária: homens adultos: 19 a 50 anos: 35 mg; acima de 50 anos: 30 mg; mulheres adultas: 19 a 50 anos: 35 mg; acima de 50 anos: 20 mg (ANGUIANO et. al, 2007). Mesmo assim, a Agência

Nacional de Vigilância Sanitária estabelece como nível seguro o limite máximo de 1000 mcg /dia de cromo para adulto (ANGUIANO et. al, 2007).

Nesse sentido, acredita-se que o suplemento de cromo é essencial para os seres humanos e animais, especialmente para os diabéticos, uma vez que esses pacientes apresentam metabolismo alterado desse nutriente, necessitando de maior quantidade deste suplemento nutritivo, devido a sua maior assimilação. Os diabéticos absorvem mais cromo que os não diabéticos por sofrer maiores perdas deste elemento pela urina (JARAMILLO, 2007).

1.2.3.1. Mecanismo de ação do cromo

Uma substância ligante de cromo de baixo peso molecular conhecida hoje por cromodulina começou a ser estudada por volta dos anos 80, essa tem uma semelhança estrutural a calmodulina onde é formada por quatro ions de Cr^{+3} que se ligam a resíduos de glicina, cisteína, glutamato e aspartato e foi isolado em mamíferos em seus vários tecidos (GOMES et. al, 2006). Este por sua vez tem uma intensa atividade no metabolismo carboidrato sendo que junto com a insulina intensifica sua ação, fazendo com que a absorção da glicose seja mais eficaz (MITCHELL et. al, 1978).

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) (VINCENT, 2000; YAMAMOTO et. al, 1989), 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} ligado a resíduos de glicina, cisteína, glutamato e aspartato e foi isolado em tecidos de várias espécies de mamíferos (GOMES et. al, 2006).

Este mineral participa ativamente do metabolismo de carboidratos, principalmente 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 (MITCHELL et. al, 1978; MARANGON e FERNANDES, 2005). 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 (EVANS e BOWMAN, 2002; VICENT, 1999).

Somando ao fato de que aumenta o número de receptores de insulina e a sensibilidade das células β do pâncreas. 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 (VICENT, 1999).

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. Esta alteração desencadeia uma série de reações de fosforilação em cascata com o objetivo de estimular translocação dos transportadores de glicose (GLUTs) para a membrana plasmática (CAVALHEIRA et. al, 2002)

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 (Figura 1). 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 (YAMAMOTO et. al, 1989).

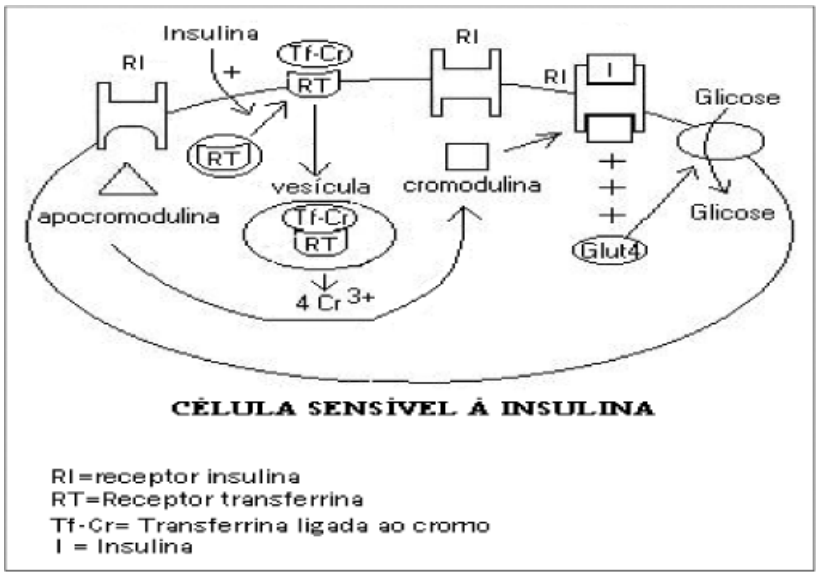

Figura 1: Mecanismo proposto da participação do cromo na ação da insulina.

Fonte: SUN et. al, 2005

1.2.3.2. **Biodisponibilidade dos quelatos**

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 (SHAH, 1981).

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 de suma importância com relação à biodisponibilidade de minerais inorgânicos diz respeito à solubilidade, ou seja, quanto maior a solubilidade em água, maior será a biodisponibilidade (MELLO, 1988).

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 (MELLO, 1988).

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 (MELLO, 1988).

A absorção de minerais como zinco, cálcio e cromo no intestino delgado pode ser afetada 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 (ERDMAN, 1983).

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 (GIBSON, 1990). A maior quantidade de cromo parece estar distribuída no fígado, rins, baço e epidídimo (HOPKINS, 1965).

Chen et al. (1973) 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.

1.3. Hipótese

O cromo na forma de complexo com a metionina promoverá redução nos níveis séricos de colesterol total, em animais obesos e hiperglicêmicos e, também, a redução do peso corpóreo.

1.4. Objetivo geral e específicos

O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos terapêuticos do cromo (complexo com metionina) em camundongos senis fêmeas e obesas visando reduzir o colesterol total sérico,e ganho de massa magra.

De modo específico, pretendeu-se:

1. Desenvolver e avaliar um complexo cromo/metionina, de alta solubilidade e estabilidade, para uso na nutrição animal;
2. Avaliar o complexo de cromo/metionina no tratamento da hipercolesterolemia oriunda da obesidade;
3. Determinar os efeitos do complexo sobre o colesterol total sérico;

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Local de condução

A condução experimental e, análises laboratoriais, foram realizadas no laboratório de PD&I alocado na Unicastelo, Campus de Descalvado e no Departamento de Tecnologia, Laboratório de Biogeoquímica, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal.

2.2. Unidades experimentais e manejo

Como unidades experimentais foram utilizados camundongos Swiss, fêmeas, linhagem isogênica, obtidos em biotério certificado. Sessenta fêmeas, com idade média de 4 semanas, foram adquiridas e separadas aleatoriamente em grupos de 20 animais em gaiolas nas medidas de 49x34 cm, com malha de 0,5 cm, contendo serragem de madeira no fundo servindo de cama para os animais. Estes animais permaneceram nestas gaiolas por 28 semanas.

Os grupos experimentais e controles permaneceram sob idênticas condições ambientais, em lugar arejado e com temperatura ambiente equivalente à média local para a época do ano (aproximadamente 25 ºC), no escuro e à luz artificial durante ciclos alternados de 12 horas, alimentados com água filtrada e ração comercial (Probiotério MP77), *ad libitum,* disponibilizadas nos comedouros e bebedouros das gaiolas.

Ao final do período de 32 semanas de idade, os animais foram separados em grupos de 2 indivíduos, transferidos para gaiolas nas medidas de 30x20 cm e identificados individualmente através da pintura de parte da cauda com cores diferentes, com tinta atóxica e resistente a água.

Procedeu-se a pesagem e a identificação de animais com peso normal e obesos. Consideramos os animais como obesos quando o peso do animal era superior a 60 gramas e como peso normal animais entre 45 e 50 gramas (Figura 2). Dos 60 animais iniciais selecionou-se 36, descartando-se os com peso muito superior ou inferior à média de cada grupo. Os animais foram submetidos a adaptação ao novo alojamento e a nova dieta experimental, ao final foram pesados

novamente, tendo início do período experimental de 1 semana sendo então pesados novamente ao término do período experimental de 6 semanas.

Figura 2: Na parte superior, animal representativo do tratamento obeso e, na parte inferior, animal considerado como peso normal (BC 3,5). O animal obeso foi classificado com BC 4,5 segundo CULLERÉ et al., 1999.

Fonte: Foto do autor.

O cronograma de execução do experimento, com os principais marcos, pode ser observado na Figura 3.

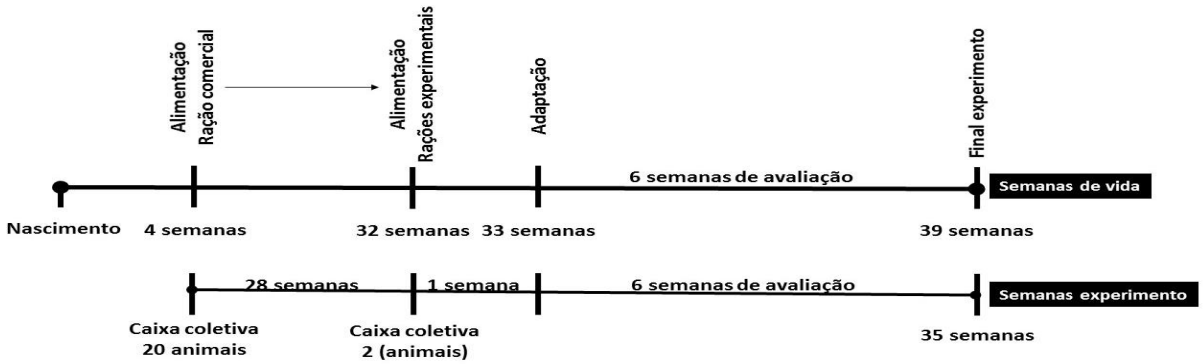

Figura 3: Ilustração do cronograma de execução do experimento com os principais marcos. Na linha superior, o tempo demostra a idade dos animais e na linha inferior os tempos envolvidos em cada fase experimenta.

Fonte: Autor

2.3. Delineamento experimental

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema de análise fatorial, com 3 tratamentos principais e 2 tratamentos secundários, sendo cada tratamento composto por 6 unidades experimentais, distribuídos em 3 gaiolas com 2 indivíduos cada.

Os tratamentos principais avaliados foram: TC (tratamento controle – ração comercial); TI (cromo na forma de cloreto cromo – 100 $mg.kg^{-1}$ ração); TO (cromo orgânico complexado com metionina – 100 $mg.kg^{-1}$ ração). Os tratamentos secundários foram os animais senis com peso normal e obesos.

Os valores de inclusão na deita foram estabelecidos com o intuito de obter consumo médio diário de 0,5 a 0,7 mg/kg^{-1} de cromo (consumo médio de ração de 7 gramas).

2.4. Complexo de cromo e incorporação na dieta

As fontes de cromo avaliadas, foram desenvolvidas na empresa NewAgri, sediada no munícipio de Descalvado/SP através de parceria de inovação tecnológica.

A ração comercial para camundongos (Probiotério MP77) foi triturada, peneirada e pesada, assim como as fontes de cromo para os tratamentos.

A ração moída, água (60% do peso de ração) e a fonte de cromo foram transferidas para misturador tipo *ribbon blender* (capacidade para 15 kg), sendo o material homogeneizado por 20 minutos. Posteriormente, as rações TC, TI e TO foram submetidas à formação pellets, sem aquecimento, com características similares ao pellet inicial. Para facilitar a identificação das rações utilizou-se corante verde em diferentes quantidades (Figura 4). A quantidade de ração preparada foi equivalente ao consumo para três semanas e a mesma foi acondicionada em sacos plásticos hermeticamente fechados. As rações controle (TC) e cromo inorgânico (TI) receberam a quantidade equivalente a adição ocorrida no tratamento cromo orgânico (cromo/metionina).

A composição química das rações está apresentada na Tabela 1.

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:

Figura 4: Características dos pellets de rações (TC, TI e TO) utilizados. Da esquerda para a direita observa-se a ração controle (TC), ração contendo 100 mg/kg MS de cromo inorgânico (TI) e ração contendo 100 mg/kg MS de cromo orgânico (TO).

Fonte: Autor

2.5. Duração experimental

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 nova gaiola, companheira e a dieta e 6 semanas de avaliação experimental.

2.6. Manejo semanal

Semanalmente foram determinados o consumo de ração e o peso dos camundongos, procedimento realizado às 7h da manhã, utilizando balança semi analítica.

2.7. Pesagem dos animais e consumo de ração

Os animais foram pesados semanalmente, no entanto, os dados foram apresentados em intervalos de 14 dias.. Os dados de consumo de ração estão expressos em g/dia.

2.8. Colesterol total

Na determinação do colesterol sérico total, os animais foram mantidos em jejum prévio de 6 horas e, através de punção da veia lateral da cauda e, o colesterol determinado por kit colorimétrico enzimático.

3. RESULTADOS E DISCUÇÃO

3.1. Peso corpóreo

A análise estatística realizada no tempo zero da avaliação experimental teve como objetivo verificar a eficiência do procedimento utilizado na separação dos animais para a formação dos grupos experimentais. Pode-se observar na Tabela 2 que não houve diferença significativa entre os tratamentos principais (TC, TI e TO), no entanto, houve efeito significativo para o tratamento secundário (animais normais e animais obesos), sendo a diferença média entre estes dois grupos de 11,66 gramas.

Os fatores avaliados, fontes de suplementação e peso, apresentaram efeitos independentes e, durante todo o período, os tratamentos secundários (peso) apresentaram o mesmo comportamento, sendo o grupo obeso sempre superior em peso aos animais normais (p<0,05).

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

		Suplementação							
Períodos	**Peso**	**TC**		**TI**		**TO**		**Médias**	
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**		
14º 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**		
28º 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**		
42º 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.

Até o 14º dia do período experimental não houve efeito significativo (p>0,05) da suplementação de cromo sobre o peso vivo dos animais. No entanto, as pesagens realizadas no 28º e 42º dias de condução experimental houve efeito significativo das fontes de suplementação de cromo (p<0,05) sendo observada

diferença entre pesos de 4,61 e 4,55 entre os tratamentos TC (controle) e TO (cromo orgânico) nas pesagens realizadas no 28º e 42º dias, respectivamente. Pode-se observar que a magnitude de redução observada no 28º dia não se repetiu no período subsequente. O tratamento TI (cromo inorgânico) não diferiu significativamente (p>0,05) dos demais tratamentos.

Um enigma persiste em relação ao papel biológico de Cr sobre o peso corporal e da composição da massa corporal. Se Cr (III) potencializa a ação da insulina, deve agir como um agente anabólico. Assim, Cr (III) deve regular a síntese de proteínas e promover o ganho de músculo e massa corporal magra. No entanto, o mecanismo pelo qual suplementar Cr (III) promove a perda de peso e de gordura, tal como hipotética, é desconhecido. Uma hipótese poderia sugerir que o Cr (III) tem um efeito inexplicável no aumento do gasto energético (VINCENT, 2007).

3.2. Consumo de ração

No consumo de ração não foi observado efeito de interação entre a condição corpórea em função da 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}.

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

		Suplementação/Tratamentos						Médias	
Períodos	**Peso**	**Controle**		**TI**		**TO**			
0 - 14º 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**		
14º - 28º 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**		
28º - 42º 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.

Dados contraditórios podem ser encontrados na literatura e semelhantemente do que foi observado neste experimento, Mahmood et al. (2005) que suplementaram ratos UNX com 5 m/kg de cromo picolinato, por 60 dias, não observaram alterações no consumo de alimento diário.

3.3. Colesterol total

Não foi observado efeito (p>0,05) da suplementação de cromo sobre a concentração de colesterol total sérico e, independente da suplementação, os animais em condição de sobrepeso apresentaram concentrações séricas de colesterol total superiores aos animais com peso normal.

O tecido adiposo modula o metabolismo pela liberação de ácidos graxos livres (AGL), glicerol, citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e hormônios, incluindo a leptina e a adiponectina. O aumento da produção da maioria desses fatores, na obesidade, compromete a ação da insulina nos órgãos-alvo, atuando principalmente, na sua cascata de sinalização e levando à resistência insulínica (SAUTER et. al, 2008).

Tabela 4. Colesterol sérico total, expresso em mg/dL, de camundongos Swiss fêmeas normais ou obesos, suplementados com diferentes fontes de cromo em amostra obtida após 6 semanas de suplementação.

	Suplementação							
Peso	**TC**		**TI**		**TO**		**Médias**	
Normal	78,24		75,44		70,21		74,63	**B**
Obesos	95,68		91,24		92,77		93,23	**A**
Médias	86,96	**a**	83,34	**a**	81,49	**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.

4. CONCLUSÃO

A obesidade promoveu concentrações séricas superiores de colesterol total nos camundongos Swiss ao término do experimento. A suplementação com complexo cromo/metionina não alterou a concentração sérica de colesterol total, no entanto, esta fonte promoveu redução no peso corpórea a partir do 28º dia de suplementação sem alterar o consumo de ração. A forma orgânica mostrou-se mais eficiente que a inorgânica para redução de peso corpóreo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADA. American Diabetes Association. Standart of medical care in Diabetes 2011.Diabetes Care 2011; 34 S10-S61.

AHMED N, DAWSON M, SMITH C, WOOD E. Biology of Disease. First Edition. Taylor & Francis, 2007.

ANDERSON R. A. Chromium, History and nutritional importance. Biological Trace Element Research, Totowa, v. 32, Nº 3., 1988, pp: 409-421.

ANDERSON, R. A. Chromium, Glucose Intolerance and the American College of Nutrition, 17, pp. 548-555.

ANGUIANO A, GASCÓN M, CRUZ A. Evidencias del efecto del cromo en personas con diabetes: revisión sistemática. Rev Biomed 2007; 18(2):117-126.

ARSA G, LIMA L, ALMEIDA S, MOREIRA SR, CAMPBELL CSG, SIMÕES HG. Diabetes mellitus tipo 2: aspectos fisiológicos, genéticos e formas de exercício físico para seu controle. Rev. bras. cineantropom. desempenho hum 2009; 11(1):103-111. 3

BARCELOUX D. G. Chromium Clinical Toxicology, Vol.37; 1999, pp: 173–194.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Normas para Níveis de Dosagens de Vitaminas e Minerais em Medicamentos. Portaria nº 40 de 13 de Janeiro de 1998. Disponível em: htttp://WWW.anvisa.gov.be/legis/portaria/40_98.htm. Acesso em 27 fevereiro 2016.

CAVALHEIRA JBC, ZECCHIN HG, SAAD MJA. Vias de sinalização de insulina Arquivos Brasileiros de endocrinologia e metabologia São Paulo, v. 46, n. 4, 2002, p. 419 - 425.

CEFALU WT, HU FB. Role of chromium in human health and Diabetes. Diabetes Care 2004; 27(11):2741-51.

CHEN N. S. C, TASI A, DYER I. A. Effect of chelating agents on chromium absorption in rats. J Nutr, Bethesda, n.103, p.1182-1186, 1973.diabetes epidemic. Nature, v. 414, 2001, p. 782 – 787.

CHOI K, KIM YB. Molecular mechanism of resistence in obesity and type 2 diabetes. The Korean Journal of internal Medicine, Seoul, v25 n. 2, 2010, p. 119-129.

DEVLIN T. Textbook of Biochemistry with clinical correlations. Sixth Edition. Wiley-Liss, 2006.

ERDMAN JW. Factors that limitor enhance bioavailability of minerals from food. Nutr and the M., v.9, n.2, 1983, p 1-2.

EVANS G, BOWMAN T. D. Chromium picolinate increases membrane fluidity andrate of insulin internalization. J. Inorg. Biochem. 2002, 6:243-250.

FLORES CR, ET AL. Trace elements status in diabetes *mellitus* type 2: Possible role of interaction between molybdenum and copper in the progress of typical complications. Diabetes Res Clin Pract 2011; 91: 333-341

GIBSON R. S. Principles of nutrition assessment. New York: Oxford Universiy Press 1990.

GOMES M, ROGERO M, TIRAGEGUI M. Considerações sobre cromo, insulina e exercício físico. In: Revista Brasileira de Medicina do Esporte 2005; 11(5):262-266.

GROSS JL, SILVEIRO SP, CAMARGO JL, REICHELT AJ, AZEVEDO MJ. Diabetes Melito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, v. 46 (1), 2002, p. 16 – 26.

HAYIRLI A. ET AL. Effects of chromium supplementation on production and metabolic parameters in periparturient dairy cow. J Dairy Sci, Champaign, v.84, 2001, p.1218-1230.

HIMSWORTH HP, KERR RB. Insulin-sensitive and insulin-insensitive types of diabetes *mellitus*. Clin Sci. 1939; 4:119-52.

HOPKINS L. L. JR. Distribution in the rato f physiological amounts of injected Cr (III) with time. Am J Physiol 1965; 209:731-5.

JARAMILLO R. Importância del cromo em el organismo de personas com diabetes tipo II. Revista Tecnociencia Universitaria Bolivia 2007; 5(5):5.

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. Current Therapeutic Research, v.59, 1998, p.379-388.

KAHN CR. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. Diabetes, v. 43, 1994, p.1066 – 1084.

KELLY G. S. Insulin resistance: lifestyle and nutritional interventions. Altern Med Rev. 2000; 5(2):109-32.

KHOSRAVI-BOROUJENI H, ROSTAMI A, RAVANSHAD S, ESMAILZADEH A. Favorable effects on metabolicrisk factors were observed with a daily intake of brewer's yeastin type 2 diabetic patientswith hypercholestelolemia: a semi-experimental study. Journal of Diabetes. Richmond, 2011.

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.

LIONEL OP. Metabolic syndrome. Circulation, 2007, 115: 32-35.

LOURENÇO LM. Estudo espectofotométrico do sistema crômio (III) / azoteto e seu aproveitamento analítico. Ribeirão Preto, 2003. 113 F. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Departamento de Química – Universidade de São Paulo).

MAASSEN JA, OUWENS DM. Mechanism of Insulin Action. Molecular Pathogenesis of Diabetes *Mellitus*, v.22 , 1997, p. 201-221.

MAHMOOD S. M, CHAMPA P, CLAUDIA B, STEPHEN W. S. Effects of chronic chromium picolinate treatment in uninephrectomized rat. Metabolism. 2005 September; 54(9): 1243–1249. doi: 10.1016/j.metabol.2005.04.011.

MALERBI DA, FRANCO LJ. Multicenter study of the prevalence of diabetes *mellitus* and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian popalation aged 30-69 yr. Diabetes care, Alexandria, v.15, n. 11, 1992, p.1509-1516.

MARANGON A. F. C, FERNANDES L. G. M. O uso do picolinato de cromo como coadjuvante no tratamento da diabetes *mellitus*. Universidade ciências da saúde, VOL.3 N.2, 2005, P. 253-260.

MELLO C. A. O que há de novo na mineralização. Leite Brasil, São Paulo, v.1 , n.6, 1998, p.8-14.

MERTZ W, SCHAWARZ K. A glucose tolerance fator and its differentiation from fator 3. Archives of Biochemistry and Biophysics, New York, v72, n.2, 1957, p. 515 – 518.

MERTZ W. Chromium in human nutrition: a Review. J Nutr 1993; 123:626-33.

MITCHELL HS, RYNBERGEN HJ, ANDERSON L; DIBBLE MV. Nutrição. 16º. ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1978. P. 60-71.

MOONSIE-SHAGEER, S.; MOWAT, D. N. Effect of level of supplemental chromium on performance, serum constituents and immune status of stressed feeder calves. J Anim Sci, Champaign, v.71, p.232-238, 1993.

MOWAT D. N. Organic chromium, Chromium Books, 1997, 258p.

MYERS MG, WHITE MF. Insulin signal transduction and the IRS protein. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, v36; 1996, p.615 – 58.

NOLAN CJ, DAMM P, PRENTTKI M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. The Lancet, Boston, v.378, n.9786, 2011, p. 169-181.

OKADA S, TSUKADA H, OHBA H. Enhancement of nucleolar RNA synthesis by chromium (III) in regenerating rat liver. Journal of Inorganic Biochemistry, v.21, 1984, p.113-124.

ORTIZ MCA, ZANETTI ML. Levantamento dos fatores de risco para diabetes *mellitus* tipo 2 em uma instituição de ensino superior. Rev. Latino-am Enfermagem, 2007; 9(3):58-63

PASMAM W. J, WESTERTERP-PLANTENGA M. S, SARIS W. H. M. The effectiveness of lon-term supplementations of carbohydrathe, chromuim, fibre and caffeine on weight maintenance, In Internacional Jornal of obesity, 21, 1997, pp 1143-1151.

PATTI M. E, KAHN C. R. The insulin receptor ¾ a critical link in glucose homeostasis and insulin action. **J Basic Clin Physiol Pharmacol 1998**;9:89-109.

SAUTER N. S, SCHULTHESS F. T, GALASSO L. W, MAEDLER K. The Antiinflammatory Cytokine Interleukin-1 Receptor Antagonist Protects from High-Fat Diet-Induced Hyperglycemia. Endocrinology, v.149, n.5, 2008, p.2208-2218.

SHAH B. G. Chelating agents and bioavailability of minerals. Nutr Res, Tarrytown, v.1, n.6, 1981, p.617-622.

SUN Y, RAMIREZ J, WOSKI A. S, VICENT J. B. The bilding of trivalente chromiu to low-molecular-Weight , chromium bilding substance (LMW Cr) and the transfer of chromium from transferrin and chromium picolinate to LMW Cr. J Biol Inorg Chen 2005 :5: 129-36

ULLMAN-CULLERÉ, MOLLIE H., AND CHARMAINE J. FOLTZ. "Body Condition Scoring: A Rapid and Accurate Method for Assessing Health Status in Mice."Laboratory Animal Science 49.3 (1999).

VICENT JB. Mechanisms of chromium action: low-molecular-weight chromium - binding substance. J Am Coll Nutr 1999; 18:6-12.

VINCENT J. B. The nutritional biochemistry of chromium (III). Amsterdam: Elsevier, 2007. 279 p.

VINCENT JB. The biochemistry of chromium. J Nutr 2000; 130:715-8.

WHITE, M.F. The insuling signalling system and the IRS proteins. Diabetologia, v40, p.2 – 17, 1997.

WHO, World Health Organization and International Diabetes Federation, 2006.

WILLIAMS M, LIPPNCOTT T, WILKINS B. Atlas of Diabetes. Ed. Jay S. Skyler; 2002, p. 248.

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.

ZIMMET P, ALBERTI KGMM, SHAW J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. Nature. 2001 Dec 13;414(6865):782-7