

LETÍCIA LINHARES DA SILVA

**EFEITO DO AUMENTO DA INGESTÃO DE CÁLCIO SOBRE O ESTRESSE  
OXIDATIVO E A FUNÇÃO RENAL EM INDIVÍDUOS COM DIABETES DO  
TIPO 2 E EXCESSO DE PESO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

S586e  
2017

Silva, Leticia Linhares da, 1992-

Efeito do aumento da ingestão de cálcio sobre o estresse oxidativo e a função renal em indivíduos com diabetes do tipo 2 e excesso de peso : . / Leticia Linhares da Silva. – Viçosa, MG, 2017.

xiv,46f : il. ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Rita de Cássia Gonçalves Alfenas.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Cálcio. 2. Estresse Oxidativo. 3. Função Renal.  
4. Diabetes do tipo 2. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Nutrição e Saúde. Mestrado em Ciência da  
Nutrição. II. Título.

CDD 22. ed. 631.81

LETÍCIA LINHARES DA SILVA

**EFEITO DO AUMENTO DA INGESTÃO DE CÁLCIO SOBRE O ESTRESSE  
OXIDATIVO E A FUNÇÃO RENAL EM INDIVÍDUOS COM DIABETES DO TIPO 2  
E EXCESSO DE PESO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de fevereiro de 2017.



Flávia Galvão Candido



Juliana Farias de Novaes



Rita de Cássia Gonçalves Alfenas  
(Orientadora)

**A Deus,  
Aos meus pais,  
À minha irmã  
Aos meus familiares e amigos,  
A todos que me apoiaram e me  
auxiliaram nessa caminhada,  
Dedico.**

*“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”. (Albert Einstein)*

## AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora Aparecida, por ter iluminado minha trajetória até aqui. Aos meus pais Angelita e Antônio Augusto, pelo amor, paciência, incentivo, por me acalmar nos momentos de desespero, pelas rezas e velas acesas. Agradeço muito a vocês por serem meu ponto de apoio. Amo vocês!

À minha irmã, Lais pela sua positividade, pelo carinho, por sempre me incentivar e se preocupar comigo.

À meu cunhado, Rogério pelo companheirismo, descontração e apoio.

À Rafael, por toda a paciência, amor e companheirismo.

À minha orientadora, Rita de Cássia Gonçalves Alfenas, pela confiança, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado e por ser a maior incentivadora na superação do meus limites. Muito obrigada por tudo!!

A minha nova família do LEIA, pela amizade, momentos de descontração, aprendizado, pelos momentos de desabafo. Em especial a Flávia Galvão, pela paciência, ensinamentos por ser amiga e uma “có-orientadora”. À Adriane por estar presente em todos os momentos nessa caminhada, os de trabalho, comemorações, desespero, dúvidas, por ser minha grande amiga e me dar ótimos conselhos. Sou muito grata a vocês.

A todos meus amigos, do LABIN, da QUINTERAPIA, Renata e Gabriela, pela grande amizade que transcende às “quatro pilastras”.

Aos professores, Mariella Bontempo Duca de Freitas e Leandro Licursi de Oliveira, pela disponibilidade, gentileza e colaboração inestimável.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e contribuição científica.

Aos funcionários do Departamento de Nutrição e Saúde, pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Nutrição e Saúde pela oportunidade de realização deste curso.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho, meu muito obrigado! Essa caminhada não teria sido tão gratificante e alegre sem vocês!

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	vi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	viii
LISTA DE SÍMBOLOS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT .....	xiii
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
OBJETIVO GERAL .....	4
Objetivos específicos .....	4
ARTIGO 1.....	5
Resumo.....	6
Introdução .....	7
Métodos .....	8
Resultados .....	14
Discussão .....	19
Conclusão .....	21
Referencias.....	22
ARTIGO 2.....	26
Resumo.....	27
Introdução .....	28
Materiais e métodos.....	28
Resultados .....	31
Discussão .....	34
Referencias.....	37
CONCLUSÃO GERAL .....	39
Referencias.....	40
ANEXO 1.....	42
ANEXO 2.....	46

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1:

**Tabela 1:** Ingredientes e composição nutricional das bebidas teste.....11

**Tabela 2:** Características basais dos participantes (n=14).....16

**Tabela 3:** Variáveis antropométricas, de composição corporal e de estresse oxidativo em indivíduos portadores de diabetes tipo 2 com excesso de peso, ao início e ao final dos tratamentos.....17

### ARTIGO 2:

**Tabela 1:** Variáveis relacionadas ao funcionamento renal em indivíduos portadores de diabetes tipo 2 com excesso de peso, ao início e ao final dos tratamentos.....32



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### ARTIGO 1:

**Figura 1:** Desenho experimental.....10

**Figura 2:** Valores de delta (final – antes) obtidos para os tratamentos Alto cálcio (ingestão de 711mg de cálcio bebida + 800mg de Ca/dia da dieta) e Baixo cálcio (ingestão de 7mg de cálcio da bebida + 800mg de Ca/dia da dieta).....16

**Figura 3:** Coeficientes de correlação dos deltas totais obtidos para os tratamentos baixo cálcio e alto cálcio.....18

### ARTIGO 2:

**Figura 1:** Desenho experimental.....30

**Figura 2:** Coeficientes de correlação dos deltas totais (BC + AC) das variáveis avaliadas no estudo.....33

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC – Alto Cálcio

BC - Baixo Cálcio

CAT – Catalase

*CKD-EPI - Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*

*CCr – Clearance de creatinina*

DM2 – Diabetes *Mellitus* Tipo 2

DRC – Doença Renal Crônica

ERNS - Espécies Reativas de Nitrogênio

EROS - Espécies Reativas de Oxigênio

*FRAP - Ferric Reducing Ability of Plasma*

GC – Gordura Corporal

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de Hidrogênio

HbA1c – Hemoglobina Glicada

IMC – Índice de Massa Corporal

LDL - Lipoproteínas de Baixa Densidade

MDA – Malondialdeído

MLG – Massa Livre de Gordura

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

NO – Óxido Nítrico

PC – Perímetro Da Cintura

Pgas – Produtos de Glicação Avançada

PTH – Paratormônio

SOD – Superóxido Dismutase

## LISTA DE SÍMBOLOS

~ - Aproximadamente

## RESUMO

SILVA, Letícia Linhares da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Efeito do aumento da ingestão de cálcio sobre o estresse oxidativo e a função renal em indivíduos com diabetes do tipo 2 e excesso de peso.** Orientadora: Rita de Cássia Gonçalves Alfenas.

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é a causa mais frequente de doença renal crônica mundo e está diretamente associado ao excesso de gordura corporal. O excesso de gordura, principalmente localizada na região central, promove o estresse oxidativo, afetando negativamente o controle glicêmico, favorecendo a manifestação de complicações como das doenças renais, em diabéticos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do aumento da ingestão de cálcio sobre o estresse oxidativo e a função renal em indivíduos com diabetes e baixo consumo de cálcio. Quatorze indivíduos adultos, com DM2, com excesso de peso e baixo consumo de cálcio (<600mg/dia) participaram deste estudo controlado, simples cego, do tipo crossover. Os participantes receberam prescrição de dieta hipocalórica (-500 kcal/dia) e foram alocados aleatoriamente em um dos dois tratamentos: Baixo cálcio (BC, 800mg/dia + bebida placebo) ou Alto cálcio (AC, 800mg/dia + bebida láctea ~700mg de cálcio), com 12 semanas de duração cada e intervalo de oito semanas entre os tratamentos. No primeiro e no último dia de cada tratamento, foram avaliadas medidas antropométricas (peso, altura e perímetro da cintura- PC), de composição corporal (gordura corporal - GC e massa livre de gordura - MLG) e realizadas análises bioquímicas em amostras de sangue (hemoglobina glicada - HbA1c, vitamina D, PTH, catalase, superóxido dismutase, malondialdeído, óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e *Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP)*, ácido úrico, creatinina, albumina) e de urina (ácido úrico, creatinina e microalbuminúria). O clearance de creatinina (CCr) foi estimado com base na equação de CKD-EPI. Houve redução de PC, IMC, GC e HbA1c e aumento MLG após AC, enquanto que BC não alterou PC e IMC, provocou aumento de GC e HbA1c e reduziu MLG (*P<sub>intra</sub><0,05*). Comparado com BC, AC também obteve menores deltas de catalase (*P<sub>inter</sub><0,001*) e de *FRAP* (*P<sub>inter</sub> 0,003*). Houve redução de ácido úrico sérico (*p=0,01*) e do CCr (*p=0,03*), além do aumento de creatinina sérica (*p=0,03*) ao final de AC. Já em BC ocorreu

aumento ( $p=0,03$ ) de ácido úrico. Os efeitos benéficos do cálcio sobre a composição corporal e a HbA1c se associaram positivamente às variações nas concentrações de catalase, *FRAP*, ácido úrico, creatinina séricos e CCr. Com isso conclui-se que o aumento da ingestão de cálcio mostrou ser benéfico à função renal e ao estresse oxidativo de pacientes DM2 com baixo consumo de cálcio, sendo uma estratégia dietética a ser considerada no tratamento desses pacientes.

## ABSTRACT

SILVA, Letícia Linhares da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Effect of increased calcium intake on oxidative stress and renal function in subjects with type 2 diabetes and excess weight.** Adviser: Rita de Cássia Gonçalves Alfenas.

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is the most common cause of chronic kidney disease in the world and is directly associated with excessive body fat. Excessive body fat, mainly located in the central region, promotes oxidative stress, negatively affecting glycemic control, favoring the manifestation of complications such as kidney disease in diabetics. The aim of this study was to evaluate the effect of increased calcium intake on oxidative stress and kidney function in individuals with diabetes, overweight and low calcium consumption. Fourteen adult subjects with overweight and low calcium consumption (<600mg / day) participated in this controlled, single blind and crossover study. Hypocaloric diets (-500 kcal / day) were prescribed and participants were randomly assigned to one of two treatments: Low Calcium (LC, 800mg / day + placebo shake) or High Calcium (HC, 800mg / day + dairy shake ~ 700mg of calcium), with a duration of 12 weeks and washout period of eight weeks between treatments. On the first and last day of each treatment, anthropometric measures (body weight, height, waist circumference - WC), body composition (body fat - BF and fat free mass - FFM), biochemical blood tests (glycated hemoglobin - HbA1c, vitamin D, PTH, catalase, superoxide dismutase, malondialdehyde, nitric oxide, hydrogen peroxide and Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP), uric acid, creatinine, albumin) and urine tests (uric acid, creatinine and microalbuminuria). Creatinine clearance (CCr) was estimated based on the CKD-EPI equation. There was a reduction in WC, BMI, BF and HbA1c and an increase in FFM after HC, whereas LC did not change WC and BMI, caused an increase in BF and HbA1c, and reduced FFM (Pintra <0.05). Compared to LC, HC also led to lower delta of catalase (Pinter <0.001) and FRAP (Pinter 0.003). There was a reduction in serum uric acid (p = 0.01) and CCr (p = 0.03), in addition to serum creatinine (p = 0.03) at the end of HC. In LC, uric acid increased (p = 0.03). The beneficial effects of calcium on body composition and HbA1c were positively associated with changes in the

concentrations of catalase, FRAP, uric acid, serum creatinine and CCr. Thus, the increase in calcium consumption was beneficial to kidney function and reduced oxidative stress in patients with T2DM and low habitual calcium consumption, which can be a dietary strategy for the treatment of these patients.



## INTRODUÇÃO GERAL

O diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) é caracterizado pelo aumento crônico da glicemia causado por um desequilíbrio entre a ação e a secreção da insulina (HASLER; BROWN, 2009). O Brasil ocupa a quarta posição mundial em número de diabéticos, possuindo 415 milhões de indivíduos com a doença em 2015 (IDF, 2015). Além disso, estima-se que 75% dos indivíduos com DM2 possuam excesso de peso/ gordura corporal (GOMES et al., 2006).

O excesso de gordura corporal, principalmente a localizada na região central, é considerado um dos fatores de risco para a manifestação de diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2)(WICKMAN; KRAMER, 2013). Uma vez instalado e não controlado, o DM2 está relacionado a diversas complicações de longo prazo, incluindo retinopatia; nefropatia e cardiopatias. O diabetes é a causa mais frequente de doença renal crônica no mundo (BASTOS; BREGMAN; KIRSZTAJN, 2010) e a segunda etiologia mais comum entre os pacientes em diálise no Brasil (SESSO et al., 2010).

A fisiopatologia da doença renal como consequência do diabetes é complexa, abrangendo fatores hemodinâmicos (aumento da pressão arterial), concentração plasmática dos produtos finais de glicolisação avançada (PGAs) e disfunção endotelial (BASTOS; BREGMAN; KIRSZTAJN, 2010). Todos esses fatores promovem alterações como proteinúria, uricemia, aumento da concentração de creatinina sanguínea, diminuição do débito urinário, em resposta à perda de função renal iniciada e agravada pela presença de estresse oxidativo nesses indivíduos (PERES et al., 2013). A ocorrência de estresse oxidativo, o aumento da concentração dos produtos de glicação avançada (PGAs) e a pressão alta desencadeiam processos inflamatórios, que causam danos aos glomérulos levando a perda de função renal (WICKMAN; KRAMER, 2013).

A obesidade se associa ao estresse oxidativo afetando negativamente o controle glicêmico no DM2 (MATSUDA; SHIMOMURA, 2013). O acúmulo de gordura visceral está associado a um perfil dislipidêmico, que resulta no aumento de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (INDULEKHA et al., 2011). Essas LDLs sofrem frequentemente ataque de espécies reativas de

oxigênio (EROs), tornando-as oxidadas e pró-inflamatórias. Assim, as LDL são tanto fonte como alvo do estresse oxidativo (COUILLARD et al., 2005).

O estresse oxidativo, causado pelo desequilíbrio entre moléculas pró e antioxidantes, leva à disfunção celular, contribuindo para a deterioração das células  $\beta$ -pancreáticas e consequente deficiência da secreção de insulina (CHIKEZIE; OJIAKO; OGBUJI, 2015). As espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERN) são biologicamente formadas durante o processo da respiração e da produção de energia. No entanto, o excesso de gordura corporal favorece para que haja aumento das concentrações de glicose e ácidos graxos no sangue, resultando no aumento da produção de EROs, por super ativação da cadeia respiratória e também pela geração de PGAs (GUAN et al., 2016; SIVITZ; YOREK, 2010).

Os PGAs são formados por reações não-enzimáticas entre a glicose e proteínas ou lipídeos, durante a hiperglicemia prolongada (OTT et al., 2014). Esses produtos podem danificar as células por três mecanismos gerais: 1) alterando a função de proteínas intercelulares; 2) modificando componentes e receptores de matriz (integrinas), expressos na superfície das células e 3) alterando proteínas plasmáticas, de forma a ativar processo inflamatório via macrófagos. Nestes três mecanismos ocorre a geração de radicais livres, aumentando a possibilidade de danos celulares por estresse oxidativo (KASSAB; PIWOWAR, 2012).

O aumento crescente da prevalência do diabetes em todo o mundo tem estimulado os cientistas a buscarem por estratégias eficazes a serem utilizadas no controle da doença. Além de promover a perda de peso, tem sido verificado que o consumo de dieta hipocalórica melhora a função renal e a proteinúria em obesos portadores de nefropatia diabética (SAIKI et al., 2005). Estudos epidemiológicos têm associado o consumo de mais de uma porção/dia de laticínios, ao menor risco de diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) (CHOI, HK WILLETT, WC STAMPFER, MJ RIMM, E HU, 2005; LIU et al., 2006). Por vários anos, as proteínas do soro do leite foram consideradas as principais responsáveis pela redução do risco de DM2 em resposta ao consumo de laticínios, uma vez que possuem efeito insulínico e de aumento da

saciedade (LAN-PIDHAINY; WOLEVER, 2010). No entanto, recentemente outro nutriente tem ganhado destaque, o cálcio.

Os benefícios da ingestão do cálcio na redução do risco de várias doenças, dentre elas o diabetes, têm sido demonstrados recentemente. A ingestão aumentada de cálcio (1200 mg de cálcio, 3 porções de laticínios ou mais) melhorou o perfil lipídico e a composição corporal, pelo aumento da eliminação da gordura nas fezes (BOON et al., 2007; JOSSE et al., 2011). A maior ingestão desse nutriente também se associou à melhora da pressão arterial sistêmica (DALBETH et al., 2010; RALSTON et al., 2012) e a redução da resistência insulínica (AKTER et al., 2013; RIDEOUT et al., 2013; TONG et al., 2011). Apesar da ingestão do cálcio ter vários benéficos ao organismo, além da manutenção óssea, a maior parte da população mundial tem o consumo inferior aos 1000mg/dia estabelecidos pela WHO/FAO (PRENTICE, 2014). Estima-se que em 16 países europeus o consumo de cálcio seja de 687 a 1171 mg/dia em homens e 508 a 1047 mg/dia em mulheres (ELMADFA, 2009), que na China apenas 2-3% da população tenha ingestão adequada do nutriente (HE et al., 2007) e que no Brasil mais de 90% do adultos (19 a 60 anos) consomem quantidades inadequadas de cálcio (LOPES et al., 2005; PINHEIRO; SCHUCH; GENARO, 2009).

Em estudo prévio realizado em nosso laboratório verificamos que o aumento do consumo de cálcio, reduziu IMC, gordura corporal, perímetro da cintura, pressão arterial e hemoglobina glicada em indivíduos DM2. Entretanto, não identificamos na literatura científica estudos que avaliaram o efeito do aumento da ingestão de cálcio sobre o estresse oxidativo e a função renal desses indivíduos. Assim, nesta dissertação nos propusemos a avaliar o efeito do aumento da ingestão desse micronutriente, visando à identificação de estratégia dietética capaz de controlar o *diabetes mellitus* tipo 2 em indivíduos que apresentam baixa ingestão habitual de cálcio.

## **OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito do aumento da ingestão de cálcio sobre o estresse oxidativo e a função renal de indivíduos diabéticos com excesso de peso e baixo consumo de cálcio.

### **Objetivos específicos**

1. Avaliar o efeito do aumento da ingestão de cálcio sobre:

- As concentrações dos indicadores de estresse oxidativo: catalase, superóxido dismutase, malondialdeído, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e capacidade antioxidante do plasma;

- Função renal: excreção urinária de ácido úrico, creatinina e microalbuminúria, valor de taxa de filtração glomerular e concentração sérica de ácido úrico, creatinina e albumina;

- As concentrações de hemoglobina glicada (HbA1c).

- A antropometria e a composição corporal,

2. Associar as seguintes variáveis em resposta ao aumento da ingestão de cálcio lácteo:

- Função renal versus ingestão de cálcio, antropometria, composição corporal e concentrações de HbA1c.

- Indicadores de estresse oxidativo versus ingestão de cálcio, antropometria, composição corporal e concentrações de HbA1c.

## **ARTIGO 1**

**O aumento da ingestão de cálcio reduz o estresse oxidativo associado à melhora da composição corporal e controle glicêmico: estudo clínico randomizado cruzado controlado por placebo em indivíduos diabéticos**

**Título curto:** Cálcio e estresse oxidativo em DM2

### **Nome e endereço da instituição onde o trabalho foi realizado:**

<sup>1</sup> Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Brasil.  
Departamento de Nutrição e Saúde - CCB II, Avenida PH Rolfs, Viçosa, MG, 36570-000, Brasil. Telefone: +55(31)3899 2545. Fax: +55(31)3899 2541. E-Mail: dns@ufv.br

### **Autor a quem a correspondência deve ser endereçada:**

Letícia Linhares da Silva. Telefone: +55(31)3899 4193. Fax: +55(31)3899 2541.  
E-mail: [lele\\_linharess@yahoo.com.br](mailto:lele_linharess@yahoo.com.br)

### **Agradecimento**

Os autores agradecem a Fundação do Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG, ao Conselho Nacional de Pesquisa – CNPQ e a Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior – CAPES pelo suporte financeiro.

## RESUMO

*Introdução:* O excesso de gordura corporal, principalmente a gordura localizada na região central, promove o estresse oxidativo, afetando negativamente o controle glicêmico em diabéticos. A ingestão aumentada de cálcio pode melhorar a composição corporal. Entretanto, não há estudos sobre o efeito do aumento da ingestão de cálcio sobre o estresse oxidativo em indivíduos diabéticos tipo 2 (DM2). *Objetivo:* Analisar o efeito da alta ingestão de cálcio sobre a concentração de marcadores de estresse oxidativo e sua associação com a composição corporal e o controle glicêmico. *Métodos:* Este é um estudo randomizado cruzado, simples cego, controlado por placebo que envolveu 14 indivíduos adultos (idade 20 - 59 anos), com DM2, excesso de peso e baixo consumo habitual de cálcio (<600mg/dia). Os tratamentos foram oferecidos durante 12 semanas com oito semanas de intervalo entre eles, sendo eles baixo cálcio (BC, 800mg dieta prescrita /dia + ~7 mg bebida placebo /dia) e alto cálcio (AC, 800mg dieta prescrita /dia + ~711 mg bebida a base de leite /dia). No primeiro no último dia e de cada tratamento, o perímetro da cintura e a composição corporal foi avaliado, e foram analisadas as concentrações de hemoglobina glicada, vitamina D, PTH, catalase, superóxido dismutase, malondialdeído, óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e *Ferric Reducing Ability of Plasma - FRAP*. *Resultados:* Comparado com BC, AC resultou em maiores reduções nas concentrações (valor final - inicial) de catalase (*Pinter*<0,001) e de *FRAP* (*Pinter* 0,003). Os efeitos benéficos do cálcio sobre a composição corporal e a HbA1c se associaram positivamente às reduções nas concentrações de catalase e *FRAP*. *Conclusão:* O aumento do consumo cálcio promoveu a redução do estresse oxidativo, associado à melhora da composição corporal e do controle glicêmico dos participantes.

## INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) é um problema de saúde mundial com crescimento alarmante. Estima-se que no ano de 2015, 415 milhões de pessoas no mundo eram diabéticas e até o ano de 2040 esse número deve aumentar em mais de 50% (IDF, 2015). Essa desordem acomete principalmente indivíduos adultos com idade superior a 30 anos e com excesso de peso corporal (ALAM; KHAN; SALMAN, 2013). Dessa forma, é grande o interesse por tratamentos dietéticos capazes de prevenir e melhorar a qualidade de vida, reduzindo as complicações do DM2 (BALL et al., 2016).

O papel essencial do cálcio em diversos processos metabólicos e estruturais, como na secreção de hormônios (SANTULLI et al., 2015), na transmissão nervosa (SIMMS; ZAMPONI, 2014), na contração muscular (REBBECK et al., 2014) e sustentação do corpo já é bem estabelecido (WOODWARD et al., 2011). No entanto, seu potencial efeito antiobesogênico e na melhora do controle glicêmico tem ganhado destaque na comunidade científica. Os efeitos do aumento do consumo do cálcio sobre a redução do peso/ gordura corporal (JACQMAIN et al., 2003; LEE et al., 2014; ZEMEL, 2009; ZEMEL et al., 2004), do perímetro da cintura (JACQMAIN et al., 2003; TORRES; SANJULIANI, 2013; ZEMEL, 2009; ZEMEL et al., 2004) e no aumento da massa magra (ZEMEL, 2009) em indivíduos com excesso de peso também tem sido evidenciado por outros autores. Além disso, o consumo do cálcio também foi associado ao menor risco de diabetes (PITTAS et al., 2006) e a melhora da sensibilidade à insulina em indivíduos com DM2 (PIKILIDOU et al., 2009).

O tecido adiposo é um dos tecidos que apresenta maior atividade metabólica do organismo (SANTOS et al., 2016). O excesso desse tecido, localizado principalmente na região central, estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (EROs), levando a inflamação e ao estresse oxidativo (YE, 2013). As citocinas produzida no tecido adiposo são potentes estimuladores de geração de EROs por macrófagos e monócitos. No entanto, a principal via de aumento do estresse oxidativo por esse tecido se dá pela atuação da enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH)

oxidase, que converte o oxigênio molecular em seu radical superóxido e sua atividade é estimulada pela angiotensina II secretada pelos adipócitos. Por esse motivo, o excesso de gordura corporal desencadeia o estresse oxidativo (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011).

O desequilíbrio entre moléculas pró e antioxidantes causa o estresse oxidativo que resulta em vários danos ao organismo, podendo alterar as estruturas celulares e causar mutações no DNA, levando à morte celular por apoptose (TANGVARASITTICHAJ, 2015). Dentre as células atingidas pelo estresse oxidativo, encontram-se as células  $\beta$  pancreáticas, que ao sofrerem danos estruturais, perdem a função e ativam mecanismos de morte, reduzindo a secreção insulínica e resultando em descontrole glicêmico (FERRARI, 2010).

Apesar das evidências indicarem que o excesso de gordura corporal se associa ao estresse oxidativo e que o aumento da ingestão de cálcio pode reduzir a gordura corporal, não identificamos estudos sobre o efeito do consumo desse nutriente sobre o estresse oxidativo em indivíduos com DM2. Assim, no presente trabalho objetivamos avaliar o efeito da alta ingestão de cálcio sobre os indicadores de estresse oxidativo em indivíduos diabéticos com excesso de peso. Adicionalmente, avaliamos a relação entre os efeitos do cálcio no estresse oxidativo e em medidas antropométricas e de composição corporal.

## **MÉTODOS**

### **Participantes**

Participaram do estudo indivíduos portadores de DM2 (glicemia de jejum  $\geq 126$ mg/dL e HbA1c  $> 6,5\%$  (SBD, 2016) em uso de hipoglicemiante oral, com excesso de peso (IMC entre 25 e 34,9 kg/m<sup>2</sup> (WHO, 2000) e idade entre 20 e 59 anos. O cálculo de poder (MERA; THOMPSON; PRASAD, 1998) indicou que 11 indivíduos eram necessários para detectar redução de 1% na HbA1c (poder estatístico de 90% e  $\alpha = 0,05$ ) Não foram incluídos no estudo: indivíduos fumantes; gestantes ou lactantes; em uso de suplementos; com consumo regular de álcool acima de 2 doses/dia ( $> 20$ g de etanol/dia) e de cafeína superior a 1250 mg; com ingestão habitual de cálcio, avaliado por questionário



de frequência alimentar e registros alimentares, maior que 600mg mg/d; com alteração de peso ( $\pm$  5kg) e de nível de atividade física nos últimos 3 meses; anêmicos, portadores de outras patologias (renal, hepática, cardíaca e intestinal) ou que sofreram algum tipo de intervenção no trato gastrointestinal e que apresentaram aversão ou intolerância aos alimentos fornecidos no estudo.

Os participantes foram recrutados após a divulgação do estudo por meio de cartazes, redes sociais, rádio local e anúncio em jornal. Todos os participantes assinaram o termo Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1) antes de serem incluídos na pesquisa. O presente estudo faz parte de um estudo maior “Efeito do aumento da ingestão de cálcio na permeabilidade e microbiota intestinais em diabéticos do tipo 2 com excesso de peso” que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Viçosa (parecer nº 526.005/ 2014) (Anexo 2) e realizado conforme com a Declaração de Helsinki.

### **Desenho Experimental**

Trata-se de um estudo randomizado cruzado simples cego, com 12 semanas de duração para cada tratamento e oito semanas de intervalo entre os mesmos (Figura 1). Os participantes foram aleatoriamente alocados em um dos dois tratamentos: Baixo Cálcio (BC) e Alto Cálcio (AC). Foram prescritas dietas hipocalóricas (redução de 500 kcal/dia), adequadas para pacientes DM2, levando em consideração a oferta de nutrientes das bebidas teste. Além disso as dietas apresentavam, conteúdo de macronutrientes e micronutrientes semelhante. Durante o estudo, os voluntários compareceram diariamente ao laboratório para ingerir uma bebida teste (~711 mg Ca/dia (AC) e ~7 mg Ca/dia (BC)) e as demais refeições (800 mg de cálcio de fontes alimentares/dia) foram realizadas em vida livre. Ingestão alimentar, variáveis bioquímicas (estresse oxidativo (catalase, superóxido dismutase, malondialdeído, óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e capacidade antioxidante total do plasma), controle glicêmico (hemoglobina glicada), antropometria (peso, altura, perímetro da cintura-PC e cálculo de índice de massa corporal-IMC) e a composição corporal (gordura corporal-GC e massa livre de gordura-MLG) foram avaliadas ao início e final de cada tratamento. Os voluntários foram orientados a manter o

nível de atividade física e a medicação constante durante todo o estudo e o consumo alimentar foi monitorado por meio de registros alimentares realizados a cada 15 dias .

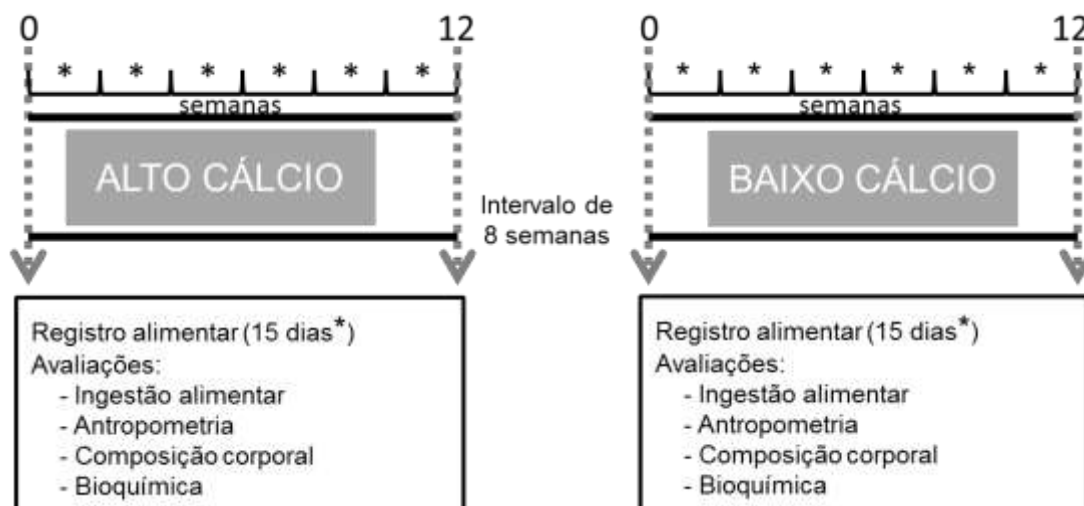


Figura 1: Desenho experimental

### Refeição teste

Foram elaboradas seis bebidas com sabores diferentes e composição nutricional semelhante (Tabela 1) para cada tratamento, apresentando ~ 7 de cálcio (BC) e ~ 711 mg de cálcio (AC). Para assegurar que as bebidas apresentassem composição nutricional semelhante, foi adicionado ao tratamento BC proteína de soro do leite (Bem Vital, Diacom®), cloreto de sódio (Cisne®). Ambos os tratamentos continham teores semelhantes de macro e micronutrientes, com exceção ao cálcio. A ordem de oferecimento dos diferentes sabores das bebidas foi feito de maneira aleatória.

**Tabela 1:** Ingredientes e composição nutricional das bebidas teste

Bebidas <sup>1</sup>	Ingredientes		Composição Nutricional				
	Tipo	Quantidade	Calorias (kcal)	Carboidrato (g)	Proteína (g)	Lipídeo (g)	Cálcio (mg)
AC	Leite em Pó Desnatado	47g	197,8 ± 11,1	31,9 ± 2,9	17,1 ± 0,2	0,1 ± 0,3	710,7 ± 3,7
	Açúcar	0 g					
	Polpa de fruta congelada <sup>2</sup> ou Chocolate em pó	100g (polpa) ou 10 g (chocolate)					
BC	Proteína Soro do Leite	18,02 g	198,0 ± 11,1	31,9 ± 2,9	17,1 ± 0,2	0,1 ± 0,3	6,6 ± 3,7
	Açúcar	23.5 g					
	Polpa de fruta congelada <sup>2</sup> ou Chocolate em pó	100g (polpa) ou 10 g (chocolate)					

<sup>1</sup>Foi adicionado 150ml água em cada uma das bebidas. <sup>2</sup>Sabores: acerola, goiaba, graviola, maracujá e morango. AC = Alto Cálcio; BC= Baixo Cálcio. Média ± DP

## **Avaliação antropométrica e de composição corporal:**

O peso corporal dos participantes, trajando roupas leves e descalços foi aferido em balança eletrônica do tipo plataforma, com capacidade para 150 kg e graduação em 50g (JELLIFFE, 1968). A altura foi determinada utilizando-se estadiômetro, escala de 0 a 220 cm, precisão de 0,1cm (JELLIFFE, 1968). O IMC foi calculado dividindo-se o peso corporal pelo quadrado da altura ( $\text{kg/m}^2$ ) e classificado segundo (WHO, 2000). O perímetro da cintura foi aferido, com o participante de pé, utilizando fita métrica inelástica e flexível, na região do ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca (WANG et al., 2003). A gordura corporal e a massa livre de gordura foram avaliadas por meio de densitometria por dupla emissão de raio X (dual energy X-ray absorptiometry - DXA) (GE Healthcare Lunar Prodigy Advance DXA System versão 13.31) (BERGMAN, 2012).

## **Análises Bioquímicas**

Na noite antecedente às avaliações, os participantes receberam refeições padronizadas em conteúdo de macronutrientes. Após jejum noturno (10 a 12 horas) foram coletadas amostras de sangue para as análises.

A HbA1C foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE. As concentrações de paratormônio (PTH) foram avaliadas pelo método de eletroquimioluminescência (Elecsys-Modular E-170, Roche Diagnostics Systems) e as de vitamina D por ensaio Quimioluminescente de Micropartículas – CMIA (Architect i2000, Abbott Diagnostics). A deficiência de Vitamina D e PTH foram identificadas quando foram obtidos valores  $<20$  ng/ml (HOLICK et al., 2011) e  $<10$  pg/ml (YOUNGWIRTH et al., 2010), respectivamente.

As análises de estresse oxidativo foram realizadas em plasma armazenado à  $-80^\circ\text{C}$ . A concentração de catalase (CAT) foi determinada pela taxa de queda do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Em  $40\mu$  de amostra foram adicionados a 2ml de tampão contendo peróxido de hidrogênio (30%) e realizadas as leituras (240nm) em 0, 30 e 60 segundos (AEBI, 1984). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ .

Para se determinar a concentração de superóxido dismutase (SOD) foi utilizada a reação de inibição do radical superóxido com pirogalol. As amostras foram misturadas a solução de MTT (brometo de 3 (4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), pirogalol e tampão fosfato (50mM) e incubadas por 5 min a 37°C. A concentração de SOD foi determinada pela absorvância 570nm, utilizando a reação padrão com tampão fosfato (DIETERICH *et al.*, 2000 modificado). Os resultados foram expressos em Unidades/ml.

Para determinação da concentração de malondialdeído (MDA) avaliou-se a formação de TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) sob aquecimento. A formação de TBARS foi utilizada como índice de peroxidação lipídica (BUEGE, J. A.; AUST, 1978). Para tal, as amostras foram misturadas a 200µl de Solução TBARS (ácido clorídrico a 0,25 molar; ácido tricloroacético a 15%; ácido tiobarbitúrico a 0,375% /concentração 1:1:1) e aquecidas a 85°C durante 50 min. As TBARS foram determinados pela absorvância a 535 nm, utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano (Sigma) como um padrão externo. Os resultados foram expressos em µmol/ml.

Óxido nítrico (NO) foi determinado indiretamente pela dosagem de nitrito total das amostras, utilizando-se o reagente de Griess (GRISHAM; JOHNSON; LANCASTER, 1996). Foi adicionado às amostras (50µl) 100 µl de reagente de Griess (1% de sulfanilamida; 0.1% de naftiletlenodiamino-bicloridrato em ácido ortofosfórico a 5%/ concentração 1:1), sendo a leitura (570nm) realizada após 10 minutos. NO foi determinado utilizando-se nitrito de sódio como padrão. Os resultados foram expressos em µmol/ml.

A concentração de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi determinada pela reação com a peroxidase e α-Phenylenediamine dihydrochloride-OPD ((NOUROOZ-ZADEH, 1999) modificado). Assim, uma mistura contendo 50 µl de amostras, 50 µl de α-Phenylenediamine dihydrochloride-OPD e 50µl de peroxidase (tipo II, 15mM) foi incubada a 37°C por 60 min e realizada a leitura (450nm). A concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi determinada utilizando-se o peróxido de hidrogênio (2mM) como padrão. Os resultados foram expressos em µmol/ml.

A capacidade antioxidante total do plasma foi determinada pelo teste de *Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP)*, que avalia a capacidade dos antioxidantes da amostra em reduzir o complexo 2,4,6-tripiryridyl-s-triazine férrico ([Fe(III)-(TPTZ)<sub>2</sub>]<sup>3+</sup> no complexo ferroso de cor azul intensa [Fe(II)-(TPTZ)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, em meio ácido (BENZIE; STRAIN, 1996). Para a análise, 300µL de solução de *FRAP* (tampão acetato 0,3 M; 2,4,6-tripiryridyl-s-triazine 10mM; cloreto férrico 20 mM / concentração 10:1:1) foi adicionado a 10µL de amostra, incubado a 37°C por 4 min e realizada a leitura (595nm). Para a determinação de *FRAP* foi utilizado sulfato ferroso como padrão. Os resultados foram expressos em µmol/ml.

### **Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, 2011, versão 20,0), com nível de significância de 5%. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para variáveis paramétricas utilizou-se o Teste t pareado, para comparação entre o período antes e ao final do mesmo tratamento (AC, BC), e o teste de Wilcoxon para variáveis com distribuição não paramétrica. O Teste t; para amostras independentes; e o teste alternativo de Mann-Whitney, foram utilizados para a comparação dos dados basais e a comparação entre os deltas (final - antes) das variáveis que possuísem estatística de  $P \geq 0,05$  da comparação dos dados basais entre os tratamentos. Já as variáveis com  $P < 0,05$ , ou seja dados basais dos tratamentos diferentes significativamente, utilizou-se ANCOVA, com os dados basais de covariável para ajuste. O teste de Spearman foi usado para correlacionar deltas totais (AC + BC) das variáveis com diferença significativa pelos testes de ANCOVA e Teste t para amostras independentes.

## **RESULTADOS**

### **Participantes**

Participaram do estudo 14 indivíduos adultos, destes 5 apresentavam diabetes descontrolado (HbA1c > 7%)(SBD, 2016). Os participantes eram majoritariamente mulheres (71%) e não possuíam deficiência de vitamina D e

PTH (Tabela 2). Todos os indivíduos selecionados finalizaram o estudo e tiveram boa aceitação aos tratamentos oferecidos.

### **Antropometria/ composição corporal e controle glicêmico**

Foram observadas reduções significantes ( $P_{intra}>0,05$ ) de IMC, GC, PC e HbA1c e aumento de MLG em AC, enquanto que em BC houve aumento de GC e HbA1c e redução de MLG. As reduções de IMC (deltas AC= -1,99 kg/m<sup>2</sup>; BC= - 0,09 kg/m<sup>2</sup>), GC (deltas AC= -2,64%; BC= 1,25%); PC (deltas AC= - 6,23cm; BC= -0,29cm) e das concentrações HbA1c (deltas AC= -0,69%; BC= 0,49%) foram significantemente ( $P_{inter}<0,05$ ) maiores em AC relação a BC. Por outro lado, os deltas de MLG (AC= 2,64%; BC= -1,22%;  $P_{inter}<0,001$ ) foram maiores em BC do que em AC (Tabela 3).

### **Estresse Oxidativo**

Verificou-se que os deltas (valor final – inicial) das concentrações de CAT (AC= -12,3  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ ; BC= 36,3  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ ;  $P_{inter}<0,001$ ) e FRAP (AC= -837,8  $\mu\text{mol/ml}$ ; BC= -1,7  $\mu\text{mol/ml}$ ;  $P_{inter}=0,003$ ) obtidos para BC foram maiores que os obtidos para AC (Figura 2). Também foi observado redução de FRAP em AC ( $P_{intra}=0,003$ ) e redução de SOD ( $P_{intra}=0,025$ ) e cálcio sérico ( $P_{intra}=0,009$ ) em BC. Além disso, observamos aumento de CAT em BC ( $P_{intra}=0,001$ ). Variações de SOD e cálcio sérico intra tratamento não resultaram em variações significantes entre os tratamentos ( $P_{inter}>0,050$ ) (Tabela 3).

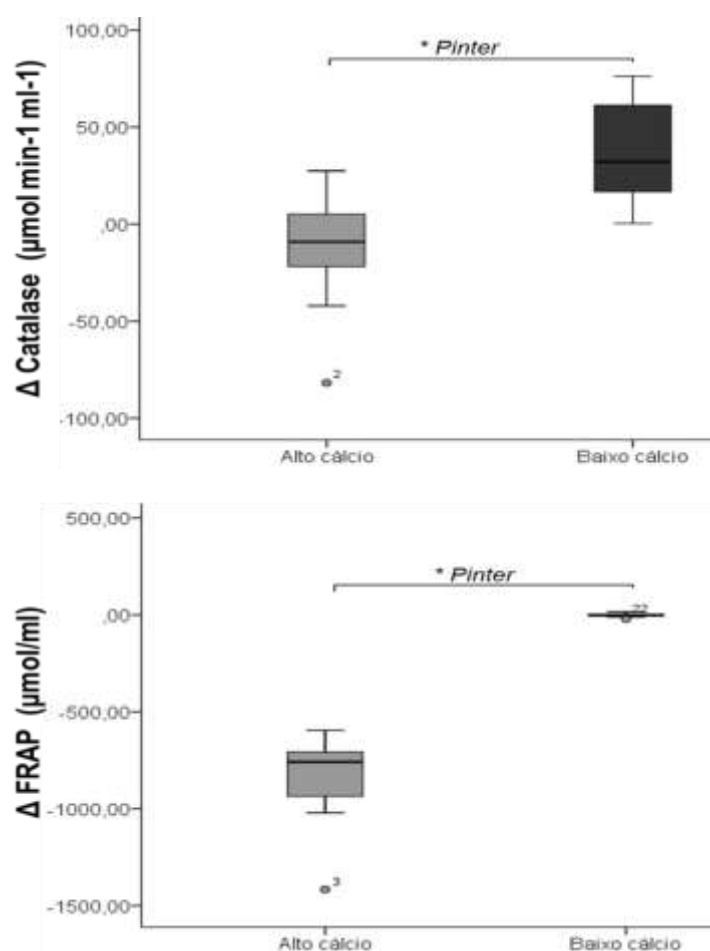
### **Associação entre estresse oxidativo versus antropometria/composição corporal e exames laboratoriais**

As análises de correlação feitas com os valores de delta demonstraram associações positivas entre CAT e HbA1c ( $r=0,461$ ;  $P=0,023$ ), ácido úrico ( $r=0,458$ ;  $P=0,024$ ), GC ( $r=0,606$ ;  $P=0,002$ ) e PCR ( $r=0,458$ ;  $P=0,024$ ) e associação negativa com a ingestão de cálcio. O FRAP também se associou positivamente com a HbA1c ( $r=0,543$ ;  $P=0,009$ ), ácido úrico ( $r=0,487$ ;  $P=0,022$  e), GC ( $r=0,697$ ;  $P<0,001$ ), e com o IMC ( $r=0,438$ ;  $P=0,042$ ) e negativamente com a ingestão de cálcio (FIGURA 3).

**Tabela 2:** Características basais dos participantes (n=14)

Variáveis	Média ± EP
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	29,89 ± 1,17
Gordura Corporal (%)	35,78 ± 1,59
HbA1c (%)	7,11 ± 0,43
Vitamina D (ng/ml)	24,57 ± 1,74
PTH (pg/ml)	43,36 ± 4,96
Ingestão habitual de Cálcio (mg/dia)	388,39 ± 49,22
Ingestão Calórica (kca/dia)	1745,49 ± 134,85

IMC, Índice de Massa Corporal; HbA1c, Hemoglobina Glicada; PTH, hormônio da paratireoide.



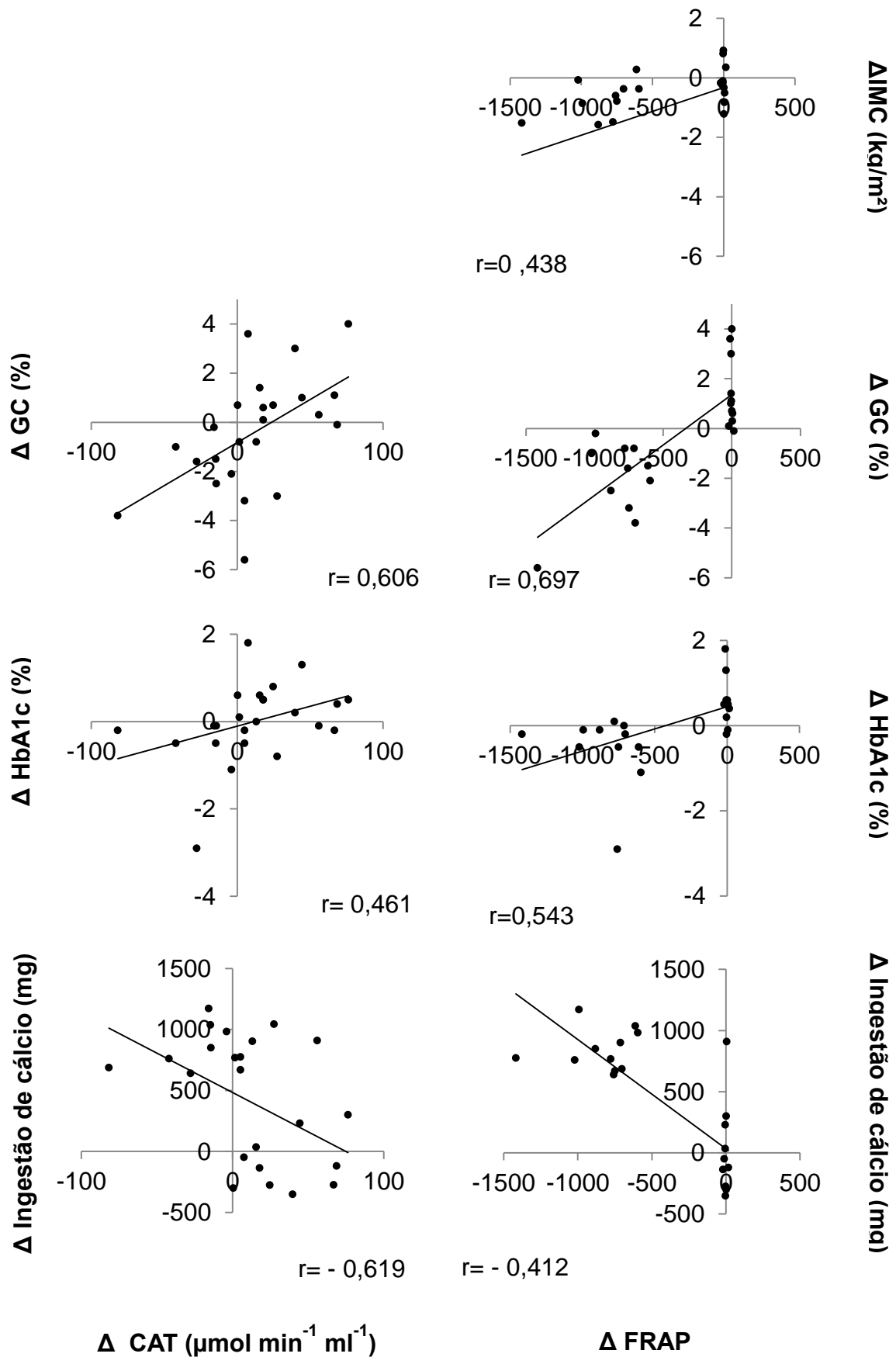
**Figura 2:** Valores de delta (final – antes) obtidos para os tratamentos Alto cálcio (ingestão de 711mg de cálcio bebida + 800mg de Ca/dia da dieta) e Baixo cálcio (ingestão de 7mg de cálcio da bebida + 800mg de Ca/dia da dieta). \* *Pinter* <0,05 pelos Testes t para amostras independentes (Catalase) e ANCOVA (FRAP).



**Tabela 3:** Variáveis antropométricas, de composição corporal e de estresse oxidativo em indivíduos portadores de diabetes tipo 2 com excesso de peso, ao início e ao final dos tratamentos

Variáveis	TRATAMENTOS				p <sub>inter</sub>
	Baixo cálcio		Alto cálcio		
	Inicial	Final	Inicial	Final	
IMC (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>1</sup>	29,0 ± 4,6	28,9 ± 4,8	29,9 ± 4,4 <sup>a</sup>	27,9 ± 4,4 <sup>b</sup>	<b>0,043</b>
Gordura Corporal (%) <sup>1</sup>	32,4 ± 6,0 <sup>a</sup>	33,6 ± 6,6 <sup>b</sup>	35,8 ± 6,0 <sup>a</sup>	33,1 ± 6,7 <sup>b</sup>	<b>&lt;0,001</b>
Massa Livre de Gordura (%) <sup>1</sup>	67,6 ± 6,0 <sup>a</sup>	66,4 ± 6,6 <sup>b</sup>	64,2 ± 6,0 <sup>a</sup>	66,9 ± 6,7 <sup>b</sup>	<b>&lt;0,001</b>
Perímetro da Cintura (cm) <sup>1</sup>	96,6 ± 12,1	96,3 ± 12,7	101,9 ± 11,9 <sup>a</sup>	95,7 ± 11,8 <sup>b</sup>	<b>&lt;0,001</b>
HbA1C (%) <sup>1</sup>	6,4 ± 1,2 <sup>a</sup>	6,9 ± 1,5 <sup>b</sup>	7,1 ± 1,6 <sup>a</sup>	6,4 ± 1,1 <sup>b</sup>	<b>&lt;0,001</b>
Catalase (µmol min <sup>-1</sup> ml <sup>-1</sup> ) <sup>3</sup>	23,4 ± 2,2 <sup>a</sup>	59,7 ± 7,6 <sup>b</sup>	37,0 ± 7,6	24,7 ± 3,1	<b>&lt;0,001</b>
Superóxido Dismutase (U/ml) <sup>2</sup>	243,5 ± 26,9 <sup>a</sup>	182,3 ± 34,3 <sup>b</sup>	392,6 ± 38,2	362,9 ± 45,1	0,265 <sup>*</sup>
Malondialdeído (µmol/ml) <sup>5</sup>	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,419
Óxido Nítrico (µmol/ml) <sup>4</sup>	640,7 ± 111,6	1060,5 ± 362,8	645,8 ± 161,5	867,098 ± 319,3	0,768
Peróxido de Hidrogenio (µmol/ml) <sup>2</sup>	6,4 ± 0,7	6,9 ± 0,8	7,0 ± 0,6	7,2 ± 0,8	0,717
FRAP (µmol/ml) <sup>4</sup>	40,5 ± 2,4	38,8 ± 1,8	871,7 ± 72,8 <sup>a</sup>	33,9 ± 2,4 <sup>b</sup>	<b>0,003<sup>*</sup></b>

Dados apresentados em média ± erro padrão. IMC, índice de massa corporal; HbA1c, hemoglobina glicada; FRAP, *Ferric Reducing Ability of Plasma*. <sup>1</sup>n=14; <sup>2</sup>n=13; <sup>3</sup>n=12; <sup>4</sup>n=11; <sup>5</sup>n=9; <sup>a,b</sup> Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05) entre valor inicial e final de cada tratamento (Teste t pareado). p<sub>inter</sub>, Teste t para amostras independentes entre os valores de delta (final - antes) dos tratamentos. \* ANCOVA para valores de delta (final - inicial) dos tratamentos.



**Figura 3:** Coeficientes de correlação dos deltas totais obtidos para os tratamentos baixo cálcio e alto cálcio. Todas as correlações são significantes ( $P < 0,05$ ), pelo teste de Spearman com significância de. HbA1c, hemoglobina glicada; IMC, índice de massa corporal, CAT, catalase; FRAP, Ferric Reducing Ability of Plasma.

## DISCUSSÃO

Neste estudo, o aumento do consumo de cálcio reduziu IMC, GC, PC e HbA1c, além das concentrações de CAT e *FRAP*. Essa redução foi associada à melhora das medidas antropométricas, da composição corporal e de HbA1c dos nossos participantes, de maneira semelhante à observada em outros estudos (ZEMEL, 2009; ZEMEL et al., 2004). Vários mecanismos têm sido propostos para o possível efeito antiobesogênico do aumento do consumo de cálcio. Dentre eles, pode-se citar: i) a redução da diferenciação de adipócitos, pela supressão do calcitriol (THOMAS et al., 2012; ZEMEL et al., 2000), ii) o aumento da termogênese, pela oxidação de ácidos graxos resultante do aumento da expressão de proteínas de desacoplamento (SHI et al., 2000; SOARES et al., 2012) e iii) o aumento da excreção fecal de lipídeos, uma vez que os mesmos se complexam aos ácidos graxos da dieta formando sabões de cálcio (BOON et al., 2007; BUCHOWSKI et al., 2010). A composição corporal é um dos principais fatores que interferem no controle glicêmico, principalmente em indivíduos com diabetes tipo 2 (SHAW; SICREE; ZIMMET, 2010). Assim como em nosso, autores de outros estudos demonstraram que a redução de gordura corporal promoveu a melhora do controle glicêmico (CUTHBERTSON et al., 2012; MAVROS et al., 2013). Esse efeito pode ter ocorrido em função da redução da resistência insulínica causada pelo excesso de tecido adiposo, que favorece a ocorrência de estresse oxidativo, inibindo receptores de insulina nas células (YE, 2013).

No entanto, o cálcio não possui a capacidade neutralizar radicais livres, como os antioxidantes (SHEBIS et al., 2013). Sabe-se que excesso de gordura corporal, principalmente a gordura localizada na região central, está associado ao desenvolvimento do diabetes e ao aumento do estresse oxidativo (MATSUDA; SHIMOMURA, 2013). O estresse oxidativo resulta do desbalanço no sistema de defesa antioxidante, em que a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs) supera a capacidade de atuação das enzimas antioxidantes no organismo (CHIKEZIE; OJIAKO; OGBUJI, 2015). Quando há diminuição dos estímulos para a geração de EROs, há uma redução da atividade das enzimas antioxidantes, mantendo-se o equilíbrio do sistema (LEI et al., 2016). Dessa maneira, o alto consumo de cálcio em nosso

estudo pode ter reduzido a ocorrência de estresse oxidativo nos participantes do estudo, via redução da gordura corporal e de HbA1c. A redução de geradores de EROs (gordura corporal e hiperglicemia) pode reduzir a resposta antioxidante representada pela diminuição da concentração de catalase e do FRAP.

A perda de peso/gordura corporal, mantida ao longo de 3 anos, promoveu a redução do estresse oxidativo em indivíduos obesos (CHAE et al., 2013). Os possíveis mecanismos envolvidos nesse efeito estão relacionados à provável diminuição da secreção de citocinas inflamatórias (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011) e da expressão de subunidades NADPH oxidase, enzima que converte o oxigênio molecular em seu radical superóxido (DEN HARTIGH et al., 2016; FURUKAWA et al., 2004). Além desses mecanismos, a redução de gordura corporal pode ter elevado a produção de adiponectina, hormônio liberado exclusivamente pelo tecido adiposo e que apresenta propriedades anti-inflamatórias, antiaterogênicas (OKAMOTO et al., 2002) e de aumento da sensibilidade à insulina (YAMAUCHI et al., 2001). Tais propriedades atenuam o estresse oxidativo. A concentração circulante de adiponectina, diminui no excesso de peso, principalmente quando há excesso de gordura visceral. Por outro lado a redução da gordura visceral resulta no aumento da concentração de adiponectina (MATSUDA; SHIMOMURA, 2014). Estudos futuros que incluam marcadores inflamatórios, e de expressão da enzima NADPH oxidase e concentração de adiponectina, são necessários para a confirmação dessas hipóteses, uma vez que todos estão envolvidos no processo de geração de EROs e aumento do estresse oxidativo.

As forças do presente estudo consistem no ineditismo do tema com diabéticos, o uso de desenho do tipo cruzado com amplo intervalo (oito semanas) entre os tratamentos, amostra constituída de indivíduos com muito baixo consumo de cálcio, o monitoramento da ingestão das bebidas testadas em laboratório, a grande similaridade entre a composição nutricional das bebidas teste, a padronização da refeição anterior aos dias de teste, além da realização de uma análise ampla das enzimas de defesa antioxidante e dos seus produtos de oxidação. No entanto, apesar das semelhanças entre os tratamentos, BC não continha em sua composição os mesmos teores de

caseína que AC, e a caseína possui potencial antioxidante (CHENG et al., 2015). A caseína não foi adicionada ao tratamento BC, pois, em produtos lácteos, a maior parte do cálcio encontra-se naturalmente complexado com as micelas de caseína. Desse modo, é impossível adicionar caseína ao tratamento BC e mantê-lo com baixos teores de cálcio. Apesar disso, a proteína do soro do leite adicionada a BC para equiparar o conteúdo proteico de AC, também possui efeito antioxidante (O'KEEFFE; FITZGERALD, 2014). Portanto, é improvável que as diferenças na qualidade das proteínas entre os tratamentos justifiquem nossos resultados.

## **CONCLUSÃO**

O alto consumo de cálcio (~700mg/dia) reduziu a HbA1c e o estresse oxidativo em indivíduos com DM2 e excesso de peso, possivelmente devido a melhora da composição corporal e sensibilidade insulínica nesses participantes. Os resultados deste estudo sugerem que o aumento do consumo de laticínios desnatados seja uma estratégia nutricional interessante a ser adotada durante o tratamento de indivíduos diabéticos com baixo consumo habitual de cálcio.

## REFERENCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- ALAM, R.; KHAN, S.; SALMAN, K. A. MDA and antioxidants status in type 2 diabetes mellitus. **National Journal of Integrated Research in Medicine**, nov. 2013.
- BALL, L. et al. Understanding the nutrition care needs of patients newly diagnosed with type 2 diabetes: a need for open communication and patient-focussed consultations. **Australian Journal of Primary Health**, v. 22, n. 5, p. 416, 2016.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. . **The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay.***Analytical biochemistry*, 1996. Disponível em:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269796902924>>. Acesso em: 10 fev. 2017
- BERGMAN, R. N. A better index of body adiposity - Commentaries. **Obesity**, v. 20, n. 6, p. 1135, jun. 2012.
- BOON, N. et al. An intervention study of the effects of calcium intake on faecal fat excretion, energy metabolism and adipose tissue mRNA expression of lipid-metabolism related proteins. **International journal of obesity (2005)**, v. 31, p. 1704–1712, 2007.
- BUCHOWSKI, M. S. et al. Effect of dairy and non-dairy calcium on fecal fat excretion in lactose digester and maldigester obese adults. **International Journal of Obesity**, v. 34, n. 1, p. 127–135, 13 jan. 2010.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. MDA levels in plasma and TBARs. **Methods Enzymol**, v. 12, n. 52, p. 302–310, 1978.
- CHAE, J. S. et al. Mild weight loss reduces inflammatory cytokines, leukocyte count, and oxidative stress in overweight and moderately obese participants treated for 3 years with dietary modification. **Nutrition Research**, v. 33, n. 3, p. 195–203, 2013.
- CHENG, X. et al. Casein glycomacropeptide hydrolysate exerts cytoprotection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in RAW 264.7 macrophages via ROS-dependent heme oxygenase-1 expression. **RSC Adv.**, v. 5, n. 6, p. 4511–4523, 2015.
- CHIKEZIE, P. C. P.; OJIAKO, O. A. O.; OGBUJI, A. A. C. Oxidative stress in diabetes mellitus. **Int J Biol Chem**, p. 1–9, 2015.
- CUTHBERTSON, D. J. et al. Improved Glycaemia Correlates with Liver Fat Reduction in Obese, Type 2 Diabetes, Patients Given Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) Receptor Agonists. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e50117, 6 dez. 2012.
- DEN HARTIGH, L. J. et al. Adipocyte-Specific Deficiency of NADPH Oxidase 4 Delays the Onset of Insulin Resistance and Attenuates Adipose Tissue Inflammation in Obesity. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, p. ATVBAHA.116.308749, 2016.

DIETERICH, S. et al. Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart. **Circulation**, v. 101, n. 1, 2000.

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, A. et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 5, p. 3117–3132, 2011.

FERRARI, C. K. B. Capacidade antioxidante total (CAT) em estudos clínicos, experimentais e nutricionais. **J Health Sci Inst**, 2010.

FURUKAWA, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **The journal of clinical investigation**, v. 114, n. 12, p. 1752–1761, 2004.

GRISHAM, M. B.; JOHNSON, G. G.; LANCASTER, J. R. QUANTITATION OF NITRATE AND NITRITE IN EXTRACELLULAR FLUIDS. **Methods in enzymology**, v. 268, p. 237–246, 1996.

HOLICK, M. F. et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: An endocrine society clinical practice guideline. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, n. 7, p. 1911–1930, 2011.

IDF, I. D. F. **IDF diabetes atlas - 7th Edition**. Disponível em: <<http://www.diabetesatlas.org/>>. Acesso em: 10 fev. 2017.

JACQMAIN, M. et al. Calcium intake , body composition , and lipoprotein-lipid concentrations in adults. **The American journal of clinical nutrition**, v. 77, n. 11, p. 1448–1452, jun. 2003.

JELLIFFE, D. B. Evolución del estado de nutrición de la comunidad. **Ginebra: Organización Mundial de la Salud**, p. 53–83, 1968.

LEE, H.-J. J. H.-S. S. H. et al. Intakes of dairy products and calcium and obesity in Korean adults: Korean National Health and Nutrition Examination Surveys (KNHANES) 2007-2009. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 2007–2009, jun. 2014.

LEI, X. G. et al. Paradoxical Roles of Antioxidant Enzymes: Basic Mechanisms and Health Implications. **Physiological Reviews**, v. 96, n. 1, p. 307–64, 2016.

MATSUDA, M.; SHIMOMURA, I. Increased oxidative stress in obesity: Implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. **Obesity Research and Clinical Practice**, v. 7, n. 5, p. 330–341, 2013.

MATSUDA, M.; SHIMOMURA, I. Roles of adiponectin and oxidative stress in obesity-associated metabolic and cardiovascular diseases. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 15, n. 1, p. 1–10, 2014.

MAVROS, Y. et al. Changes in Insulin Resistance and HbA1c Are Related to Exercise-Mediated Changes in Body Composition in Older Adults With Type 2 Diabetes: Interim outcomes from the GREAT2DO trial. **Diabetes Care**, v. 36, n. 8, p. 2372–2379, 1 ago. 2013.

MERA, R.; THOMPSON, H.; PRASAD, C. How to Calculate Sample Size for an Experiment: A Case-Based Description. **Nutritional Neuroscience**, v. 1, n. 1, p. 87–91, 13 jan. 1998.

NOUROOZ-ZADEH, J. Ferrous ion oxidation in presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxides in plasma. **Methods in Enzymology**, v. 300, p. 58–62, 1999.

O'KEEFFE, M. B.; FITZGERALD, R. J. Antioxidant effects of enzymatic hydrolysates of whey protein concentrate on cultured human endothelial cells. **International Dairy Journal**, v. 36, n. 2, p. 128–135, 2014.

OKAMOTO, Y. et al. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Circulation**, v. 106, n. 22, p. 2767–2770, 2002.

PIKILIDOU, M. I. et al. Insulin sensitivity increase after calcium supplementation and change in intraplatelet calcium and sodium-hydrogen exchange in hypertensive patients with Type 2 diabetes. **Diabetic Medicine**, v. 26, n. 3, p. 211–219, mar. 2009.

PITTAS, A. G. et al. Vitamin D and calcium intake in relation to type 2 diabetes in women. **Diabetes Care**, v. 29, n. 3, p. 650–656, 2006.

REBBECK, R. T. et al. Skeletal muscle excitation–contraction coupling: Who are the dancing partners? **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 48, p. 28–38, 2014.

SANTOS, L. A. DOS et al. Associação entre proteína C reativa e cofatores da síndrome metabólica em uma amostra de afrodescendentes do estado da Bahia. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 14, n. 3, p. 298–302, 2016.

SANTULLI, G. et al. Calcium release channel RyR2 regulates insulin release and glucose homeostasis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 5, p. 1968–1978, maio 2015.

SBD, S. B. DE D. CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DO DIABETES E DO PRÉ-DIABETES. 2016.

SHAW, J. E.; SICREE, R. A.; ZIMMET, P. Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes research and clinical practice**, v. 87, n. 1, p. 4–14, jan. 2010.

SHEBIS, Y. et al. Natural Antioxidants: Function and Sources. **Food and Nutrition Sciences**, v. 4, n. 6, p. 643–649, 2013.

SHI, H. et al. Role of intracellular calcium in human adipocyte differentiation. **Physiological Genomics**, v. 3, n. 2, p. 75–82, 2000.

SIMMS, B. A. A.; ZAMPONI, G. W. W. Neuronal voltage-gated calcium channels: Structure, function, and dysfunction. **Neuron**, v. 82, n. 1, p. 24–45, abr. 2014.

SOARES, M. J. et al. Mechanistic roles for calcium and vitamin D in the regulation of body weight. **Obesity Reviews**, v. 13, n. 7, p. 592–605, 2012.



TANGVARASITTICHAJ, S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. **World journal of diabetes**, v. 6, n. 3, p. 456–80, 2015.

THOMAS, A. P. et al. A high calcium diet containing nonfat dry milk reduces weight gain and associated adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice when compared to high calcium alone. **Nutrition & Metabolism**, v. 9, n. 1, p. 3, 2012.

TORRES, M. R. S. G.; SANJULIANI, A. F. Effects of weight loss from a high-calcium energy-reduced diet on biomarkers of inflammatory stress, fibrinolysis, and endothelial function in obese subjects. **Nutrition**, v. 29, n. 1, p. 143–151, 2013.

WANG, J. et al. Comparisons of waist circumferences measured at 4 sites. **The American journal of clinical nutrition**, v. 77, n. 2, p. 379–84, fev. 2003.

WHO, W. H. O. **Defining the problem of overweight and obesity. In: World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a Who Consultation. Anais...Geneva: WHO Technical Report Series, 2000**

WOODWARD, E. et al. Skeletal complications and survival in renal cancer patients with bone metastases. **Bone**, v. 48, n. 1, p. 160–166, jan. 2011.

YAMAUCHI, T. et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. **Nature Medicine**, v. 7, n. 8, p. 941–946, 2001.

YE, J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. **Frontiers of Medicine**, v. 7, n. 1, p. 14–24, 9 mar. 2013.

YOUNGWIRTH, L. et al. Parathyroid hormone deficiency after total thyroidectomy: Incidence and time. **Journal of Surgical Research**, v. 163, n. 1, p. 69–71, set. 2010.

ZEMEL, M. B. et al. Regulation of adiposity by dietary calcium. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 14, n. 9, p. 1132–1138, 2000.

ZEMEL, M. B. et al. Calcium and dairy acceleration of weight and fat loss during energy restriction in obese adults. **Obesity research**, v. 12, n. 4, p. 582–590, 2004.

ZEMEL, M. B. Proposed role of calcium and dairy food components in weight management and metabolic health. **The Physician and sportsmedicine**, v. 37, n. 2, p. 29–39, jun. 2009.

**Aumento da ingestão de cálcio reduz uricemia e aumenta creatinina sérica sem afetar a excreção urinária de marcadores da função renal em diabéticos: estudo clínico randomizado controlado por placebo**

**Título curto:** Cálcio e função renal de indivíduos diabéticos

**Nome e endereço da instituição onde o trabalho foi realizado:**

<sup>1</sup> Departamento de Nutrição e Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Brasil.  
Departamento de Nutrição e Saúde - CCB II, Avenida PH Rolfs, Viçosa, MG,  
36570-000, Brasil. Telefone: +55(31)3899 2545. Fax: +55(31)3899 2541. E-  
Mail: dns@ufv.br

**Autor a quem a correspondência deve ser endereçada:**

Letícia Linhares da Silva. Telefone: +55(31)3899 4193. Fax: +55(31)3899 2541.  
E-mail: [lele\\_linharess@yahoo.com.br](mailto:lele_linharess@yahoo.com.br)

**Agradecimento**

Os autores agradecem a Fundação do Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG, ao Conselho Nacional de Pesquisa – CNPQ e a Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior – CAPES pelo suporte financeiro e a BIOCLIN QUIBASA pela doação de kits.

## **RESUMO**

### **Objetivo**

Verificar o efeito do aumento da ingestão de cálcio sobre a função renal de diabéticos tipo 2 com excesso de peso corporal.

### **Métodos**

Quatorze indivíduos adultos, diabéticos tipo 2, com excesso de peso e baixo consumo de cálcio (<600mg/dia) participaram deste estudo controlado, simples cego, do tipo crossover. Os tratamentos, Baixo cálcio (BC, 800mg/dia + bebida placebo) e Alto cálcio (AC, 800mg/dia + bebida láctea 700mg de cálcio), constituíram no consumo diário de bebidas teste, acompanhada por dieta hipocalórica (-500 kcal/dia), contendo 800mg de cálcio que foi prescrita. Cada tratamento teve duração de 12 semanas, com intervalo de oito semanas entre estes. Ao início e ao final do estudo, a composição corporal (Dual energy X-ray absorptiometry – DXA) foi avaliada e amostras de sangue e urina (dosagem de HbA1c, ácido úrico, creatinina, albumina e microalbuminúria) foram coletadas em jejum. O clearance de creatinina (CCr) foi calculado com base na CKD-EPI.

### **Resultados**

Houve redução de ácido úrico sérico ( $p=0,01$ ) e do clearance de creatinina (CCr) ( $p=0,03$ ), além do aumento de creatinina sérica ( $p=0,03$ ) ao final de AC. Por outro lado, em BC ocorreu aumento ( $p=0,03$ ) de ácido úrico. A excreção urinária de nenhum dos compostos avaliados não foi afetada. Foram constatadas correlações positivas ( $p<0,05$ ) entre ácido úrico sérico *versus* a hemoglobina glicada, a gordura corporal (GC) e o perímetro da cintura (PC), entre a creatinina sérica *versus* a massa livre de gordura (MLG) e entre o CCr *versus* a GC e o PC. Correlações negativas ( $p<0,05$ ) ocorreram entre ácido úrico sérico *versus* a ingestão de cálcio e a MLG, entre a creatinina sérica *versus* a GC e o PC e entre o CCr *versus* a MLG.

### **Conclusão**

O consumo de dieta hipocalórica rica em cálcio possui efeito antiobesogênico, hipouricemiante e redutor de HbA1c em indivíduos diabéticos tipo 2 com excesso de peso, independente de alterações na uricosúria, nos níveis séricos de PTH e na função renal.

## **INTRODUÇÃO**

O diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) é uma doença que comumente está associada a doença renal crônica (DRC). Estima-se que 50% dos indivíduos com DM2 possuam DRC, a qual influencia fortemente o prognóstico do diabetes (THOMAS; COOPER; ZIMMET, 2016). O tratamento dietético tem papel importante no controle da doença. Nesse sentido, o consumo de dieta hipocalórica favorece a redução da gordura corporal e conseqüentemente o controle glicêmico em indivíduos com excesso de peso. (JACKNESS et al., 2013). Além disso, tem sido demonstrado que o consumo adequado de cálcio pode reduzir o risco de obesidade, diabetes tipo 2 e de hipertensão (FERREIRA; TORRES; SANJULIANI, 2013; JACQMAIN et al., 2003; ROSENBLUM et al., 2012). No entanto, encontramos apenas um estudo em que se avaliou o efeito da ingestão dietética desse nutriente sobre a função renal. (CURHAN et al., 1993), sendo ausentes estudos envolvendo indivíduos diabéticos.

Há evidências de que o consumo de cálcio se relaciona inversamente às concentrações de ácido úrico sérico e ao risco de DRC (DALBETH et al., 2008; GOPINATH et al., 2016). Porém, até o momento, ainda não se sabe sobre quais metabólitos séricos e urinários o cálcio pode influenciar, bem como ele atua. Diante disso, o objetivo do presente estudo é verificar o efeito da alta ingestão de cálcio sobre a função renal de diabéticos tipo 2 com excesso de peso corporal.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

O presente estudo faz parte de um estudo maior controlado, simples cego, do tipo crossover com 24 semanas de duração em que se avaliou o efeito do aumento da ingestão de cálcio sobre parâmetros bioquímicos, antropométricos e de composição corporal em diabéticos do tipo 2 com excesso de peso corporal. Participaram do estudo 14 indivíduos portadores de diabetes tipo 2, em uso de hipoglicemiantes orais, com excesso de peso, baixo consumo de cálcio (< 600mg) e idade entre 20 -59 anos. Não foram incluídos: indivíduos fumantes; gestantes ou lactantes; em uso de suplementos; com consumo regular de álcool acima de 2 doses/dia (> 20g de etanol/dia) e de

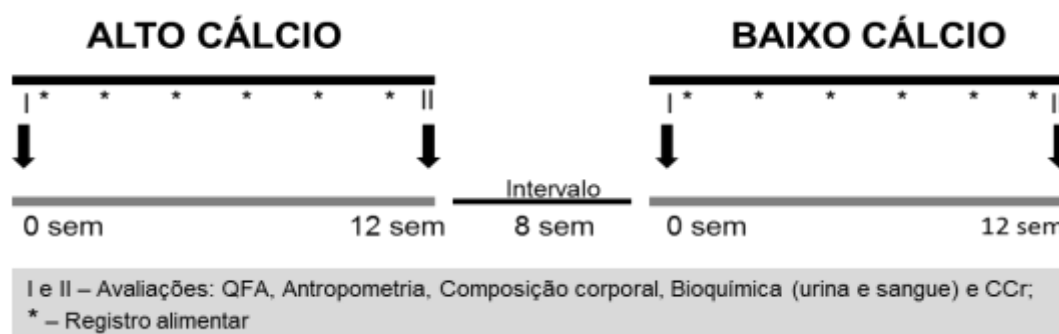
caféina superior a 1250 mg; com ingestão habitual de cálcio, avaliado por questionário de frequência alimentar (QFA) e registros alimentares, maior que 600mg mg/d; com alteração de peso ( $\pm$  5kg) e de nível de atividade física nos últimos 3 meses; anêmicos, portadores de outras patologias (hepática, cardíaca e intestinal) ou que sofreram algum tipo de intervenção no trato gastrointestinal, além de indivíduos com aversão ou intolerância aos alimentos fornecidos no estudo.

Foram prescritas dietas hipocalóricas (-500 kcal/dia) contendo 800mg de cálcio por dia e os indivíduos participaram dos tratamentos: Baixo cálcio (BC, 800mg/dia + bebida placebo) e Alto cálcio (AC, 800mg/dia + bebida a base de leite 700mg de cálcio). Cada etapa teve uma duração de 12 semanas. Houve um intervalo de oito semanas entre os tratamentos. As bebidas foram oferecidas em laboratório e tinham composição nutricional semelhante em macro e micronutrientes, com exceção para o cálcio. Para igualar a composição das bebidas, com exceção do teor de cálcio, adicionou-se à BC proteína de soro do leite (Bem Vital, Diacom<sup>®</sup>), cloreto de sódio (Cisne<sup>®</sup>). Ambos os tratamentos continham teores semelhantes de macro e micronutrientes, com exceção ao cálcio. Peso, altura, IMC, perímetro da cintura (PC, medida pela cicatriz umbilical (Wang et al., 2003), gordura corporal (GC), massa livre de gordura (MLG) ((Dual energy X-ray absorptiometry - DXA) (GE Healthcare Lunar Prodigy Advance DXA System versão 13.31)) e as concentrações de vitamina D, paratormônio (PTH) hemoglobina glicada (HbA1c) e glicose de jejum foram mensurados antes e ao final de cada etapa, segundo métodos laboratoriais padronizados, utilizados pela Divisão de Saúde da Universidade Federal de Viçosa, onde foram realizadas as análises. Foram considerados deficiência de Vitamina D e PTH, valores <20 ng/ml (HOLICK et al., 2011) e <10 pg/ml (YOUNGWIRTH et al., 2010), respectivamente. A ingestão alimentar diária foi monitorada por meio de registros alimentares a cada 15 dias. A atividade física foi mantida constante durante o estudo (Figura 1).

Após jejum noturno (10 a 12 horas), foram coletadas amostras de sangue e urina para se avaliar a função renal. Os participantes foram orientados a coletar toda a urina nas 4 horas antecedentes à chegada ao

laboratório (a partir de 3 horas da manhã). Foram determinadas as concentrações de ácido úrico, creatinina, albumina e microalbuminúria por testes enzimáticos não colorimétricos. O clearance de creatinina foi calculado pela equação de CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration), Fórmula =  $141 \times \min(\text{CrS}/\kappa, 1)^\alpha \times \max(\text{CrS}/\kappa, 1)^{-1,209} \times 0,993^{\text{Idade}} \times 1,018$  [se feminino]  $\times 1,159$  [se negro] (SELISTRE et al., 2016). Foi considerada alteração da função renal valores  $> 1,2$  mg/dL para a creatinina sérica (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2002)  $< 60$  mL/min./1,73 m<sup>2</sup> para o clearance de creatinina (BURMEISTER, 2007). Padronizou-se a ultima refeição do dia, para todos os dias antecedentes às coletas, evitando qualquer interferência do conteúdo de macro e micronutrientes ingeridos.

O poder de 80% do estudo foi calculado, com nível de significância de 5%, considerando-se encontrar diferença de 10% nas concentrações de ácido úrico no grupo tratado com cálcio. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, 2011, versão 20,0), com nível de significância de 5%. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para variáveis com distribuição normal utilizou-se o Teste t pareado, para comparação entre o período antes e final da mesma etapa (AC; BC). Teste t para amostras independentes, para comparação dos dados basais e comparação entre os deltas (final - antes) de AC e BC, de variáveis com  $P > 0,05$  para os dados basais. Para variáveis com dados basais  $P < 0,05$ , utilizou-se ANCOVA. Para variáveis com distribuição não normal foram usados os testes alternativos, Wilcoxon e Mann-Whitney. O teste de Spearman foi usado para correlacionar deltas totais (AC + BC) das variáveis com diferença significativa pelos testes de ANCOVA e Teste t para amostras independentes.



**Figura 1:** Desenho experimental.

## RESULTADOS

Todos os participantes selecionados finalizaram o estudo, tiveram boa tolerância aos tratamentos oferecidos e apresentaram função renal normal antes do início e durante todo o estudo, segundo os critérios utilizados. Como características basais os indivíduos possuíam, em média, 49 anos de idade, IMC de 30, GC de 36%, PC de 104 cm, glicemia de jejum de 131 mg/dl, HbA1c de 7% e ingestão habitual de cálcio de aproximadamente 400mg/dia.

A ingestão aumentada de cálcio resultou em maior redução de IMC (delta AC= -1,99 kg/m<sup>2</sup>; Delta BC= - 0,09 kg/m<sup>2</sup>), GC (delta AC= -2,64%; BC= 1,25%), PC (AC= -6,23cm; BC= -0,29cm) e HbA1c (AC= -0,69%; BC= 0,49%), além do aumento de MLG comparado ao tratamento com menor ingestão desse nutriente (Dados não representados). Os resultados das análises de covariância ajustadas pelos dados basais demonstraram que enquanto a concentração sérica de ácido úrico reduziu em AC (-0,41mg/dL), houve aumento dessa mesma variável (0,51mg/dL) em BC ( $P_{inter}=0,005$ ). Nenhuma das dosagens urinárias foi afetada durante o estudo (Tabela 1). Durante a etapa AC houve redução das concentrações séricas de ácido úrico ( $P=0,01$ ) e do CCr ( $P=0,03$ ), além de aumento da creatinina sérica ( $P=0,03$ ). Houve aumento de ácido úrico sérico ( $p=0,03$ ) em BC. Apesar dos resultados apresentados todas as variáveis permaneceram dentro dos seus respectivos valores de referência.

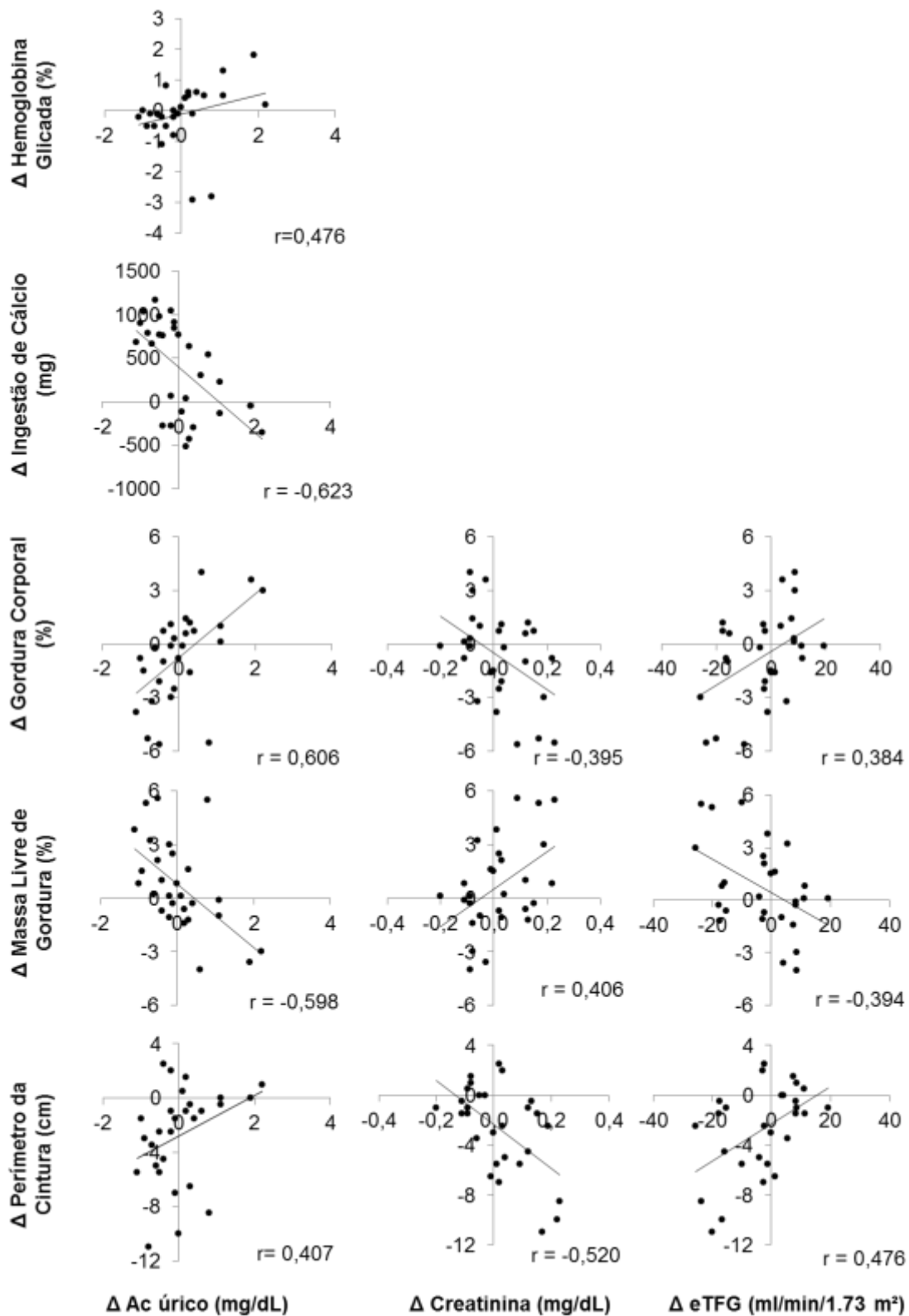
Análises de correlação realizadas com valores de delta indicaram correlações significantes entre as concentrações séricas de ácido úrico, creatinina e a eTFG com diferentes indicadores de adiposidade e de controle glicêmico. O ácido úrico se correlacionou positivamente com GC ( $r=0,606$ ;  $P<0,001$ ), PC ( $r=0,407$ ;  $P=0,03$ ) e HbA1c ( $r=0,476$  ;  $P=0,01$ ). De maneira semelhante, a creatinina se correlacionou positivamente com MLG ( $r=0,406$ ;  $P=0,03$ ), e o CCr com a GC ( $r=0,384$ ;  $P=0,04$ ) e o PC ( $r=0,476$ ;  $P=0,01$ ). Correlações negativas foram observadas entre ácido úrico e a MLG ( $r=-0,598$ ;  $P=0,001$ ) e entre ácido úrico e a ingestão de cálcio ( $r=-0,623$ ;  $P<0,001$ ). A creatinina se correlacionou negativamente com PC ( $r=-0,520$ ;  $P<0,001$ ) e com GC ( $r=-0,395$ ;  $P=0,04$ ), e o CCr com a MLG ( $r=-0,394$ ;  $P=0,04$ ) (Figura 2).

**Tabela 1:** Variáveis relacionadas ao funcionamento renal em indivíduos portadores de diabetes tipo 2 com excesso de peso, ao início e ao final dos tratamentos

Variáveis	Baixo cálcio		Alto cálcio		<i>P</i> <sub>INTER</sub>
	Inicial	Final	Inicial	Final	
<i>Soro</i>					
Ácido úrico (mg/dL)	3,03 ± 0,56 <sup>a</sup>	3,54 ± 1,06 <sup>b</sup>	3,61 ± 0,88 <sup>a</sup>	3,20 ± 0,78 <sup>b</sup>	<b>0,005 *</b>
Albumina (g/dL)	4,26 ± 0,17	4,31 ± 0,15	4,26 ± 0,13	4,19 ± 0,16	0,051
Creatinina (mg/dL)	0,85 ± 0,14	0,82 ± 0,09	0,78 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,85 ± 0,10 <sup>b</sup>	<b>0,028</b>
CCr (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> ) <sup>1</sup>	100,8 ± 17,2	102,53 ± 15,3	107,7 ± 20,9 <sup>a</sup>	100,3 ± 18,0 <sup>b</sup>	<b>0,044</b>
<i>Urina</i>					
Ácido úrico (mg/dL)	6,96 ± 1,62	7,16 ± 1,92	8,03 ± 1,17	7,54 ± 1,82	0,409 *
Microalbumina (mg/dL)	42,59 ± 40,30	43,48 ± 38,92	39,41 ± 27,14	25,11 ± 22,51	0,371
Creatinina (mg/dL)	59,18 ± 29,22	67,49 ± 30,85	57,42 ± 26,45	44,64 ± 25,64	0,102

Dados apresentados em média ± DP. eTFG, estimativa da taxa de filtração glomerular. <sup>a,b</sup> Letras diferentes indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre valor antes e final de cada etapa experimental (Teste t pareado). *P*<sub>INTER</sub> Teste t para amostras independentes entre os valores de delta (final - antes) dos tratamentos ( $P < 0,05$ ). \* ANCOVA para valores de delta (final – antes), estatisticamente diferentes ( $P < 0,05$ ).





**Figura 1:** Coeficientes de correlação dos deltas totais (BC + AC) das variáveis avaliadas no estudo. Todas as correlações foram significantes ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Spearman. eTFG, estimativa da taxa de filtração glomerular.

## DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que o alto consumo de cálcio reduziu o IMC, a gordura corporal, o perímetro da cintura, HbA1c e a uricemia e aumentou a massa livre de gordura e as concentrações sérica de creatinina em indivíduos com diabetes tipo 2, excesso de peso e baixa ingestão habitual de cálcio. Esses efeitos foram independentes de alterações na excreção urinária desses compostos. As análises de correlação sugeriram o efeito do cálcio na melhora da composição corporal e do controle glicêmico e redução da uricemia observada em nosso estudo.

O efeito do consumo de cálcio na melhora da composição corporal tem sido demonstrado em indivíduos com excesso de peso (FERREIRA; TORRES; SANJULIANI, 2013; ZEMEL et al., 2009). Constatamos que o aumento da ingestão de cálcio também reduziu o risco de obesidade, pela melhora da composição corporal, promovendo melhora do controle glicêmico (MAVROS et al., 2013) em indivíduos com DM2. Esse efeito tem sido atribuído ao aumento da termogênese (SOARES et al., 2012), da excreção fecal de gordura (BUCHOWSKI et al., 2010) e da redução na diferenciação de adipócitos (THOMAS et al., 2012).

Até recentemente, a redução da uricemia decorrente do aumento da ingestão de cálcio era atribuída ao efeito redutor desse nutriente sobre as concentrações de PTH, hormônio responsável pela diminuição da excreção urinária de ácido úrico (CHIN; NIRWANA; NGAH, 2015). Dessa maneira, o consumo de cálcio promoveria a maior excreção de ácido úrico na urina por reduzir as concentrações de PTH. De fato, Dalbeth *et al* (2008) observaram redução significativa das concentrações de PTH em homens com mais de 40 anos, após suplementação de 600mg e 1200mg de cálcio durante 3 e 24 meses. Contudo, não houve influência do tratamento sobre a uricemia. Não foram observadas alterações das concentrações de PTH ou de uricosúria, apesar da uricemia ter sido afetada. Considerando os resultados do estudo anterior (DALBETH et al., 2008), nossos resultados sugerem a existência de outros mecanismos exercidos pelo cálcio no controle da uricemia.

Estudo em modelo animal demonstrou que o tecido adiposo, principalmente o visceral, é capaz de produzir ácido úrico de forma semelhante a órgãos como o intestino delgado e o fígado, por meio da expressão e atividade da xantina oxidoreductase (TSUSHIMA et al., 2013). Essa enzima é responsável pela catalisação das purinas a ácido úrico, podendo ser considerada o elo entre o excesso de peso e a hiperuricemia. Dessa forma, a redução da massa gorda dos nossos voluntários, após o alto consumo de cálcio, pode ter sido responsável pela redução da uricemia nesses indivíduos. Entretanto, para a confirmação dessa hipótese, são necessários estudos para se avaliar a atividade da enzima xantina oxidoreductase.

Na prática clínica, a avaliação da concentração plasmática de creatinina é a medida mais utilizada no cálculo da eTFG para a avaliação da função renal. No entanto, esta equação leva em consideração apenas as concentrações séricas desse composto (FERGUSON; WAIKAR, 2012). Em nosso estudo, observamos o aumento da concentração sérica de creatinina ao final da etapa AC e a consequente redução da eTFG, sem alterações na excreção urinária deste e de outros compostos. Tendo como base nossos dados de correlação, acreditamos que o aumento da concentração sérica de creatinina pelo alto consumo de cálcio tenha ocorrido em função do aumento da MLG dos participantes e não necessariamente indica prejuízos na função renal. A creatinina é um produto da degradação do fosfato de creatinina no músculo. Sob função renal estável, a creatina é geralmente produzida a uma taxa relativamente constante pelo corpo, dependendo da quantidade absoluta de massa muscular (PATEL et al., 2013). Assim, uma vez que ocorra aumento da MLG, há uma elevação das concentrações séricas de creatinina.

Nosso estudo possui vários pontos fortes, entre eles: o ineditismo do tema, o uso de desenho em crossover com amplo intervalo entre os tratamentos, o monitoramento em laboratório do consumo das bebidas testadas, a grande similaridade da composição nutricional das bebidas teste, a padronização da refeição anterior à coleta, a coleta de dados séricos e urinários e o uso de métodos estatísticos para a exclusão de variáveis de interferência. No entanto, nosso estudo também possui limitações. Apesar das semelhanças entre os tratamentos, BC não continha em sua composição os

mesmos teores de caseína que AC. A maior parte do cálcio está naturalmente complexada com micelas de caseína (GAUCHERON, 2005), sendo assim impossível incluir caseína em BC sem aumentar o cálcio nesse tratamento. No entanto, a proteína do soro do leite adicionada a BC para equiparar o conteúdo proteico de AC possui o mesmo efeito sobre a redução de ácido úrico que a caseína (GARREL et al., 1991). Portanto, tais limitações não eliminam os efeitos positivos do aumento da ingestão de cálcio.

Verificamos que o consumo ~711 mg de cálcio por dia possui efeito antiobesogênico e hipouricemiante independente de alterações na uricosúria, nos níveis séricos de PTH e na função renal. Assim, nossos dados sugerem que o papel do cálcio sobre alterações nas concentrações séricas de ácido úrico e creatinina seja decorrente da melhora da composição corporal e não das alterações da função renal desses indivíduos.

#### **Declaração de conflito de interesse**

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## REFERENCIAS

BUCHOWSKI, M. S. et al. Effect of dairy and non-dairy calcium on fecal fat excretion in lactose digester and maldigester obese adults. **International Journal of Obesity**, v. 34, n. 1, p. 127–135, 13 jan. 2010.

BURMEISTER, J. E. Creatinina plasmática normal significa função renal normal? v. 51, n. 2, p. 114–120, 2007.

CHIN, K.-Y. Y.; NIRWANA, S. I.; NGAH, W. Z. W. Significant association between parathyroid hormone and uric acid level in men. **Clin Interv Aging**, v. 10, p. 1377–1380, 2015.

CURHAN, G. C. et al. A prospective study of dietary calcium and other nutrients and the risk of symptomatic kidney stones. **The New England journal of medicine**, v. 328, n. 12, p. 833–8, mar. 1993.

DALBETH, N. et al. The effect of calcium supplementation on serum urate: analysis of a randomized controlled trial. **Rheumatology**, v. 48, n. 2, p. 195–197, nov. 2008.

FERGUSON, M. A.; WAIKAR, S. S. Established and emerging markers of kidney function. **Clinical Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 680–689, 2012.

FERREIRA, T. DA S.; TORRES, M. R. S. G.; SANJULIANI, A. F. Dietary calcium intake is associated with adiposity, metabolic profile, inflammatory state and blood pressure, but not with erythrocyte intracellular calcium and endothelial function in healthy pre-menopausal women. **The British journal of nutrition**, v. 110, n. 6, p. 1079–88, set. 2013.

GARREL, D. R. et al. Milk- and soy-protein ingestion: acute effect on serum uric acid concentration. **The American journal of clinical nutrition**, v. 53, n. 3, p. 665–9, mar. 1991.

GAUCHERON, F. The minerals of milk. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, n. 4, p. 473–483, jul. 2005.

GOPINATH, B. et al. Associations between dairy food consumption and chronic kidney disease in older adults. **Scientific Reports**, v. 6, p. 39532, 2016.

HOLICK, M. F. et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: An endocrine society clinical practice guideline. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, n. 7, p. 1911–1930, 2011.

JACKNESS, C. et al. Very Low-Calorie Diet Mimics the Early Beneficial Effect of Roux-en-Y Gastric Bypass on Insulin Sensitivity and  $\beta$ -Cell Function in Type 2 Diabetic Patients. **Diabetes**, v. 62, n. 9, 2013.

JACQMAIN, M. et al. Calcium intake, body composition, and lipoprotein-lipid concentrations in adults. **The American journal of clinical nutrition**, v. 77, n. 11, p. 1448–1452, jun. 2003.

MAVROS, Y. et al. Changes in Insulin Resistance and HbA1c Are Related to Exercise-Mediated Changes in Body Composition in Older Adults With Type 2 Diabetes: Interim outcomes from the GREAT2DO trial. **Diabetes Care**, v. 36, n. 8, p. 2372–2379, 1 ago. 2013.

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. **American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation**, v. 39, n. 2 Suppl 1, p. S1-266, fev. 2002.

PATEL, S. S. et al. Serum creatinine as a marker of muscle mass in chronic kidney disease: Results of a cross-sectional study and review of literature. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 4, n. 1, p. 19–29, 2013.

ROSENBLUM, J. L. J. et al. Calcium and vitamin D supplementation is associated with decreased abdominal visceral adipose tissue in overweight and obese adults. **The American journal ...**, v. 95, n. 1, p. 101–8, jan. 2012.

SELISTRE, L. et al. Comparison of the Schwartz and CKD-EPI Equations for Estimating Glomerular Filtration Rate in Children, Adolescents, and Adults: A Retrospective Cross-Sectional Study. **PLOS Medicine**, v. 13, n. 3, p. e1001979, 29 mar. 2016.

SOARES, M. J. et al. Mechanistic roles for calcium and vitamin D in the regulation of body weight. **Obesity Reviews**, v. 13, n. 7, p. 592–605, 2012.

THOMAS, A. P. et al. A high calcium diet containing nonfat dry milk reduces weight gain and associated adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice when compared to high calcium alone. **Nutrition & Metabolism**, v. 9, n. 1, p. 3, 2012.

THOMAS, M. C.; COOPER, M. E.; ZIMMET, P. Changing epidemiology of type 2 diabetes mellitus and associated chronic kidney disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 12, n. 2, p. 73–81, 2016.

TSUSHIMA, Y. et al. Uric acid secretion from adipose tissue and its increase in obesity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 38, p. 27138–27149, 2013.

YOUNGWIRTH, L. et al. Parathyroid hormone deficiency after total thyroidectomy: Incidence and time. **Journal of Surgical Research**, v. 163, n. 1, p. 69–71, set. 2010.

ZEMEL, M. B. et al. Dairy-rich diets augment fat loss on an energy-restricted diet: A multicenter trial. **Nutrients**, v. 1, n. 1, p. 83–100, 2009.

## **CONCLUSÃO GERAL**

Os resultados desse estudo indicam que o consumo de aproximadamente 2,4 porções de leite desnatado (~711 mg cálcio/dia) associado a ingestão de dieta hipocalórica (redução de 500 kcal/dia, 800 mg de cálcio de fontes alimentares / dia) por 12 semanas promoveu a redução do perímetro da cintura, do IMC, além de resultar em benefícios à composição corporal (redução da gordura corporal e aumento da massa livre de gordura GC) em diabéticos com excesso de peso corporal e baixa ingestão habitual de cálcio (<600 mg/dia). Verificou-se ainda que o aumento da ingestão de cálcio promoveu a redução dos indicadores de estresse oxidativo (catalase e FRAP), e da concentração de ácido úrico e de HbA1c no sangue nesses indivíduos.

Assim, o aumento da ingestão de cálcio mostrou ser uma estratégia dietética eficaz a ser utilizada no tratamento de pacientes diabéticos com baixo consumo de cálcio. Estudos de longa duração são necessários para se avaliar os efeitos desse tratamento em indivíduos pré-diabéticos e com resistência insulínica, visando a prevenção da manifestação de DM tipo 2.

## REFERENCIAS

- AKTER, S. et al. Dairy consumption is associated with decreased insulin resistance among the Japanese. **Nutrition Research**, v. 33, n. 4, p. 286–292, 2013.
- BASTOS, M. G.; BREGMAN, R.; KIRSZTAJN, G. M. Doença renal crônica: frequente e grave, mas também prevenível e tratável. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 2, p. 248–253, 2010.
- BOON, N. et al. An intervention study of the effects of calcium intake on faecal fat excretion, energy metabolism and adipose tissue mRNA expression of lipid-metabolism related proteins. **International journal of obesity (2005)**, v. 31, p. 1704–1712, 2007.
- CHIKEZIE, P. C. P.; OJIAKO, O. A. O.; OGBUJI, A. A. C. Oxidative stress in diabetes mellitus. **Int J Biol Chem**, p. 1–9, 2015.
- CHOI, HK WILLETT, WC STAMPFER, MJ RIMM, E HU, F. Dairy Consumption and Risk of Type 2 Diabetes Mellitus in Men. **Archives of Internal Medicine**, v. 165, p. 997–1003., 2005.
- COUILLARD, C. et al. Circulating levels of oxidative stress markers and endothelial adhesion molecules in men with abdominal obesity. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 90, n. 12, p. 6454–6459, dez. 2005.
- DALBETH, N. et al. Acute effect of milk on serum urate concentrations: a randomised controlled crossover trial. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 69, n. 9, p. 1677–82, 2010.
- ELMADFA, I. European nutrition and health report 2009. **Karger Medical and Scientific Publishers**, v. 62, 2009.
- GOMES, M. D. B. et al. Prevalência de sobrepeso e obesidade em pacientes com diabetes mellitus do tipo 2 no Brasil: estudo multicêntrico nacional. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 1, p. 136–144, 2006.
- GUAN, S.-S. et al. The pathological role of advanced glycation end products-downregulated heat shock protein 60 in islet  $\beta$ -cell hypertrophy and dysfunction. **Oncotarget**, v. 7, n. 17, p. 23072–87, 26 abr. 2016.
- HASLER, C. M.; BROWN, A. C. Position of the American Dietetic Association: functional foods. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 109, n. 4, p. 735–46, abr. 2009.
- HE, Y. et al. [Status of dietary calcium intake of Chinese residents]. **Wei sheng yan jiu = Journal of hygiene research**, v. 36, n. 5, p. 600–2, set. 2007.
- IDF, I. D. F. **IDF diabetes atlas - 7th Edition**. Disponível em: <<http://www.diabetesatlas.org/>>. Acesso em: 10 fev. 2017.
- INDULEKHA, K. et al. Association of visceral and subcutaneous fat with glucose intolerance, insulin resistance, adipocytokines and inflammatory markers in Asian Indians (CURES-113). **Clinical Biochemistry**, v. 44, n. 4, p. 281–287, 2011.
- JOSSE, A. R. et al. Increased Consumption of Dairy Foods and Protein during Diet- and Exercise-Induced Weight Loss Promotes Fat Mass Loss and Lean Mass Gain in Overweight and Obese Premenopausal Women. **Journal of Nutrition**, v. 141, n. 9, p. 1626–1634, 1 set. 2011.



- KASSAB, A.; PIWOWAR, A. Cell oxidant stress delivery and cell dysfunction onset in type 2 diabetes. **Biochimie**, v. 94, n. 9, p. 1837–1848, 2012.
- LAN-PIDHAINY, X.; WOLEVER, T. M. The hypoglycemic effect of fat and protein is not attenuated by insulin resistance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 91, n. 1, p. 98–105, 1 jan. 2010.
- LIU, S. et al. A prospective study of dairy intake and the risk of type 2 diabetes in women. **Diabetes Care**, v. 29, n. 7, p. 1579–1584, 2006.
- LOPES, C. A. C. S. et al. Consumo de nutrientes em adultos e idosos em estudo de base populacional: Projeto Bambuí. **Cadernos de Saúde**, v. 21, n. 4, p. 1201–1209, 2005.
- MATSUDA, M.; SHIMOMURA, I. Increased oxidative stress in obesity: Implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. **Obesity Research and Clinical Practice**, v. 7, n. 5, p. 330–341, 2013.
- OTT, C. et al. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox Biology**, v. 2, n. 1, p. 411–429, 2014.
- PERES, L. A. B. et al. Biomarkers of acute kidney injury. **Jornal brasileiro de nefrologia : 'orgão oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia**, v. 35, n. 3, p. 229–36, 2013.
- PINHEIRO, M.; SCHUCH, N.; GENARO, P. Nutrient intakes related to osteoporotic fractures in men and women—The Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). **Nutrition**, 2009.
- PRENTICE, A. M. Dairy products in global public health. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 99, n. 5, p. 1212S–1216S, maio 2014.
- RALSTON, R. A. et al. A systematic review and meta-analysis of elevated blood pressure and consumption of dairy foods. **Journal of Human Hypertension**, v. 26, n. 1, p. 3–13, 10 jan. 2012.
- RIDEOUT, T. C. et al. Consumption of low-fat dairy foods for 6 months improves insulin resistance without adversely affecting lipids or bodyweight in healthy adults: a randomized free-living cross-over study. **Nutrition Journal**, v. 12, n. 1, p. 56, 2 dez. 2013.
- SAIKI, A. et al. Effect of weight loss using formula diet on renal function in obese patients with diabetic nephropathy. **Int.J.Obes.(Lond)**, v. 29, n. 0307–0565 (Print), p. 1115–1120, 2005.
- SESSO, R. C. C. et al. Censo Brasileiro de Diálise. **J Bras Nefol**, v. 32, p. 380–384, 2010.
- SIVITZ, W. I.; YOREK, M. A. Mitochondrial Dysfunction in Diabetes: From Molecular Mechanisms to Functional Significance and Therapeutic Opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 4, p. 537–577, 15 fev. 2010.
- TONG, X. et al. Dairy consumption and risk of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of cohort studies. **European journal of clinical nutrition**, v. 65, n. 9, p. 1027–1031, 2011.
- WICKMAN, C.; KRAMER, H. Obesity and kidney disease: potential mechanisms. **Semin Nephrol**, v. 33, n. 1, p. 14–22, jan. 2013.

## Anexo 1



Universidade Federal de Viçosa  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Departamento de Nutrição e Saúde



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

“Concordo voluntariamente em participar desse projeto de pesquisa “*Efeito do aumento da ingestão de cálcio na permeabilidade e microbiota intestinais em diabéticos do tipo 2 com excesso de peso*” que tem como finalidade avaliar o efeito de do aumento da ingestão de cálcio na permeabilidade e microbiota intestinais em indivíduos portadores de diabetes tipo 2 com excesso de peso, com duração de 12 semanas. Outras pesquisas demonstram os benefícios do consumo de cálcio na lipólise, resistência insulínica e controle glicêmico. Por isso, este estudo se justifica pela perspectiva de avaliar se o cálcio interfere na permeabilidade e microbiota intestinais, intermediando os efeitos benéficos do cálcio na prevenção e tratamento do diabetes *mellitus*. Durante o estudo, participarei de reuniões semanais. Quinzenalmente, serão agendadas consultas quando haverá avaliação do peso corporal, da composição corporal (com uso de Absorciometria com Raios-X de Dupla Energia - DEXA) e da ingestão alimentar. Nessas consultas, serão prescritas dietas individuais e receberei aconselhamento dietético. Ao início e ao fim do estudo, responderei a questionários e serei submetido a exames para avaliação da microbiota, da permeabilidade intestinal e dos parâmetros bioquímicos (glicemia de jejum, paratormônio, 25 dihidroxi-vitamina D, insulinemia; e níveis de frutamina, hemoglobina, hemoglobina glicada (HbA1c), albumina glicada, ácido úrico, triglicérides, colesterol total e frações, lipopolissacarídeo, interleucina 6, fator de necrose tumoral, proteína C reativa e adiponectina). Poderei ser alocado em grupo experimental ou controle, de acordo com o sorteio realizado pelos pesquisadores. Terei que entregar amostras de fezes e urina, além de coletar amostras de sangue por punção venosa durante o experimento. No momento da coleta de sangue, poderá haver sensação incômoda e pequenos hematomas poderão aparecer no dia seguinte à coleta, em decorrência da

punção da pele. Para minimizar estes riscos, a coleta sanguínea será realizada por profissional de enfermagem habilitado para a realização desses procedimentos, sendo as coletas feitas com o paciente em posição confortável. Após a coleta, o local da punção será comprimido durante quatro a seis minutos, evitando a perda de maiores quantidades de sangue. O aparelho DEXA, usado na avaliação da composição corporal dos voluntários, utiliza doses mínimas de radiação, sem risco significativo para a saúde. Não existe risco de reação adversa no procedimento indicado anteriormente, uma vez que para esse tipo de avaliação não se emprega qualquer tipo de medicamento, contraste ou radiotraçador. O exame é indolor e sem procedimentos invasivos (sem uso de agulhas, cateteres, sondas ou incisões). Os alimentos fornecidos durante o estudo não oferecerão risco à saúde dos voluntários, uma vez que os mesmo são normalmente ingeridos pelas pessoas. Receberei como benefício um plano alimentar individual nutricionalmente adequado, visando à adequação da ingestão de cálcio e redução de peso corporal. Além disso, terei acesso aos meus dados das avaliações antropométrica, composição corporal, bioquímica, permeabilidade e microbiota intestinal, presença ou não de componentes da síndrome metabólica e o possível risco de um acidente cardiovascular resultados comigo. Sou sabedor que não receberei nenhum tipo de vantagem econômica ou material por participar do estudo, além de poder abandonar a pesquisa em qualquer etapa de seu desenvolvimento, sem nenhuma penalização. Estou em conformidade que meus resultados obtidos, sejam divulgados no meio científico, sempre resguardando minha privacidade e identificação. Todos os gastos com a pesquisa serão de total responsabilidade dos pesquisadores. Caso tenha algum gasto com a pesquisa, serei ressarcido pelos pesquisadores e receberei indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa. Tanto o material biológico quanto os questionários serão armazenados durante o período de 5 (cinco) anos, sob responsabilidade da coordenadora do projeto. Após este período, os questionários serão destruídos (picotados) e o material biológico será descartado conforme orientações da ANVISA. Estou suficientemente informado pelos membros do presente estudo, sobre as condições em que os procedimentos do referido estudo acontecerão, sob responsabilidade da profa. Dra. Rita de Cássia Gonçalves Alfenas e sua equipe de trabalho.”

Eu, \_\_\_\_\_,  
fui informado(a) dos objetivos do presente estudo de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Viçosa, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

Assinaturas:

\_\_\_\_\_  
Júnia Maria Geraldo  
(Doutoranda/DNS-UFV)

31 8893 5830

\_\_\_\_\_  
Rita de Cássia Gonçalves Alfenas  
( Profª/DNS-UFV) - 31 3899 3740  
(Coordenadora)

\_\_\_\_\_  
Jorge de Assis Costa  
(Doutorando/DNS-UFV)  
32 84021108

\_\_\_\_\_  
Leandro Licursi de Oliveira  
( Prof./ DBG-UFV – 31 3899 3142)

\_\_\_\_\_  
Andréia Queiróz Ribeiro  
( Profª/DNS-UFV) - 31 3899 1271

\_\_\_\_\_  
Maria do Camo Gouveia Peluzio  
(Profª. DNS-UFV) – 31 3899 2542

\_\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar:

*Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de*

*Viçosa (UFV), campus Viçosa*

*Prédio Arthur Bernardes, sala 04*

*Fone: (31) 3899-2492 / Correio eletrônico: [cep@ufv.br](mailto:cep@ufv.br)*

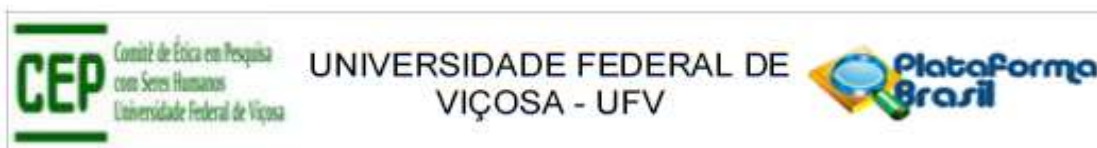
*Pesquisador(a) Responsável: Professora Rita de Cássia Gonçalves Alfenas*

*Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, Campus Viçosa, 5º andar, sala 17*

*Fone: (31)3899-3740 / Correio eletrônico: [ralfenas@ufv.br](mailto:ralfenas@ufv.br)*

## Anexo 2

### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Efeito do aumento da ingestão de cálcio na permeabilidade e microbiota intestinais em diabéticos do tipo 2 com excesso de peso

**Pesquisador:** Rita de Cássia Gonçalves Alfenas

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 20315113.5.0000.5153

**Instituição Proponente:** Departamento de Nutrição e Saúde

**Patrocinador Principal:** MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 526.005

**Data da Relatoria:** 04/02/2014

##### Apresentação do Projeto:

Trata de um projeto que visa avaliar os efeitos e mecanismos de ação do aumento da ingestão de cálcio nos níveis de marcadores da inflamação, na permeabilidade e na microbiota intestinais, com vistas à prevenção do diabetes e melhora do perfil metabólico em indivíduos diabéticos.

##### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Avaliar os efeitos do aumento da ingestão de cálcio na permeabilidade e microbiota intestinais em indivíduos portadores de DM2 com excesso de peso.

Objetivo Secundário:

- Avaliar os efeitos da ingestão de cálcio derivado dos laticínios e de suplementos de citrato de cálcio nos seguintes parâmetros: Composição da microbiota intestinal; Permeabilidade intestinal; Níveis de lipopolissacarídeo em jejum e pós-prandial; Conteúdo fecal de ácidos graxos e pH fecal; - No nível de marcadores inflamatórios (proteína C reativa ultra sensível, adiponectina, IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ); -Glicemia e insulinemia de jejum

e na resistência insulínica; Níveis de triacilgliceróis, colesterol total, HDL, LDL e VLDL em jejum; Ingestão calórica e de macro e micronutrientes; Composição corporal (massa livre de gordura, e

**Endereço:** Universidade Federal de Viçosa, prédio Arthur Bernardes, piso inferior  
**Bairro:** campi Viçosa **CEP:** 36.570-000  
**UF:** MG **Município:** VICOSA  
**Telefone:** (31)3899-2492 **Fax:** (31)3899-2492 **E-mail:** cep@ufv.br