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

**Avaliação do *status* de ferro em ratos alimentados com
rações hiperlipídicas**

Eduardo Henrique Szpak Gaievski

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre
Orientadora: Profa. Dra. Célia Colli

São Paulo
2012

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

	Gaievski, Eduardo Henrique Szpak
G137a	Avaliação do status de ferro em ratos alimentados com rações hiperlipídicas / Eduardo Henrique Szpak Gaievski. -- São Paulo, 2012. 64p.
	Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Orientador: Colli, Célia
	1. Ferro : Ciência dos alimentos 2. Obesidade : Nutrição : Doenças metabólicas I. T. II. Colli, Célia, orientador.
	641.17 CDD

Eduardo Henrique Szpak Gaievski

**Avaliação do *status* de ferro em ratos alimentados com rações
hiperlipídicas**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Célia Colli
orientador/presidente

1º. Examinador

2º. Examinador

3º. Examinador

São Paulo, _____ de _____.

“A vida é como andar de bicicleta.
Para se estar em equilíbrio,
é preciso estar sempre em movimento.”

Albert Einstein

Dedico esse trabalho à minha mãe, Janete,
ao meu pai, Eduardo,
ao meu irmão, André,
aos meus avós,
e à minha companheira Mariá.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental (FCF/USP).

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP), pela bolsa (processo no. 2009/13006-1) e pelo auxílio à pesquisa (processo no. 2010/05644-5).

À minha orientadora, professora Célia Colli.

Ao Alexandre Rodrigues Lobo e aos amigos do grupo do Laboratório de Minerais em Alimentos e Nutrição do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental (FCF/USP): Adriana Rodrigues, Ana Lina de Carvalho Cunha Sales, Cassiana Ganem, Cristiane Hermes Sales, Eduardo De Carli, Fernanda Brunacci Della Rosa, Jéssica Silva, Laila Abicair Sangaletti Santos, Pryscila Dryelle Sousa Teixeira e Vivianne de Souza Rocha.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e, em especial, a todos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

À senhora Silvânia Peres Neves, responsável pelo Biotério de Produção e Experimentação da FCF/USP, e seus funcionários, em especial, à Flávia Prates Ong, pela colaboração nos ensaios biológicos.

À professora Primavera Borelli e ao grupo do Laboratório de Hematologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (FCF/USP), em especial, às alunas de pós-graduação Amanda Rabello Crisma e Karina Nakajima, pela colaboração nas análises hematológicas.

À professora Lilian Rose Marques de Sá, do Laboratório de Gastroenteropatia Comparada e Experimental do Departamento de Patologia (FMVZ/USP), pela colaboração nas análises histológicas.

À professora Rosa Maria Rodrigues Pereira, do Departamento de Reumatologia da Faculdade de Medicina da USP, e à Liliam Takayama, pela colaboração nas análises de composição corporal (DEXA).

Ao professor Carlos Henrique de Mesquita (IPEN/CNEM-SP), ao professor Pedro Vitoriano Oliveira (Instituto de Química/USP), ao Renato Astorino Filho, pela preciosa colaboração.

E a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	1
LISTA DE TABELAS.....	2
LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
APRESENTAÇÃO.....	6
CAPÍTULO 1	7
Introdução.....	7
Metabolismo do Ferro.....	9
Hepcidina.....	12
Obesidade e inflamação.....	13
Modelos experimentais de obesidade.....	14
Comentários finais.....	16
Referências.....	16
CAPÍTULO 2	21
Introdução.....	21
Material e métodos.....	23
Formulação das rações experimentais.....	23
Composição química das rações experimentais.....	24
Delineamento experimental.....	25
Material biológico.....	25
Avaliação da composição corporal.....	26
Teste de tolerância à insulina.....	26
Marcadores de inflamação.....	26
Análise estatística.....	27
Resultados.....	28
Discussão.....	36
Conclusão.....	39
Referências.....	39
ANEXOS.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ganho de peso e composição corporal.....	31
Figura 2. Glicose sanguínea e área sob a curva.....	32
Figura 3. Distribuição compartimental de Fe: consumo total, excreção fecal, concentração no soro, conteúdo hepático e esplênico.....	33
Figura 4. Correlação entre índice de adiposidade e <i>status</i> de ferro (sangue, fígado e baço).....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formulação das rações experimentais.....	24
Tabela 2. Composição química das rações experimentais.....	28
Tabela 3. Pesos inicial e final e consumo de macronutrientes.....	29
Tabela 4. Consumo de micronutrientes.....	30
Tabela 5. Parâmetros hematológicos.....	35
Tabela 6. Marcadores inflamatórios.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

AIN: *American Institute of Nutrition*

CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média

CON: grupo controle

Dcytb: *duodenal cytochrome b* (citocromo b duodenal)

DMT-1: *divalent metal transporter-1* (transportador de metais divalentes-1)

DP: desvio padrão

EAA: espectrofotometria de absorção atômica

FA: fibra alimentar

Hb: hemoglobina

HCM: hemoglobina corpuscular média

HL: grupo hiperlipídico

IL: interleucina

IRE: *iron responsive elements* (elementos responsivos ao ferro)

LIP: *labile iron pool* (pool de ferro lábil)

LPS: lipopolissacarídeo

PF: grupo *pair-feeding*

STAT: *signal transducer and activators of transcription*

TAB: tecido adiposo branco

TLR: *toll like receptor*

TNF- α : fator de necrose tumoral α

TfR: *transferrin receptor* (receptor de transferrina)

TTI: teste de tolerância à insulina

VCM: volume corpuscular médio

VCT: valor calórico total

Gaievski, Eduardo Henrique Szpak. **Avaliação do *status* de Fe de ratos alimentados com rações hiperlipídicas**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. Dissertação de Mestrado. 2012.

RESUMO

A discussão sobre a efetividade da fortificação dos alimentos com ferro como estratégia para o controle e a redução do risco da anemia vem ganhando novo enfoque, a partir da associação, em estudos epidemiológicos, entre excesso de peso e deficiência de ferro. O conhecimento dos mecanismos de regulação da homeostase de Fe pode contribuir para o entendimento das alterações no *status* de ferro e sua relação com a adiposidade em indivíduos obesos e com sobrepeso. Neste trabalho, o *status* de ferro de ratos Wistar, machos e recém-desmamados, alimentados com rações hiperlipídicas foi estudado ao longo de 60 dias. Os animais receberam, *ad libitum*, rações normo e hiperlipídicas. Um grupo *pair-feeding* foi usado, que consumiu a mesma quantidade de ferro que o grupo hiperlipídico. Foi observada maior excreção de lipídeos nas fezes dos animais do grupo HL, em todos os períodos avaliados. Observou-se associação positiva da adiposidade com o conteúdo de Fe no baço, após 15 dias, e com o conteúdo de Fe no fígado após 30 dias, demonstrando que esses tecidos são afetados de maneira diferente pelo consumo da ração hiperlipídica, ao longo do tempo. Após 60 dias, o consumo da ração hiperlipídica resultou em diminuição da sensibilidade à insulina e em aumento da gordura corporal. Nesse período, esses animais apresentaram maior excreção de ferro nas fezes do que os controles. Além disso, houve associação negativa e significativa do ferro sérico com a adiposidade, apesar de não terem sido observadas diferenças na concentração de hemoglobina entre os grupos. Como conclusão, o consumo das rações hiperlipídicas resultou em alterações na digestibilidade do Fe na ração e em redistribuição compartimental do mineral, o que sugere interações entre o ferro e os lipídeos no lúmen intestinal ou, ainda, um processo adaptativo à condição de estresse gerada pelo excesso de lipídeos da dieta.

Palavras-chave: obesidade, dieta hiperlipídica, deficiência de ferro, ratos

Gaievski, Eduardo Henrique Szpak. **Assessment of iron status in rats fed with high-fat diets**. Faculty of Pharmaceutical Sciences. University of São Paulo. Dissertation for master's degree. 2012.

ABSTRACT

The discussion on the effectiveness of food fortification with iron as a strategy to control and reduce the risk of anemia is gaining new focus, from the association in epidemiological studies between overweight and iron deficiency. Knowledge on mechanisms of regulation of Fe homeostasis may contribute to the understanding of changes in iron status and its relationship with adiposity in obesity and overweight. In this study, the iron status of weanling male Wistar rats fed with high-fat diets was studied during 60 days. The animals received *ad libitum* normo- and high-fat diets. A pair-feeding group was used, which consumed the same amount of iron as the HF group. Lipid excretion was higher in feces of the HF group, in all periods. A positive association between fat and spleen Fe content after 15 days, and the liver Fe content only after 30 days, demonstrate that these tissues are affected differently by the high-fat diet consumption over time. After 60 days, the consumption of high-fat diet resulted in decreased insulin sensitivity and increased fat mass. During this period, these animals had higher iron excretion in feces than controls. In addition, there was a significant negative association between serum iron and adiposity, although no differences were observed in hemoglobin concentration between groups. In conclusion, consumption of high-fat diets resulted in changes in the Fe digestibility and compartmental mineral redistribution, suggesting interactions between iron and lipids in the intestinal lumen, or even an adaptive process to the condition of stress generated by excess of dietary lipids.

Keywords: obesity, high-fat diet, iron deficiency, rats

APRESENTAÇÃO

Observações, em diferentes populações, apontam para uma relação entre obesidade e deficiência de Fe (PINHAS-HAMIEL *et al.*, 2003; NEAD *et al.*, 2004; YANOFF *et al.*, 2007; ZIMMERMANN *et al.*, 2008). Esses estudos surgem em um momento de transição nutricional, caracterizado pelo aumento da prevalência de sobrepeso e obesidade com desnutrição ainda comum no país (BRASIL, 2010; BATISTA FILHO *et al.*, 2008).

Assim, a hipótese deste trabalho é que as alterações metabólicas resultantes da expansão do tecido adiposo podem influenciar a homeostase de ferro e, portanto, sua compartimentalização. O modelo experimental adotado foram ratos *Wistar* alimentados com rações hiperlipídicas, que é um modelo sistematicamente utilizado em estudos de obesidade induzida pela dieta.

A dissertação foi dividida em 2 artigos: no primeiro, foi feita uma revisão da literatura a partir da base de dados *Pubmed*, utilizando as palavras-chave *obesity*, *high-fat diets*, *iron deficiency* e *hypoferraemia*, considerando os artigos mais relevantes sobre o assunto, que será submetida como artigo científico de revisão, ao periódico *Nutrients* – a convite. No segundo artigo, são apresentados resultados do ensaio biológico, em que ratos *Wistar* foram alimentados com rações hiperlipídicas ao longo de 60 dias. O conhecimento dos mecanismos envolvidos nas alterações, ao longo do tempo, resultantes do consumo dessas dietas poderá contribuir para a elaboração de estratégias nutricionais que considerem os aspectos inflamatórios induzidos pela obesidade em suas abordagens.

Ao final, são apresentados o certificado de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal e o artigo a ser encaminhado sobre especiação de ferro.

CAPÍTULO 1

REVISÃO: METABOLISMO DE FERRO NA OBESIDADE

Introdução

A discussão sobre a efetividade da fortificação dos alimentos com ferro como estratégia para o controle e a redução do risco da anemia vem ganhando novo enfoque a partir da associação, em estudos epidemiológicos, entre excesso de peso e deficiência de ferro (YANOFF *et al.*, 2007; ZIMMERMANN *et al.*, 2008).

É crescente o número de estudos que apontam para o importante papel da obesidade influenciando diretamente na homeostase de Fe. No início da década de 1960, pesquisadores encontraram uma correlação entre a diminuição de ferro no soro e o aumento da adiposidade em adolescentes (WENZEL, 1962; SETZER, 1963). Posteriormente, em 2004, os resultados da terceira *National Health and Nutritional Examination Survey* mostraram que as crianças e os adolescentes com sobrepeso tinham duas vezes mais probabilidade de serem deficientes em Fe quando comparados àqueles com peso normal (NEAD *et al.*, 2004). Essas observações, em diferentes populações, de que há uma relação entre obesidade e deficiência de Fe (PINHAS-HAMIEL *et al.*, 2003; NEAD *et al.*, 2004; YANOFF *et al.*, 2007; ZIMMERMANN *et al.*, 2008) surgem em um momento de transição nutricional, caracterizado pelo aumento da prevalência de sobrepeso e obesidade nas populações (independente do segmento social ou do nível de desenvolvimento do país) (BATISTA FILHO *et al.*, 2008; BRASIL, 2010). Nesse contexto, a absorção de ferro foi avaliada em mulheres e crianças de países em transição nutricional (ZIMMERMANN *et al.*, 2008), –confirmando os estudos anteriores, que indicaram que o maior peso correlacionou-se com o pior *status* de Fe. E, ainda, maior IMC, mais inflamação (Proteína C reativa) e menos absorção de Fe de alimentos fortificados.

No Brasil, dados recentes do IBGE indicam que o excesso de peso já afeta 50% dos homens e 48% das mulheres (sendo obesos 12% de homens e 17% de mulheres) no país (BRASIL, 2010). A obesidade é considerada como de origem multifatorial, sendo influenciada por fatores genéticos e ambientais e caracterizada pela expansão do tecido adiposo (hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos), como resultado do desequilíbrio energético positivo (ALBEIRT *et al.*, 2005). Dentre os fatores nutricionais envolvidos, destacam-se o consumo elevado de alimentos fonte de lipídeos saturados e carboidratos simples e o consumo reduzido de alimentos fontes de fibras alimentares, de compostos bioativos e de micronutrientes. Esse panorama, no padrão de consumo alimentar, é associado com alterações na resposta imunológica, no metabolismo de carboidratos e de lipídeos e na homeostase de minerais, condições associadas ao aumento de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, tais como hipertensão arterial, *diabetes mellitus* tipo 2, aterosclerose, osteoporose e doença hepática gordurosa não alcoólica (VESSBY, 2000; ALBEIRT *et al.*, 2005; AIGNER *et al.*, 2008).

Sabe-se que o tecido adiposo desempenha papel ativo na homeostase energética, bem como na proteção mecânica contra choques e traumatismos externos e no deslizamento entre vísceras e feixes musculares, garantindo a sua integridade e funcionalidade (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006). Por outro lado, estudos em animais e em humanos têm sistematicamente observado que o aumento da gordura corporal (em especial, a adiposidade visceral) pode promover quadro inflamatório crônico e de baixa intensidade (CAI *et al.*, 2005; SHOELSON *et al.*, 2007).

Recentemente, o conhecimento do papel fisiológico da hepcidina na regulação da homeostase de ferro e dos mecanismos que afetam a sua produção (*status* de ferro, inflamação) tem contribuído para o entendimento da relação entre o aumento da adiposidade e as alterações na homeostase de ferro observadas em indivíduos obesos e com sobrepeso

(BEKRI *et al.*, 2006; McCLUNG & KARL, 2009). Assim, a coexistência de duas situações distintas – carência e excesso nutricional – que parecem apresentar tendências semelhantes de evolução temporal, representa um paradoxo da transição nutricional, por um lado, e pode servir, por outro lado, como sinalização para se propor uma modificação na estratégia de controle da anemia por deficiência de ferro.

Metabolismo do ferro

A maior parte da demanda do organismo por Fe é obtida da eficiente reciclagem de eritrócitos senescentes do sangue, sendo o restante fornecido pela dieta. A recomendação dietética de Fe é de 8 mg/d para homens e mulheres, na pós-menopausa, e 18mg/d para mulheres na pré-menopausa (IOM, 2001), sendo sua absorção e sua excreção de apenas 1-2mg de Fe por dia (FINBERG, 2011). A regulação se dá através da interação entre três sistemas de células: os enterócitos, que absorvem, os macrófagos, que reciclam, e os hepatócitos, que armazenam Fe, liberando-o para circulação quando necessário.

O *status* de ferro do organismo é influenciado, basicamente, pela eficiência da sua absorção no intestino e pela eritropoiese, evento caracterizado por etapas que conduzirão à formação do eritrócito. A absorção intestinal de ferro ocorre em toda a extensão do intestino, embora seja mais eficiente no duodeno e no jejuno superior (FRAZER *et al.*, 2007). Em geral, íons Fe^{3+} são reduzidos a Fe^{2+} via *Dcytb* (citocromo b duodenal) na membrana apical. O Fe é então absorvido pela célula intestinal por uma proteína transportadora de metais divalentes (*DMT-1; SLC11A2*) localizada na membrana apical da célula (FRAZER & ANDERSON, 2005). No meio intracelular, o ferro pode se complexar aos compostos de baixo peso molecular como citrato, ADP, ATP, e se ligar a proteínas ou ser armazenado como ferritina – uma cápsula proteica formada por 24 subunidades de baixo (cadeias L; 19 KDa) e alto pesos moleculares (cadeias H; 21 KDa), capaz de armazenar até 4.500 átomos de ferro. A saída de Fe da célula

intestinal ocorre pela ação coordenada da ferroportina (SLC40A1), outra proteína transportadora de Fe, e da hefaestina (ou ceruloplasmina, em outros tecidos), uma ferroxidase que converte o Fe novamente para a valência Fe^{3+} . No sangue, é transportado pela transferrina e captado pelas células em seus tecidos-alvo por meio da ligação específica da transferrina com seu receptor (TfR), localizado na membrana plasmática (WALLACE, 2007).

A quantidade de ferro transferido para a circulação é, em princípio, influenciada por suas reservas no organismo. Dessa forma, quando os estoques encontram-se reduzidos ou quando existe aumento na eritropoiese, a sua absorção intestinal é aumentada, basicamente, como consequência de alterações na expressão de proteínas de membrana apical – como a citocromo b duodenal (Dcytb) e o transportador de metais divalentes (DMT-1) e basolateral (ferroportina e hefaestina) nos enterócitos. Por outro lado, em situações de sobrecarga de ferro e de inflamação, ocorre aumento da síntese da hepcidina, um hormônio produzido predominantemente pelo fígado, que tem papel central na regulação da homeostasia do Fe. A hepcidina atua ligando-se à ferroportina, induzindo sua internalização e degradação mediada pela ubiquitina. A perda da ferroportina, presente em células duodenais e macrófagos, impede a movimentação de Fe para o sangue, diminuindo o seu transporte e, consequentemente, provocando a menor síntese de eritrócitos. Além disso, impede a sua absorção intestinal e sua reciclagem a partir de macrófagos do baço e do sistema reticuloendotelial (NEMETH & GANZ, 2006). O ferro sérico é modulado, portanto, pela ação da hepcidina que, por sua vez, afeta indiretamente o *pool* de ferro lábil (LIP, *labile iron pool*) intracelular (KRUSZEWSKI, 2003; OATES, 2007).

O LIP, por sua vez, é responsável pela regulação de interações entre o mRNA e as proteínas específicas (IRP; proteínas reguladoras de Fe) no citoplasma. Por exemplo, em situações de sobrecarga de Fe, a afinidade das IRP com o mRNA é diminuída, resultando em rápida degradação do mRNA para o TfR e em aumento da tradução da ferritina

(MUCKENTHALER *et al.*, 2008). O ferro apresenta vários estados de oxidação, sendo as valências Fe^{3+} e Fe^{2+} as mais estáveis em meio aquoso. O ferro na ferritina encontra-se como Fe^{3+} , cercado de átomos de O_2 em arranjo octaédrico com posições de coordenação ocasional preenchidas por grupos fosfato e moléculas de H_2O irregularmente interpostas. Essa ligação do Fe^{3+} à ferritina é sensível a agentes redutores, pois se rompe com o aumento do raio iônico, na redução de Fe^{3+} (0,065 nm) para Fe^{2+} (0,075 nm) (COLLI, 2006; AROSIO *et al.*, 2009). O aumento do ferro livre está intimamente relacionado com lesão celular, uma vez que o mineral catalisa a conversão do peróxido de hidrogênio e do ânion superóxido para os radicais livres (tal como o radical hidroxil). O radical hidroxil é altamente reativo e tóxico e provavelmente resulta em lesão celular como consequência da ação direta sobre o DNA ou pela peroxidação dos lipídeos de membrana ou lisossomos (KRUSZEWSKI, 2003).

As moléculas de Hb possuem a maior quantidade de Fe no organismo; dessa forma, a reciclagem de hemácias senescentes representa uma importante fonte de Fe (de 25 a 30 mg/dia). Essa reciclagem é suficiente para manter a necessidade diária de ferro para a eritropoiese (KNUTSON, 2003). Os macrófagos no baço, na medula óssea e no fígado são capazes de reconhecer modificações bioquímicas na membrana da hemácia senescente. Através dessa interação é possível iniciar o processo de fagocitose, seguido da degradação da hemácia. O Fe^{2+} poderá ser estocado no macrófago na forma de ferritina ou ser exportado pela FPT. Após a exportação pela FPT, o Fe^{2+} será oxidado pela ceruloplasmina, sintetizada no fígado. O Fe^{3+} será transportado pela transferrina até os locais nos quais será reutilizado, predominantemente medula óssea, onde participará da síntese de novos eritrócitos (CHUNG, 2003).

Hepcidina

Para o equilíbrio da homeostase de Fe é necessária a comunicação entre os locais de absorção, uso e estoque. Essa comunicação é feita pela hepcidina, um hormônio peptídico circulante recentemente descrito na literatura e que possui papel regulatório fundamental na homeostase do Fe, coordenando o uso e o estoque do mineral a partir de sua absorção. Esse peptídeo é principalmente sintetizado pelo fígado, possuindo 84 aminoácidos (aa), e posteriormente processado e secretado na circulação, sendo detectado no sangue e na urina como um peptídeo de 25 aa (GANZ & NEMETH, 2006).

O principal mecanismo de sinalização da transcrição do gene da hepcidina, *HAMP*, envolve a via de sinalização BMP/SMAD (proteína morfogenética óssea/proteína homóloga decapentaplégica). A ativação da BMP, que depende da hemojuvelina (HJV) como correceptor, leva à fosforilação da SMAD4 que, em resposta, liga-se diretamente à região promotora do *HAMP*, estimulando sua transcrição (DE DOMENICO, 2007). A sinalização através da BMP-R/HJV é modulada pela interação de um complexo de proteínas, incluindo a interação entre HFE/TfR2 com BMP-R/HJV. Há evidências de que a neogenina, um supressor de tumor ligado à membrana, também interage com HJV para melhorar a sinalização BMP (LEE, 2010). Por outro lado, outras proteases diminuem a sinalização, clivando HJV, como a matripase-2, uma serina-protease expressa principalmente no fígado, a qual suprime a expressão hepcidina (KNUTSON, 2009).

Em situações de inflamação, a transcrição da hepcidina é potencialmente induzida pela via da IL-6, envolvendo a fosforilação do STAT3 (*Signal Transducer and Activators of Transcription*)-3, translocação ao núcleo e ligação a um sítio específico ao STAT sobre o promotor do *HAMP* (PIETRANGELO *et al.*, 2007). Essa via atua bloqueando a saída de Fe das células para a circulação, impedindo a absorção intestinal e a reciclagem do Fe a partir do

sistema reticuloendotelial (NEMETH & GANZ, 2006; DARSHAN & ANDERSON, 2007). Além disso, a estimulação constante da hepcidina via IL-6 contribui para o desenvolvimento da anemia da doença crônica. Quando em condições inflamatórias ou durante infecções, as células mieloides (macrófagos e neutrófilos) são também estimuladas a produzir hepcidina via IL-1 β , TLR2 ou TLR4 (PEYSSONNAUX, 2006; ARMITAGE *et al.*, 2011).

Obesidade e inflamação

Dentre os mecanismos moleculares envolvidos no desencadeamento da resposta inflamatória induzida pela obesidade, merece destaque a via de sinalização do fator de transcrição nuclear NF-kB. A ativação desse fator de transcrição pode ser mediada por fatores endógenos (citocinas, espécies reativas de oxigênio, ácidos graxos) e exógenos (lipopolissacarídeo [LPS] bacteriano), e envolve a participação de receptores, como, por exemplo, o receptor para o TNF- α (TNF-R) e o receptor do tipo Toll (TLR)-4 (CAI *et al.*, 2005; SONG *et al.*, 2006). Desse modo, o aumento do consumo de ácidos graxos saturados favorece a ativação da resposta inflamatória no tecido adiposo e em outros tecidos, condição que, associada ao consumo de dietas hipercalóricas, pode levar ao aumento do risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis.

Nesse contexto, o aumento do número de macrófagos ativados no tecido adiposo branco é precedido pela síntese de moléculas de adesão nas células endoteliais e pela migração de monócitos do sangue para o tecido adiposo (WEISBERG *et al.*, 2003). O recrutamento e a infiltração de macrófagos levam à inflamação local (importante no desencadeamento da resistência periférica à insulina), que está associada com a produção de mediadores inflamatórios (adipocinas, como resistina, adiponectina, leptina, proteína quimiotática para monócitos-1 e outras citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucinas (IL)-1 β , -6, dentre outras), espécies reativas de oxigênio e alterações nas

concentrações sanguíneas de glicose, de ácidos graxos e de minerais (SHOELSON *et al.*, 2007; AIGNER *et al.*, 2008). Por sua vez, esses mediadores inflamatórios poderão exercer efeitos parácrinos e endócrinos, contribuindo para a resposta inflamatória em outros tecidos, como, por exemplo, fígado, músculo e intestino. Considerando que, em estados pró-inflamatórios, a ativação de macrófagos resulta em alterações celulares, morfológicas e funcionais, que intensificam a resistência do hospedeiro à infecção, e que o aumento na produção de citocinas por essas células afeta a atividade biossintética do hepatócito, resultando em alterações associadas à resposta de fase aguda, a produção da hepcidina, nesses casos, ocorre como defesa do organismo, reduzindo a disponibilidade de ferro para agentes patogênicos. Esse quadro é acompanhado por diminuída liberação do mineral, que se reflete em aumento da síntese intracelular de ferritina, em depósitos de hemossiderina, em hipoferremia e em alterações hematológicas que são frequentemente observadas na anemia da doença crônica (WEISS, 2005).

Modelos experimentais de obesidade

Os modelos de obesidade podem ser classificados em duas categorias: animais que contêm uma mutação no gene do receptor da leptina ou na própria leptina e os animais poligênicos. Ratos *Zucker* e camundongos *ob/ob* ou *db/db* são exemplos da falha na sinalização da leptina (ZUCKER, 1961; ZHANG, 1994; LEE, 1996). Estes modelos de roedores exibem complicações microvasculares similares aos seres humanos, como a nefropatia, além de fornecer importantes experimentos terapêuticos. Porém, esses modelos mimetizam a minoria dos casos de obesidade humana que no entanto, podem ser mais bem representados em modelos experimentais poligênicos de obesidade. Nessa categoria, podemos citar a linhagem de camundongos *M16* (MATSUOKA, 1997; ALLAN, 2004).

Nesse contexto, dietas hiperlipídicas têm sido frequentemente utilizadas no estudo da obesidade, com a vantagem de não serem dependentes de falhas em genes específicos, como o da leptina. Para isso, as linhagens mais utilizadas são os ratos *Wistar* e *Sprague-Dawley* (heterogênicos) e, ainda, os camundongos C57BL/6J (isogênicos). Muitos dados publicados até o momento levam à conclusão de que, após o consumo diário prolongado de uma dieta hiperlipídica, será observado o aumento de adiposidade nesses animais, que resulta, por exemplo, em hiperglicemia e resistência à insulina. No entanto, a resposta de roedores heterogênicos a essas rações hiperlipídicas é variada, observando-se desde susceptibilidade até o que se pode chamar de resistência à obesidade, o que exige um cálculo cuidadoso do *n* experimental (LEVIN, 1997; JANG, 2003).

Na década de 1980, alguns estudiosos já chamavam a atenção para o desenvolvimento de modelos experimentais de obesidade aplicados para o estudo de micronutrientes, dentre eles o Fe. Utilizando-se de animais *ob/ob*, foi observada a redução do mineral em diversos tecidos, como no fígado, devido à menor absorção (KENNEDY, 1986; FAILLA, 1988). Em 2007, já com a caracterização da hepcidina, Le Genno *et al.* avaliaram a homeostase de Fe em ratos *Wistar* após o consumo de dieta hiperlipídica, sendo observada diminuição da concentração de Fe no baço, tendência à menor concentração no fígado e menor expressão de hepcidina. Em 2011, camundongos C57BL/6 foram alimentados com dieta hiperlipídica e a diminuição dos estoques de Fe foi correlacionada com a inflamação (CHUNG, 2011). Já em um trabalho mais recente, também utilizando camundongos C57BL/6, a redução dos estoques de Fe esteve diretamente relacionada com a diminuição da sua absorção intestinal (SONNWEBER, 2012).

Comentários finais

A hepcidina é o principal regulador da homeostase de Fe e sua expressão é influenciada pelo quanto de Fe está disponível para eritropoiese, sendo que trabalhos recentes demonstram claramente a correlação do *status* de Fe com a obesidade, considerada um estado pró-inflamatório (CAI *et al.*, 2005; SHOELSON *et al.*, 2007).

Atualmente, a coexistência de carência e excesso nutricional representa um paradoxo da transição nutricional e pode sinalizar a importância de novas estratégias de controle da anemia por deficiência de Fe em indivíduos obesos. Com o crescente número de estudos experimentais poderemos, com eficiência, compreender e gerar novas propostas sobre o tema.

REFERÊNCIAS

- AIGNER, E.; THEURL, I.; HAUFE, H. *et al.* Copper availability contributes to iron perturbations in human nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, v.135, p.680-688, 2008.
- ALBEIRT, K.G.; ZIMMET, P.; SHAW, J. The metabolic syndrome – a new worldwide definition. *Lancet*, v.366, p.1059-1062, 2005.
- ALLAN, M. F.; EISEN, E. J.; POMP, D. The M16 mouse: an outbred animal model of early onset polygenic obesity and diabetes. *Obesity Research*, v. 12 (9), p. 1397–1407, 2004.
- ARMITAGE, A.E.; EDDOWES, L.A.; GILEADI, U.; COLE, S.; SPOTTISWOODE, N.; SELVAKUMAR, T.A.; HO, L.P.; TOWNSEND, A.R.; DRAKESMITH, H. Heparin regulation by innate immune and infectious stimuli. *Blood*, v.118(15), p.4129-39, 2011.
- AROSIO, P.; INGRASSIA, R.; CAVADINI, P. Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1790, p.589-599, 2009.
- BATISTA FILHO, M.; SOUZA, A.I.; MIGLIOLI, T.C. *et al.* Anemia e obesidade: um paradoxo da transição nutricional brasileira. *Cad. Saúde Pública*, v.24 (Sup.2), p.S247-S257, 2008.

BEKRI, S., *et al.* Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology*. v. 131(3), p.788-96, 2006

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Pesquisa de orçamentos familiares: POF 2008-2009*. 2010. Disponível em <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em 19/01/2011.

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

CHUNG, J.; KIM, M.S.; HAN, S.N. Diet-induced obesity leads to decreased hepatic iron storage in mice. *Nutr Res*. v.31(12), p. 915-21, 2011.

CHUNG, J.; WESSLING-RESNICK, M. Molecular mechanisms and regulation of iron transport. *Crit Rev Clin Lab Sci*. v. 40(2), p.151-82, 2003.

COLLI, C. Biodisponibilidade de ferro. In: BRAGA, J.A.P.; AMÂNCIO, O.M.S.; VITALLE, M.S.S. (Org.). *O ferro e a saúde das populações*. 1 ed. São Paulo: Roca, p. 45-65, 2006.

DARSHAN, D.; ANDERSON, G.J. Liver-gut axis in the regulation of iron homeostasis. *World J. Gastroenterol.*, v.13, p.4737-45, 2007.

DE DOMENICO, I.; WARD, D.M.; KAPLAN, J. Hepcidin regulation: ironing out the details. *J Clin Invest*. v. 117(7), p.1755-8, 2007.

FAILLA, M.L.; KENNEDY, M.L.; CHEN, M.L. Iron metabolism in genetically obese (ob/ob) mice. *J Nutr*. v.118(1), p.46-51, 1988.

FINBERG, K.E. Unraveling mechanisms regulating systemic iron homeostasis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. v. 2011, p. 532–537, 2011.

FONSECA-ALANIZ, M.H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M.I.C. *et al.* O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v.50, p.216-229, 2006.

FRAZER, D.M.; WILKINS, S.J.; ANDERSON, G.J. Elevated iron absorption in the neonatal rat reflects high expression of iron transport genes in the distal alimentary tract. *Am.J.Physiol.*, v.293, p.G525-31, 2007.

FRAZER, D.M.; ANDERSON, G.J. Iron imports I. Intestinal iron absorption and its regulation. *Am.J.Physiol.*, v.289, p.G631-5, 2005.

GANZ, T.; NEMETH, E. Iron imports. IV. Hepcidin and regulation of body iron metabolism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* v.290(2), p.G199-203, 2006.

IOM (Institute of Medicine). Iron. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington, DC: National Academic Press; 2001.

JANG, I et al. Physiological difference between dietary obesity-susceptible and obesity-resistant Sprague Dawley rats in response to moderate high fat diet. *Exp. Anim.* v.52 (2), p.99–107, 2003.

KENNEDY, M. L.; FAILLA, M. L.; SMITH, J. C. J. Influence of genetic obesity on tissue concentrations of zinc, copper, manganese and iron in mice. *J Nutr.* v.116 (8), p.1432-41, 1986.

KNUTSON, M.D. Into the matrix: regulation of the iron regulatory hormone hepcidin by matrilysin-2. *Blood.* v.67, p.284–288, 2009.

KNUTSON, M. D.; WESSLING-RESNICK, M. Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* v. 38, p.61–88, 2003.

KRUSZEWSKI, M. Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mut. Res.*, v.531, p.81-92, 2003.

LE GUENNO, G.; CHANSÉAUME, E.; RUIVARD, M.; MORIO, B.; MAZUR, A. Study of iron metabolism disturbances in an animal model of insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract.* v.77(3), p. 363-70, 2007.

LEE, D.H.; ZHOU, Z.L.J.; XIE, Z, et al. Neogenin inhibits HJV secretion and regulates BMP-induced hepcidin expression and iron homeostasis. *Blood.* v. 115, p.3136–3145, 2010.

LEE, G. H.; PROENCA, R.; MONTEZ, J. M, et al. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature.* v. 379 (6566), p. 632–635, 1996.

LEVIN, B.E.; DUNN-MEYNELL, A.A.; BALKAN, B.; KEESEY, R.E. Selective breeding for diet-induced obesity and resistance in Sprague-Dawley rats. *Am. J. Physiol.* v.273 (2 Pt 2), p.725–30, 1997.

MATSUOKA, N.; OGAWA, Y.; HOSODA, K. *et al.* Human leptin receptor gene in obese Japanese subjects: evidence against either obesity-causing mutations or association of sequence variants with obesity. *Diabetologia*, v.40 (10), p. 1204–1210, 1997.

McCLUNG, J.P.; KARL, J.P. Iron deficiency and obesity: the contribution of inflammation and diminished iron absorption. *Nutr. Rev.*, v.67, p.100-104, 2009.

MUCKENTHALER, M.U. Fine tuning of hepcidin expression by positive and negative regulators. *Cell Metab*, v.8(1):1-3, 2008.

NEAD, K.G.; HALTERMAN, J.S.; KACZOROWSKI, J.M.; AUINGER, P.; WEITZMAN, M. Overweight children and adolescents: A risk group for iron deficiency. *Pediatrics*. v. 114(1), p. 104-108, 2004.

NEMETH, E; GANZ, T. Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annu Rev Nutr.* v.26. p.323–342, 2006.

OATES, P.S. The relevance of the intestinal crypt and enterocyte in regulating iron absorption. *Eur. J. Physiol.*, v.455, p.201-213, 2007.

PEYSSONNAUX, C.; ZINKERNAGEL, A.S.; DATTA, V.; LAUTH, X. JOHNSON, R.S.; NIZET, V. TLR4-dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens. *Blood*. v.1;107(9), p.3727-32, 2006.

PIETRANGELO, A.; DIERRSEN, U.; VALLI, L. *et al.* STAT3 is required for IL-6-GP130-dependent activation of hepcidin in vivo. *Gastroenterology*, v.132, p.294-300, 2007.

PINHAS-HAMIEL, O.; NEWFIELD, R.S.; KOREN, I. *et al.* Greater prevalence of iron deficiency in overweight and obese children and adolescents. *Int. J. Obes.*, v.23, p.416-418, 2003

SELTZER, C.C.; MAYER, J. Serum iron and iron-binding capacity in adolescents. II. Comparison of obese and nonobese subjects. *Am J Clin Nutr*, v. 13, p. 354-361, 1963.

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

SONG, M.J.; KIM, K.H.; YOON, J.M.; KIM, J.B. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* v.346(3), p.739-45, 2006.

SONNWEBER, T. *et al.* High fat diet causes iron deficiency via hepcidin-independent reduction of duodenal iron absorption. *J Nutr Biochem.* March, 2012.

VESSBY, B. Dietary fat and insulin action in humans. *Brit. J. Nutr.*, v.83 (Suppl.1), p.S97-S96, 2000.

WALLACE, D.F.; SUMMERVILLE, L.; SUBRAMANIAM, V.N. Targeted disruption of the hepatic transferrin receptor 2 gene in mice leads to iron overload. *Gastroenterology*. v.132(1), P.301-10, 2007.

WEISBERG, S.P.; McCANN, D.; DESAI, M. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in the adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, v.112, p.1796-1808, 2003.

WEISS, G.; GOODNOUGH, L.T. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med.* V.352(10), p.1011-23, 2005.

WENZEL, B.J.; STULTS, H.B.; MAYER, J. Hypoferraemia in obese adolescents. *Lancet.* v. 2(7251), p. 327-328, 1962.

YANOFF, L.B.; MENZIE, C.M.; DENKINGER, B. *et al.* Inflammation and iron deficiency in the hypoferremia of obesity. *Int. J. Obes.*, v.31, p.1412-1419, 2007.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* v. 372 (6505), p. 425-432, 1994.

ZIMMERMANN, M.B.; ZEDER, C.; MUTHAYYA, S. *et al.* Adiposity in women and children from transition countries predicts decreased iron absorption, iron deficiency and a reduced response to iron fortification. *Int. J. Obes.*, v.32, p.1098-1104, 2008.

ZUCKER, L.M.; ZUCKER, T.F. Fatty, a new mutation in the rat. *Journal of Heredity*, v. 52(6), p.275-278, 1961.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DO STATUS DE FERRO EM RATOS ALIMENTADOS COM RAÇÕES HIPERLIPÍDICAS

Introdução

A obesidade, considerada como de origem multifatorial, é influenciada por fatores genéticos e ambientais, sendo caracterizada pela expansão do tecido adiposo (TA) (hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos) como resultado de um desequilíbrio energético positivo (ALBEIRT *et al.*, 2005). Dentre os fatores nutricionais envolvidos, destacam-se o consumo elevado de alimentos fonte de lipídeos saturados e carboidratos simples e o consumo reduzido de alimentos fontes de fibras alimentares e de micronutrientes. Esse panorama, no padrão de consumo alimentar, é associado com alterações sistêmicas que refletem em aumentado risco do desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, tais como hipertensão arterial, *diabetes mellitus* tipo 2, aterosclerose, osteoporose e doença hepática gordurosa não alcoólica (VESSBY, 2000; ALBEIRT *et al.*, 2005; AIGNER *et al.*, 2008).

Na obesidade, o aumento de macrófagos ativados no TA, em particular no TA visceral, é precedido pela síntese de moléculas de adesão nas células endoteliais e pela migração de monócitos do sangue para o TA; essas células, quando presentes no TA visceral, diferenciam-se em macrófagos (WEISBERG *et al.*, 2003; SHOELSON *et al.*, 2007). O recrutamento e a infiltração de macrófagos levam à inflamação local, com aumento da concentração plasmática de mensageiros químicos (citocinas) pró-inflamatórios, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e a interleucina (IL)- 6 (DAY, 2006; SHOELSON *et al.*, 2007).

Por outro lado, a ativação de macrófagos em estados pró-inflamatórios resulta em alterações morfológicas e funcionais que intensificam a resistência do hospedeiro à infecção. Além disso, o aumento na produção de citocinas (IL-1, TNF- α , IL-6) por essas células afeta a atividade biossintética do hepatócito, resultando em alterações associadas com a resposta de

fase aguda (WEISBERG *et al.*, 2003; SHOELSON *et al.*, 2007). Estudos têm demonstrado que citocinas (TNF- α , IL-6) e hormônios (hormônio tireoidiano, insulina e estrógeno) influenciam os níveis de ferritina (uma proteína de fase aguda), como uma estratégia de defesa do organismo de reduzir a disponibilidade de Fe para agentes patogênicos (RASO *et al.*, 2009; THEURL *et al.*, 2009; WEISS, 2009). Esse quadro é acompanhado por diminuída liberação de Fe pelas células, que se reflete em aumento do LIP (e da síntese de ferritina) e cronicamente em hipoferremia e em alterações hematológicas, que são frequentemente observadas em situações de anemia de doença crônica (ou anemia da inflamação) (WEISS, 2009).

A relação entre aumento da adiposidade – observada em situações de sobrepeso e obesidade – e alterações no *status* de Fe vem sendo discutida em virtude do conhecimento do papel da hepcidina na regulação da homeostase do mineral (McCLUNG & KARL, 2009; ZAFON *et al.*, 2009). Bekri *et al.* (2006) demonstraram que indivíduos obesos, submetidos à cirurgia bariátrica, apresentaram maior expressão da hepcidina no tecido adiposo (visceral e subcutâneo) em relação aos não obesos. A expressão da hepcidina na inflamação parece envolver os fatores de transcrição gp130/STAT em resposta à ação da IL-6 (PIETRANGELO *et al.*, 2007).

Observações, em diferentes populações, de que há relação entre obesidade e deficiência de Fe (PINHAS-HAMIEL *et al.*, 2003; NEAD *et al.*, 2004; YANOFF *et al.*, 2007; ZIMMERMANN *et al.*, 2008) surgem em um momento de transição nutricional, caracterizado pelo aumento da prevalência de sobrepeso e de obesidade nas populações (independente do segmento social ou do nível de desenvolvimento do país) (BRASIL, 2010; BATISTA FILHO *et al.*, 2008). Assim, considerando que a expansão do tecido adiposo pode resultar em quadro inflamatório crônico e subclínico que predispõe ao desenvolvimento de alterações metabólicas – e que frequentemente acompanham a obesidade – o presente trabalho se propôs a investigar as eventuais alterações na homeostase de Fe e suas repercussões na biodisponibilidade do

mineral em ratos alimentados com rações hiperlipídicas, modelo frequentemente utilizado em estudos de obesidade induzida pela dieta.

Material e métodos

O projeto foi aprovado em 2009 pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FCF/USP (protocolo nº 250).

Formulação das rações experimentais

A formulação das rações seguiu as recomendações do *American Institute of Nutrition* (REEVES *et al.*, 1993), com modificações na concentração de lipídios e foram produzidas pela empresa *Harlan Teklab Laboratories* (Madison, WI, EUA) (Tabela 1). A ração dos grupos controle *ad libitum* (CON) e *pair-feeding* (PF) foi elaborada com 7% de lipídeos (como óleo de soja; 16% do valor calórico total [VCT] provenientes dos lipídeos; TD.06416) e a do grupo hiperlipídico (HL), com 32% de lipídeos (mistura de óleo de soja e banha suína; cerca de 60% do valor calórico total [VCT] provenientes dos lipídeos; TD.06414). A quantidade adicional de lipídeos nas rações hiperlipídicas foi descontada do teor de amido da formulação. A mistura mineral foi formulada de modo a conter 35 mg de Fe/kg de ração (como FeSO₄) (REEVES *et al.*, 1993), conforme Tabela 2.

Tabela 1: Formulação das rações experimentais ensaio ¹

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

CON: 16 % do VCT provenientes dos lipídeos; HL: 60% do VCT provenientes dos lipídeos;

¹ Com base nas recomendações da AIN-93 (REEVES *et al.*, 1993), com modificações;

² 85% de proteína (N x 6,25);

³ 41,1% de colina;

⁴ AIN-93G-VX (REEVES *et al.*, 1993);

⁵ TBHQ, Terc Butil Hidroquinona

Composição química das rações experimentais

Determinou-se a composição química das rações: umidade, lipídeos e cinzas (BRASIL, 2005) e proteínas (AOAC, 2006). Ferro, zinco, cálcio e magnésio foram analisados por espectrofotometria de absorção atômica (EAA; AAnalyst 100, Perkin Elmer, Norwalk, CT, EUA), empregando-se lâmpadas de catodo oco a 248,3; 324,8; 213,9; 422,7 e 202,6 nm e fenda de 0,2; 1,3; 1,3; 0,7 e 1,3 nm, respectivamente, após digestão por via úmida (HNO₃:H₂O₂, 5:1; v/v), e diluição com HNO₃ a 1% (v/v), adição de 0,1% (p/v) de lantânio, como La₂O₃ (para análises de Ca e Mg) (HNO₃:H₂O₂, 5:1; v/v) (AOAC, 2006). As soluções padrão foram preparadas pela diluição dos padrões FeCl₃, CuCl₂, ZnCl₂, CaCl₂ e MgCl₂ (Tritisol; Merck, Darmstadt, Alemanha).

Delineamento experimental

Após 5 dias de adaptação, os animais foram distribuídos em três grupos experimentais (CON, PF e HL). A ração e a água (desmineralizada) foram oferecidas *ad libitum*. No entanto, uma vez que animais que consomem rações hiperlipídicas tendem a apresentar redução no consumo, a ração normolipídica foi oferecida para os animais do grupo PF em quantidade equivalente à quantidade de ferro consumida pelo grupo HL (considerando a concentração analisada de ferro da ração). O consumo de ração foi registrado e calculado diariamente, considerando a oferta e a sobra de ração. O peso corporal foi registrado a cada dois dias. Os animais sofreram eutanásia por sangria, após anestesia por injeção intraperitoneal com solução de anestésicos contendo xilazina (25 mg/kg; Virbaxil® 2%, Virbac, São Paulo, Brasil) e quetamina (10 mg/kg; Vetaset, Fort Dodge®, Iowa, EUA), após 2, 4 e 8 semanas de experimento.

Material biológico

O sangue foi coletado da veia porta com EDTA 10% para realização do hemograma (hematócrito, hemoglobina [DRABKIN & AUSTIN, 1935], contagem de eritrócitos e leucócitos totais [câmara de Neubauer; Herka, Berlim, Alemanha] e da contagem reticulócitos) (BRECHER, 1949). Amostras de sangue, sem anticoagulante, foram separadas para análises da concentração de Fe sérico (Labtest Diagnóstica S/A, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil).

Após a eutanásia, os depósitos de tecido adiposo branco (TAB) (epididimal e retroperitoneal) foram coletados e os pesos utilizados para calcular o índice de adiposidade (%): $(\text{TAB epididimal} + \text{TAB retroperitoneal}) \times 100 / \text{peso corporal}$. A concentração de Fe foi determinada nas fezes, no fígado e no baço por espectrofotometria de absorção atômica (EAA; AAnalyst 100, Perkin Elmer, Norwalk, CT, EUA) após digestão úmida ($\text{HNO}_3\text{:H}_2\text{O}_2$, 5:1; v/v) em amostras previamente secas (105°C, 12 h), utilizando as mesmas condições analíticas

descritas para as análises da composição química das rações. Amostras do padrão certificado (fígado bovino liofilizado, SRM 1577c, *National Institute of Standards & Technology*, Gaithersburg, MD, EUA) foram usadas simultaneamente para avaliação da recuperação ($188 \pm 14 \mu\text{g/g}$, média $\pm$ DP de 3 replicatas; valor certificado = $197 \pm 6 \mu\text{g/g}$).

Avaliação da composição corporal

A composição corporal (massa magra – ossos e músculos – e adiposa) foi analisada por absorção de dupla energia por raios X (Discovery-A SN, Hologic QDR-4500, Bedford, MA, EUA), com utilização de *software* para pequenos animais (Hologic QDR Software for Windows XP, versão 12.3, 2004).

Teste de tolerância à insulina

Cinco dias antes do último período de eutanásia, nas semanas 4 e 8, os animais foram submetidos a 6 h de jejum para realização do teste de tolerância à insulina (TTI). Injetou-se solução de insulina recombinante humana ($1,5 \text{ U/kg}$; *Humulin R*; Eli Lilly, Indianápolis, EUA), pela via intraperitoneal, e amostras de sangue foram obtidas pela punção da cauda dos animais, nos tempos 0 (basal), 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min, para análise da concentração de glicose (CARVALHO-FILHO *et al.*, 2005), pelo glicosímetro portátil Accu-Chek® Performa (Roche, Diagnostics, Mannheim, Alemanha) (REIS *et al.*, 2001). Os resultados foram analisados, estabelecendo-se a área sob a curva dos valores de glicose sérica, aplicando-se a regra trapezoidal e utilizando-se Excel 2010 (MATTHEWS, 1990).

Marcadores de inflamação

A concentração de IL-6, extratos proteicos totais, obtidos de homogenatos de fragmentos do fígado, foi determinada por *ELISA* (Quantikine, R&D Systems Ltd, Minneápolis, EUA). A determinação da concentração plasmática de LPS baseou-se no ensaio cinético

quantitativo QCL-1000 (*Endpoint Chromogenic LAL Assay*, Bio Whittaker, Cambrex Bio Science, Walkersville, Maryland, EUA).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o programa *GraphPad Instat* (GraphPad Software, versão 2,00). Os dados são apresentados como a média $\pm$ DP. As médias das variáveis dos grupos foram comparadas através de uma análise de variância (ANOVA). Quando as análises apresentaram $P < 0,05$, o teste *Tukey* foi realizado para comparação das médias entre os grupos, adotando um intervalo de confiança de 95%. A correlação entre os parâmetros foi avaliada pelo teste de correlação de *Pearson*.

Resultados

A seguir (Tabela 2) são apresentados os resultados da composição química das rações experimentais.

Tabela 2. Composição química das rações experimentais.

	CON	HL
Proteína (N × 6,25) (%)	19.9 ± 0.9	16.8 ± 0.6
Extrato etéreo (%)	6.3 ± 0.1	32.1 ± 0.1
Umidade (%)	13.6 ± 0.1	6.4 ± 0.2
Cinzas totais (%)	2.2 ± 0.1	2.5 ± 0.1
Cálcio (mg/kg)	6729.0 ± 203.6	6597.0 ± 85.6
Magnésio (mg/kg)	469.7 ± 9.3	505.5 ± 10.0
Ferro (mg/kg)	49.3 ± 1.2	43.8 ± 1.6
Zinco (mg/kg)	38.8 ± 1.2	38.6 ± 0.7
Cobre (mg/kg)	6.1 ± 0.0	5.9 ± 0.1

Resultados expressos como média ± DP (n = 3).

Na Tabela 3, são apresentados o peso final e o consumo de macronutrientes após 8 semanas de experimento; observa-se a diminuição do consumo total (g) e de proteínas pelo grupo HL, comparado ao grupo CON, em virtude da maior concentração calórica dessa ração. Porém, como esperado, o consumo foi igual entre os grupos HL e PF.

Tabela 3. Pesos inicial e final e consumo de ração de ratos alimentados com rações controle *ad libitum* (CON) e *pair-feeding* (PF) e rações hiperlipídicas (HL) por 8 semanas.

	Grupos Experimentais			P
	CON	PF	HL	
PESO				
Inicial (g)	67,7 ± 6,4 ^a	68,8 ± 5,7 ^a	68,2 ± 5,4 ^a	0,82
Final (g)	363,6 ± 39,7 ^a	317,3 ± 9,9 ^b	403,4 ± 35,0 ^a	<0,0001
CONSUMO				
Ração (g)	1.307,8 ± 99,0 ^a	1.088,1 ± 11,4 ^b	1.167,2 ± 92,2 ^b	0,003
Ração (kcal)	5.636,5 ± 426,6 ^a	4.689,8 ± 49,2 ^b	6.548,2 ± 517,2 ^c	<0,0001
Proteína (g)	247,2 ± 18,7 ^a	205,7 ± 2,2 ^b	196,1 ± 15,5 ^b	<0,0001
Lipídeos (g)	82,4 ± 6,2 ^a	68,6 ± 0,7 ^a	375,9 ± 29,7 ^b	<0,0001
Carboidratos (g)	770,3 ± 58.3 ^a	640,9 ± 6,7 ^b	491,4 ± 38,8 ^c	0,0003

CON, grupo controle *ad libitum*; PF, grupo controle *pair-feeding*; HL, grupo hiperlipídico. Carboidratos: índice NIFEXT, fibras inclusas.

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n = 6-10). Valores considerados significativamente diferentes quando $P < 0,05$. As diferenças entre as médias dos grupos foram avaliadas pela ANOVA, seguida do *post-hoc* de Tukey.

A seguir, são apresentados dados de consumo de micronutrientes, demonstrando que o grupo PF equiparou-se no consumo de Fe quando comparado ao grupo HL. Porém, em virtude da maior concentração de Mg na ração HL, esse grupo consumiu maior quantidade de Mg.

Tabela 4. Consumo de micronutrientes de ratos alimentados com rações controle *ad libitum* (CON) e *pair-feeding* (PF) e rações hiperlipídicas (HL) 8 semanas

	<i>Grupos Experimentais</i>			<i>P</i>
	CON	PF	HL	
CONSUMO				
Ferro (mg)	64,4 ± 4,9 ^a	53,6 ± 0,6 ^b	51,1 ± 4,0 ^b	<0,0001
Zinco (mg)	50,7 ± 3,8 ^a	42,2 ± 0,4 ^b	45,1 ± 3,6 ^b	<0,0005
Cobre (mg)	8,0 ± 0,6 ^a	6,6 ± 0,1 ^b	6,9 ± 0,5 ^b	<0,0002
Magnésio (mg)	614,3 ± 46,5 ^a	511,1 ± 5,4 ^b	590,0 ± 46,6 ^a	0,0001
Cálcio (mg)	8.800,1 ± 666,1 ^a	7.321,9 ± 76,9 ^b	7.700,3 ± 608,2 ^b	<0,0005

CON, grupo controle *ad libitum*; PF, grupo controle *pair-feeding*; HL, grupo hiperlipídico

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n = 6-10). Valores considerados significativamente diferentes quando $P < 0,05$. As diferenças entre as médias dos grupos foram avaliadas pela ANOVA, seguida do *post-hoc* de Tukey.

A excreção fecal de lipídeos, após 8 semanas de experimento, foi de $2,3 \pm 0,7$ (mg/g); $2,7 \pm 0,7$ (mg/g) e $6,5 \pm 1,4$ (mg/g), respectivamente para os grupos CON, PF e HL, maior portanto para o grupo HL ($P < 0,0001$).

Na Figura 1, é apresentado o ganho de peso e composição corporal dos animais ao final do experimento. Em destaque, imagem gerada pelo DEXA, ilustrando o acúmulo de gordura na região abdominal de um animal do grupo HL em relação a um do controle.

Figura 1.

Ganho de peso e composição corporal de ratos alimentados com rações controle *ad libitum* (CON) e *pair-feeding* (PF) e rações hiperlipídicas (HL) 8 semanas. Em (A), evolução do peso corporal. Em B, índice de adiposidade (tecido adiposo epididimal + retroperitoneal) $\times 100/\text{peso corporal}$. Em C e D, massa magra (músculos + ossos) e gordurosa, respectivamente, avaliadas por absorção de dupla energia por raios X. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 6-10$). Valores considerados significativamente diferentes quando $P < 0,05$. As diferenças entre as médias dos grupos foram avaliadas pela ANOVA, seguida do *post-hoc* de Tukey.

Os resultados do teste de tolerância à insulina são apresentados na Figura 2. Após gerar a área sob a curva, observa-se maior valor no grupo HL, demonstrando a resistência à insulina.

Figura 2.

Glicose sanguínea (A) e área sob a curva (B) de ratos alimentados com rações controle *ad libitum* (CON) e *pair-feeding* (PF) e rações hiperlipídicas (HL) por 8 semanas. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 6-10$). Valores considerados significativamente diferentes quando $P < 0,05$. As diferenças entre as médias dos grupos foram avaliadas pela ANOVA, seguida do *post-hoc* de Tukey.

A distribuição compartimental de Fe no período avaliado tendeu para o acúmulo do mineral nos tecidos e diminuição no soro no grupo HL quando comparado com o grupo controle PF (Figura 3).

Figura 3.

Distribuição compartimental de ferro de ratos alimentados com rações controle *ad libitum* (CON) e *pair-feeding* (PF) e rações hiperlipídicas (HL) por 2, 4 e 8 semanas. Em (A), (B), (C), (D) e (E), consumo total, excreção fecal, concentração no soro, conteúdo hepático e esplênico de ferro expresso na base úmida. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão (n = 6-10). Valores considerados significativamente diferentes quando $P < 0,05$. As diferenças entre as médias dos grupos foram avaliadas pela ANOVA, seguida do *post-hoc* de Tukey.

As correlações entre concentração de Fe nos diversos compartimentos com a adiposidade são apresentadas em sua evolução a cada duas semanas (Figura 4). É positiva e significativa no baço já na segunda semana e no fígado a partir da quarta semana. No soro é negativa e significativa somente na oitava semana.

Figura 4.

Status de ferro de ratos alimentados ($n = 17$) com rações controle *ad libitum* (CON) e rações hiperlipídicas (HL) por 2, 4 e 8 semanas. Em (A), (B) e (C) correlação entre o índice de adiposidade e os índices do status de ferro (sangue, fígado e baço).

Durante o período de experimento não houve diferenças, entre os grupos, nos parâmetros hematológicos (Tabela 5), nem nos marcadores inflamatórios (Tabela 6).

Tabela 5. Parâmetros hematológicos de ratos alimentados com rações controle *ad libitum* (CON) e *pair-feeding* (PF) e rações hiperlipídicas (HL) por 2, 4 e 8 semanas.

	Grupos Experimentais			P
	CON	PF	HL	
Eritrócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	$7,6 \pm 0,3^a$	$7,8 \pm 0,4^a$	$7,8 \pm 0,4^a$	NS
Hemoglobina (g/dL)	$14,7 \pm 0,7^a$	$14,9 \pm 0,9^a$	$15,1 \pm 0,6^a$	NS
Hematócrito (%)	$44,2 \pm 1,4^a$	$44,7 \pm 2,7^a$	$44,0 \pm 1,9^a$	NS
VCM (fL)	$58,0 \pm 1,6^a$	$57,5 \pm 2,7^a$	$56,4 \pm 1,6^a$	NS
HCM (pg)	$19,3 \pm 0,3^a$	$19,3 \pm 0,6^a$	$19,3 \pm 0,6^a$	NS
CHCM (g/dL)	$33,3 \pm 1,1^a$	$33,5 \pm 0,5^a$	$34,3 \pm 0,9^a$	NS
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	$4,0 \pm 0,1^a$	$2,9 \pm 2,1^a$	$2,1 \pm 1,4^a$	NS
Reticulócitos (%)	$0,8 \pm 0,7^a$	$0,7 \pm 0,3^a$	$0,8 \pm 0,6^a$	NS
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	$635,4 \pm 46,6^a$	$593,7 \pm 83,9$	$649,8 \pm 245,5^a$	NS

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão (n = 6-10). Valores considerados significativamente diferentes quando $P < 0,05$. As diferenças entre as médias dos grupos foram avaliadas pela ANOVA, seguida do *post-hoc* de Tukey.

Tabela 6. Marcadores inflamatórios de ratos alimentados com rações controle *ad libitum* (CON) e rações hiperlipídicas (HL) por 8 semanas.

	Grupos experimentais		<i>P</i>
	CON	HL	
LPS (EU/mL)	0,77 ± 0,10	0,75 ± 0,12	NS
IL-6 hepática (pg/mL)	12,6 ± 2,6	11,7 ± 1,6	NS

Valores considerados significativamente diferentes quando $P < 0,05$ (Teste t *Student*).

DISCUSSÃO

Diversos modelos de obesidade têm sido usados experimentalmente, por exemplo os camundongos *ob/ob* que tem mutação no gene da leptina (ZHANG, 1994). No entanto, a proposta deste trabalho foi a utilização de um modelo que reproduzisse o mais possível, a obesidade induzida pela dieta (BUETTNER, 2007). Ratos *Wistar* machos ingeriam uma ração hiperlipídica por 8 semanas. Após esse período, observou-se o aumento no índice de adiposidade no grupo HL (Figura 1) e, ainda, a redistribuição do Fe nos tecidos (Figura 3).

Estudos já haviam demonstrado que um dos problemas de se utilizar dietas hiperlipídicas em modelo murino é o fato de ocorrer uma redução da ingestão dietética (por ação da leptina) dependente do total de calorias ingeriadas diariamente (SMITH, 2000; LEVIN, 2002). Assim, para que se tivesse um grupo controle com dieta normolipídica para avaliar o efeito da distribuição de Fe nos tecidos, foi necessário incluir um grupo *pair-feeding* (Tabela 3 e Tabela 4). Dessa maneira o consumo de proteínas e minerais ficou homogêneo entre os grupos PF e HL. A exceção foi o Mg, em virtude da variação de sua concentração nas rações (Tabela 2).

Nessas condições ocorreu, no grupo pair-feeding, uma restrição de 17% na ingestão de nutrientes, o que influenciou o ganho de peso (Figura 1) mas não prejudicou a homeostase de Fe, como demonstram os valores de Fe sérico, Fe hepático (figura 3) e Hb (Tabela 5).

Os os animais alimentados com a ração hiperlipídica (32% de lipídeos totais) apresentaram maior adiposidade quando comparados com os animais CON pós 8 semanas de experimento, e menor sensibilidade à insulina. (Figuras 1 e 2) O consumo excessivo de lipídeos influenciou a distribuição compartimental de Fe, conforme demonstraram os dados da concentração de ferro sangue, no fígado, no baço e nas fezes (Figura 3), reproduzindo condições observadas em seres humanos . . Por outro lado, o quadro inflamatório sub-clínico induzido pelo consumo de dietas hiperlipídicas tem sido descrito em modelos animais e em humanos (CAI et al., 2005; SHOELSON et al. 2007). Fundamentalmente, esta condição é um dos fatores que podem influenciar na produção de hepcidina, a proteína de fase aguda produzida principalmente pelo fígado, e considerada a principal responsável pelo controle da homeostase de ferro (McCLUNG & KARL, 2009). Em condições inflamatórias e/ou de sobrecarga de ferro, esse hormônio influencia o pool de Fe intracelular por se ligar à ferroportina e induzir sua degradação (PIETRANGELO et al., 2007). Até o momento, este é o único transportador descrito envolvido na saída do mineral das células.

Os resultados demonstram que, em comparação ao grupo PF, os animais alimentados com a ração hiperlipídica tiveram menores valores de ferro sérico após 8 semanas de experimento. Este resultado é interessante, se considerarmos que o consumo de Fe entre os grupos HL e PF foi o mesmo. Por outro lado, a diminuição na disponibilidade de Fe para a medula óssea não interferiu na concentração de Hb destes animais, que não ficaram anêmicos. Além disso, o aumento da adiposidade correlacionou-se com o conteúdo de Fe no baço (a partir da 2ª semana) e no fígado (a partir da 4ª semana), sugerindo diferenças entre os tecidos na sensibilidade ao modelo experimental. Por outro lado, uma vez que o equilíbrio dos

estoques de Fe no organismo são mantidos pelo controle de sua absorção intestinal, chama a atenção a interferência do consumo da ração hiperlipídica na excreção fecal de Fe (Figura 3B). É interessante observar que o consumo dessas rações resultou em maior excreção do mineral. Considerando que esses animais tiveram menor valor de Fe sérico, é possível supor que o Fe presente no lúmen intestinal “entrou” no enterócito (via DMT-1, presente na membrana apical) mas não “saiu” da célula, possivelmente pela interferência da hepcidina na ação da ferroportina na membrana basolateral. O consequente aumento da concentração de ferritina (Fe de armazenamento) leva a diminuição da absorção de Fe dietético. Essa maior excreção também pode ser explicada por uma possível interação entre o Fe dietético e os lipídeos da dieta, em excesso no grupo HL. Caso o tempo de consumo dessa ração se prolongasse, possivelmente poderia ser observada a depleção dos estoques de Fe, como o encontrado por Chung *et al.* (2011) em um modelo de camundongos *C57BL/6*, mais susceptível à obesidade.

Para avaliar o estado inflamatório nesses animais, foram determinados LPS no sangue e IL-6 em homogenato de fígado, principal mediadora do aumento de Hepcidina em situações de inflamação (PIETRANGELO *et al.*, 2007). Porém não foram observadas diferenças entre os grupos (Tabela 6). Esses resultados estão de acordo com estudos que descreveram alterações na homeostase de Fe, mas com a mínima influência da IL-6 na obesidade, tanto em camundongos como em pacientes após cirurgia bariátrica (TUSSING-HUMPHREYS, 2010; SONNWEBER, 2012). Para confirmação da hipótese é necessária a determinação da hepcidina e de seu receptor, a ferroportina. Além disso, outros marcadores inflamatórios podem ser avaliados, pois deve-se considerar que a hepcidina pode ser influenciada por outras citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β . De acordo com BODE, *et al.*, (2012), hepatócitos de murinos tem aumento considerável da expressão de hepcidina quando estimulados pelo efeito combinado da IL-6 e IL-1 β .

Conclusão

Como conclusão, o consumo das rações hiperlipídicas resultou em redistribuição compartimental do mineral, gerando aumento do conteúdo de Fe no baço e no fígado, o qual foi correlacionado com a adiposidade. Acreditamos que tais alterações sejam resposta à inflamação subclínica, que promove a produção de hepcidina – que retém o Fe nos tecidos, diminui os níveis séricos e também a absorção. Em nosso protocolo experimental, não foi observada alteração na síntese de hemoglobina, demonstrando que uma quantidade de Fe dos estoques ainda pode ser liberada para essa função. Porém, considerando que a meia vida do eritrócito seja de 120 dias, seria interessante a realização de ensaios mais longos para avaliação de uma possível anemia.

Referências

- AIGNER, E.; THEURL, I.; HAUFE, H. *et al.* Copper availability contributes to iron perturbations in human nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, v.135, p.680-688, 2008.
- ALBEIRT, K.G.; ZIMMET, P.; SHAW, J. The metabolic syndrome – a new worldwide definition. *Lancet*, v.366, p.1059-1062, 2005.
- BATISTA FILHO, M.; SOUZA, A.I.; MIGLIOLI, T.C. *et al.* Anemia e obesidade: um paradoxo da transição nutricional brasileira. *Cad. Saúde Pública*, v.24 (Sup.2), p.S247-S257, 2008.
- BEKRI, S., *et al.* Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology*, v. 131(3), p.788-96, 2006.
- BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Pesquisa de orçamentos familiares: POF 2008-2009*. 2010. Disponível em <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em 19/01/2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos/Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária*, 4a. ed., Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRECHER, G. New methylene blue as a reticulocyte stain. *American Journal of Clinical Pathology* 19, 895-896, 1949.

BODE, J.G.; ALBRECHT, U.; HÄUSSINGER, D.; HEINRICH, P.C.; SCHAPER, F. Hepatic acute phase proteins--regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF- κ B-dependent signaling. *Eur J Cell Biol.* v.91(6-7), p.496-505, 2012.

BUETTNER, R.; SCHOLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L.C. High-fat Diets: Modeling the Metabolic Disorders of Human Obesity in Rodents. *Obesity.* v.15(4), p. 798–808, 2007.

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

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

CHUNG, J.; KIM, M.S.; HAN, S.N. Diet-induced obesity leads to decreased hepatic iron storage in mice. *Nutr Res.* v.31(12), p. 915-21, 2011.

DRABKIN, D.L., AUSTIN, J.H. Spectrophotometric studies. II. Preparations from washed blood cells: nitric oxide hemoglobin and sulphemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, v.112, p.51-65, 1935.

LEVIN, B.E.; DUNN-MEYNELL, A.A. Reduced central leptin sensitivity in rats with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* v.283, v.941–948, 2002.

MATTHEWS, J.N.S.; ALTMAN, D.G.; CAMPBELL, M.J.; ROYSTON, P. Analysis of serial measurements in medical research. *BMJ.* v.(Suppl 27), p.230-250, 1990.

McCLUNG, J.P.; KARL, J.P. Iron deficiency and obesity: the contribution of inflammation and diminished iron absorption. *Nutr. Rev.*, v.67, p.100-104, 2009.

NEAD, K.G.; HALTERMAN, J.S.; KACZOROWSKI, J.M.; AUINGER, P.; WEITZMAN, M. Overweight children and adolescents: A risk group for iron deficiency. *Pediatrics.* v. 114(1), p. 104-108, 2004.

PIETRANGELO, A.; DIERRSEN, U.; VALLI, L. et al. STAT3 is required for IL-6-GP130-

dependent activation of hepcidin in vivo. *Gastroenterology*, v.132, p.294-300, 2007.

PINHAS-HAMIEL, O.; NEWFIELD, R.S.; KOREN, I. *et al.* Greater prevalence of iron deficiency in overweight and obese children and adolescents. *Int. J. Obes.*, v.23, p.416-418, 2003.

RASO, G.M.; IRACE, C.; ESPOSITO, E. *et al.* Ovariectomy and estrogen treatment modulate iron metabolism in rat adipose tissue. *Biochem. Pharmacol.*, 2009. doi: 10.1016/j.bcp.2009.05.034

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY Jr., G.C. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* writing committee on reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.*, v.123, p.1939-1951, 1993.

REIS, M.A.B.; LATORRACA, M.Q.; CARNEIRO, E.M. *et al.* Magnesium deficiency improves glucose homeostasis in the rat: studies *in vivo* and in isolated islets *in vitro*. *Brit. J. Nutr.*, v.85, p.549-552, 2001.

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

SMITH, G.P. The controls of eating: a shift from nutritional homeostasis to behavioral neuroscience. *Nutrition*. v.16. p814– 20, 2000.

SONNWEBER, T. *et al.* High fat diet causes iron deficiency via hepcidin-independent reduction of duodenal iron absorption. *J Nutr Biochem*. March, 2012.

THEURL, I.; AIGNER, E.; THEURL, M. *et al.* Regulation of iron homeostasis in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: diagnostic and therapeutic implications. *Blood*, v.113, p.5277-5286, 2009.

TUSSING-HUMPHREYS, L.M.; NEMETH, E.; FANTUZZI, G.; FREELS, S.; HOLTERMAN, A.X.; GALVANI, C. *et al.* Decreased serum hepcidin and improved functional iron status 6 months after restrictive bariatric surgery. *Obesity*. v. 8, p.2010–6, 2010.

VESSBY, B. Dietary fat and insulin action in humans. *Brit. J. Nutr.*, v.83 (Suppl.1), p.S97-S96, 2000.

WEISBERG, S.P.; McCANN, D.; DESAI, M. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in the adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, v.112, p.1796-1808, 2003.

WEISS, G. Iron metabolism in the anemia of chronic disease. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1790, p.682-693, 2009.

YANOFF, L.B.; MENZIE, C.M.; DENKINGER, B. *et al.* Inflammation and iron deficiency in the hypoferrremia of obesity. *Int. J. Obes.*, v.31, p.1412-1419, 2007.

ZAFON, C.; LECUBE, A.; SIMÓ, R. Iron and obesity. An ancient micronutrient for a modern disease. *Obes. Rev.*, 2009. doi: 10.1111/j.1467-789X.2009.00638.x

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. v. 372 (6505), p. 425–432, 1994.

ZIMMERMANN, M.B.; ZEDER, C.; MUTHAYYA, S. *et al.* Adiposity in women and children from transition countries predicts decreased iron absorption, iron deficiency and a reduced response to iron fortification. *Int. J. Obes.*, v.32, p.1098-1104, 2008.

ANEXOS

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "**Avaliação do 'status' de ferro em ratos alimentados com rações hiperlipídicas**" (Protocolo nº 250), de responsabilidade do pesquisador **Eduardo Henrique Szpak Gaievski** sob a orientação da Profa. Dra. Célia Colli, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório – SBCAL/COBEA e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal – CEEA, desta Faculdade, em 9 de novembro de 2009.

São Paulo, 10 de novembro de 2009.

Profa. Dra. Ligia Ferreira Gomes
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal
CEEAF/CF/USP

FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS INFLUENCIAM NA ESPECIAÇÃO DE FERRO PROVENIENTE DO PIROFOSFATO FÉRRICO EM CONTEÚDO CECAL DE RATOS ANÊMICOS

Eduardo H.S. Gaievski, Alexandre R. Lobo, Natalia N. de Souza, Célia Colli

Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo

AUTOR CORRESPONDENTE:

Dr. Célia Colli

Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 14, 05508-900, São Paulo, SP, Brasil

Tel.: 55 11 3091 3651

Fax: 55 11 3815 4410

E-mail: cecolli@usp.br

Resumo

Frutooligossacarídeos (FOS) têm sido apontados por aumentarem a biodisponibilidade de minerais por induzirem alterações físico-químicas no lúmen intestinal. Nesse estudo, o efeito da alimentação com FOS na especiação de Fe no conteúdo cecal de ratos anêmicos submetidos à repleção de hemoglobina foi avaliado. Ratos Wistar machos foram recuperados da anemia com rações contendo 35 mg Fe/kg e 7,5% de FOS por 14 dias. A extração sequencial foi baseada no uso de extratores com diferentes forças iônicas. A validação do procedimento foi realizada testando a linearidade da curva padrão e a precisão e a exatidão do método. Uma boa linearidade das curvas de calibração com diferentes extratores foi obtida ($r^2 > 0.999$). No entanto, o método de extração para as frações carbonato e orgânica foi menos sensível e teve maior imprecisão intraensaio (11 e 15%, respectivamente). A extração das frações carbonato, óxido e orgânica apresentou maior imprecisão interensaio (11, 34 e 15%, respectivamente). A recuperação de pirofosfato férrico adicionado a um *pool* de conteúdo cecal foi encontrada 1% na intercambiável, 5% na carbonato, 28% na óxido, 28% na orgânica e 38% na fração residual. A fermentação do FOS aumentou a produção de SCFA e reduziu o pH luminal no ceco, o que pode ter contribuído para o aumento da solubilidade do ferro, tal como demonstrado pela mobilização do mineral à fração intercambiável. O método de extração sequencial contribuiu para a avaliação preliminar da interação entre os componentes da dieta no intestino. A posterior avaliação, com diferentes fontes de ferro, vai permitir a melhor compreensão do papel dos FOS na absorção intestinal de ferro.

Palavras-chave: frutooligossacarídeos, ferro, fermentação, conteúdo cecal, ratos

Introdução

Frutooligossacarídeos (FOS) são considerados como fibra alimentar prebiótica, por promoverem a proliferação de bactérias bifidogênicas em vez de espécies patogênicas para o hospedeiro (Roberfroid, 2007). A fermentação dos FOS no intestino grosso afeta o pH luminal e a solubilidade mineral, bem como a superfície de absorção, uma vez que provoca aumento na proliferação de células e do número de criptas (Lobo, 2007; SCHOLZ-AHRENS, 2007). O Ferro (Fe) possui diversos estados de oxidação, sendo as valências Fe^{3+} e Fe^{2+} as mais estáveis em meio aquoso, presentes naturalmente nos alimentos. O Fe, desde que ionizado, é bem absorvido em ambos os estados de valência, sendo as duas formas solúveis no pH do estômago; porém, no processo de digestão, o Fe^{3+} precipita-se mais rapidamente do que o Fe^{2+} , devido a alcalinização do bolo alimentar no duodeno (FRAZER, 2005). Por outro lado, essa precipitação do ferro pode ser inibida por agentes complexantes presentes em alimentos, bem como aminoácidos, ácidos carboxílicos, carboidratos e fosfatos. Portanto, fatores que afetam o pH luminal ou a habilidade quelante de determinados componentes da dieta podem afetar também o seu potencial de óxido-redução e interferir em sua solubilidade (GIBSON, 2007). Técnicas *in vitro* que utilizam reações com quelantes (TESSIER *et al.*, 1979; SIMPSON & PETERS, 1990) têm sido utilizadas para investigar as possíveis interações do Fe com o alimento durante a digestão. Desta forma, o presente trabalho investigou como as espécies químicas de ferro no conteúdo intestinal são afetadas pela fermentação dos FOS. Para tanto, utilizou-se o modelo de depleção e repleção de Hb em ratos anêmicos, que é sistematicamente utilizado em estudos de biodisponibilidade de ferro.

Material e métodos

Fonte de frutanos

A fonte utilizada foi a raftilose (RAF) (*Orafti-Active Food International*, Tienen, Belgium). Amostras de RAF, uma fonte purificada de FOS proveniente da raiz de *Chicorium intybus*, foram doadas pela Clariant S/A (São Paulo, Brasil). De acordo com a análise certificada, o produto contém 93-95% de FOS com moléculas (GF_n) com média DP de 4.

Rações experimentais

A ração oferecida ao grupo CON foi formulada de acordo com a ração AIN-93 (Reeves *et al.*, 1993). Sacarose foi quantitativamente substituída por raftilose na ração RAF. As rações foram formuladas com mistura salina contendo uma fonte padrão de Fe (FeSO_4) ou uma de baixa biodisponibilidade ($\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$) (Fermavi Eletroquímica Ltda, São Paulo, Brasil) (Lobo *et al.*, 2010) (Tabela 1). As rações FS, FP e RAF tiveram $47,1 \pm 2,6$ mg/Kg; $49,4 \pm 0,9$ mg/Kg e $55,3 \pm 3,0$ mg/Kg, respectivamente. O valor energético das rações experimentais foi calculado utilizando-se o fator 4, para carboidratos disponíveis e proteínas, 9 para lipídeos e 1 para os FOS (Roberfroid *et al.*, 1993) – e os resultados foram expressos em kcal por 100 g de amostra.

Delineamento experimental

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF / USP) (CEEA 88/2005 FCF-USP), de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Protocolo de depleção de Ferro

Ratas *Wistar* ($n = 9$) foram obtidas a partir das colônias de Experimentação Animal da FCF / USP, cada uma amamentou 6-8 filhotes machos, que foram alojados em gaiolas de plástico com maravalha e alimentados com ração em pó deficiente em Fe (Association of Official Analytical Chemists, 2006) (12 mg Fe / kg, $n = 7$ ratos fêmeas) ou ração AIN-93M (Reeves *et al.*, 1993) ($n = 2$ ratos fêmeas) durante 21 dias.

No dia do desmame, o total de 68 ratos machos, inicialmente pesando 54-58 g, foi transferido para gaiolas metabólicas individuais, sob temperatura controlada (22 ± 2 °C) e umidade relativa ($55 \pm 10\%$), com um ciclo claro-escuro de luz de 12 horas (luzes acesas das 08h00 às 20h00). Os ratos receberam água desmineralizada *ad libitum* e foram alimentados com dieta deficiente em Fe (ID do grupo, $n = 56$) ou dieta AIN-93G (Reeves *et al.*, 1993.) (CON grupo, $n = 12$) durante 15 dias (período de depleção). Neste período, 10 ratos foram selecionados ID para determinar o peso corporal e os valores de concentração de hemoglobina (Hb). Quando a

concentração de Hb destes animais atingiu o valor médio de $68 \pm 0,7$ g/L, a análise foi realizada em todos os animais. Neste ponto, seis ratos ID e seis ratos CON foram eutanasiados para verificar a eficácia do protocolo de deficiência de Fe (Lobo, 2011).

Recuperação de hemoglobina

Entre os animais deficientes restantes ($n = 50$), 32 foram selecionados para o período de repleção. Estes animais foram divididos em quatro grupos, com base no produto do peso corporal (g) $\times$ concentração de Hb (g / L), FS grupo ($n = 8$) ou FP grupo ($n = 12$), suplementados com RAF (RAF grupo; $n = 12$) a 7,5% ITF (75 g de dieta / kg) (período de repleção, Tabela 1). Os animais consumiram estas rações durante 14 dias, até ao fim do experimento. Os seis animais saudáveis restantes continuaram com a ração AIN-93G durante o período de repleção, e, no fim deste período, a concentração média de Hb neste grupo foi de 132 ± 17 g/L.

No final do período de repleção, os ratos foram anestesiados por via intraperitoneal com uma mistura 1:1:0.4:1.6 (v / v / v / v) de cetamina (10 mg de peso corporal / kg; Vetaset, Fort Dodge, Iowa, EUA), xilazina (25 peso corporal mg / kg; Virbaxil 2%, Virbac, São Paulo, Brasil), acepromazina (2 mg / mL; Acepran 0,2%, Univet S / A Indústria Veterinária, São Paulo, Brasil) e água desmineralizada. Após anestesia, o ceco (e seu conteúdo) foi removido, pesado, colocado numa placa de Petri com gelo (LU et al., 2000) e cortado ao longo da pequena curvatura. O pH do conteúdo cecal foi medido pela inserção de um eletrodo (UP-25; Denver Instrument, Denver, Colorado, EUA), através da junção ileocecal. Aliquotas dos conteúdos foram adequadamente armazenadas a -80°C para análise da concentração de AGCC.

Biodisponibilidade de Fe

No período de repleção, o consumo foi verificado a cada 2 dias e a concentração sanguínea de Hb foi obtida através da punção da cauda no dia 14, pelo método Hb cianeto (Drabkin & Austin, 1935). As concentrações de hemoglobina e de consumo de Fe foram utilizadas para estimar os parâmetros seguintes (Mahoney et al., 1974.):

1) Hb Fe *pool* (mg), assume-se que o volume total de sangue foi 6,7%, o peso corporal e o conteúdo de Fe na Hb foram 0,335%:

$$\text{Hb Fe pool} = [\text{peso (g)} \times \text{Hb (g/L)} \times 6,7 \times 0,335] / 10,000$$

2) Eficiência da regeneração de Hb (HRE):

$$\%HRE = [Hb\ Fe\ pool\ (final) - Hb\ Fe\ pool\ (initial) \times 100] / Fe\ consumo\ (mg)$$

Determinação dos ácidos graxos de cadeia curta no conteúdo

Os ácidos graxos de cadeia curta totais foram analisados por cromatografia gasosa (GC 2010, Shimadzu Scientific Instruments Inc., Kyoto, Japão), de acordo com o método descrito por Zhao *et al.* (2006).

Extração sequencial de ferro no conteúdo intestinal

As espécies de Fe foram determinadas pela técnica de extração sequencial, conforme descrita por Simpson *et al.* (1992) (Figura1), a partir de alíquotas (cerca de 1 g) coletadas de amostras do conteúdo do ceco no t14 do *período de repleção*. As frações foram assim denominadas:

- 1) Fração intercambiável (FI): complexos solúveis de Fe não-heme; utilização do $MgCl_2$ que possui propriedades de troca iônica;
- 2) Fração carbonato (FC): Fe não-heme ligado a compostos insolúveis com pK de 5 ou mais; utilização um de extrator (NaOAc) com propriedades de solubilizar carbonatos;
- 3) Fração óxido (FOx): Fe não-heme em uma forma susceptível à redução ou ligado a compostos com pK de 2 ou mais, ou ambos; utilização de um extrator com propriedades de redução ($NH_2OH.HCl$).
- 4) Fração orgânica (FOr): Fe heme insolúvel, bem como Fe ligado a compostos degradados pela oxidação; utilização de um extrator capaz de enfraquecer as ligações entre o Fe e os compostos orgânicos e sulfatos ($HNO_3 + H_2O_2$).
- 5) Fração residual (FR): Fe ligado a compostos não degradados nas etapas anteriores. Nessa etapa, os extratores são representados por ácidos fortes, na tentativa de extrair completamente o Fe que permaneceu ligado na matriz após as etapas de extração anteriores.

A validação da metodologia da extração sequencial foi realizada pela determinação da linearidade da curva padrão, da sensibilidade, da precisão e da exatidão. A tomada de ensaio foi obtida a partir de um *pool* de conteúdo intestinal (ceco) de ratos *Wistar*, adultos (peso corporal médio 200 g), alimentados com rações comerciais (664,1 µg Fe/g; 12% umidade; Nuvilab NR1, irradiada [10 kGy], Nuvital Nutrientes S/A, Paraná, Brasil), que foi homogeneizado em *turrax* (IKA, T10 basic, NC, EUA). O Fe foi analisado por espectrofotômetro de absorção atômica (AAS; AAnalyst 100, Perkin Elmer, Norwalk, CT, EUA) empregando-se lâmpadas de catodo oco a 283.4 nm e fenda de 0.2 nm após digestão via úmida (HNO₃:H₂O₂, 5:1; v/v). A solução de trabalho foi preparada com cloreto férrico (FeCl₃) (Tritisol, Merck, Darmstadt, Alemanha).

Curvas de calibração e linearidade:

A linearidade das curvas padrão foi avaliada para cada reagente extrator, pela análise de regressão representada pela equação da reta e por meio do coeficiente de correlação (*r* de *Pearson*) ou do coeficiente de determinação (*r*²), obtidos de 6 pontos analisados em 5 replicatas (Tabela 2).

Sensibilidade:

O limite de detecção foi considerado como a concentração correspondente a 3 desvios padrão da média de 10 leituras do branco; o limite de quantificação, pelo mesmo procedimento, foi considerado como a concentração correspondente a 10 desvios padrão da média das 10 leituras do branco (Tabela 2).

Precisão:

A precisão intraensaio (Tabela 2) foi avaliada a partir do resultado de 10 determinações feitas no *pool* de conteúdo intestinal, sob as mesmas condições analíticas (amostras, equipamentos, analista e laboratório). A repetibilidade interensaio (Tabela 2) foi avaliada nesse mesmo *pool*, em três ensaios, em dias diferentes. Os resultados foram expressos em função do desvio padrão relativo (coeficiente de variação).

Exatidão:

A exatidão foi avaliada pela taxa de recuperação de um padrão de Fe ($\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) adicionado à matriz (*pool* de conteúdo intestinal) na concentração de 100% do valor encontrado na fração total. O *pool* com o padrão adicionado foi homogeneizado e dele foram retiradas alíquotas para a extração sequencial. A taxa de recuperação (%) foi calculada de acordo com a fórmula: $[(C_1 - C_3)/C_2] \times 100$, onde C_1 = concentração determinada na amostra adicionada, C_2 = concentração determinada na amostra não adicionada, C_3 = concentração adicionada (Tabela 2).

Análise estatística

A análise dos dados foi realizada com o programa *GraphPad Prism for Windows* (versão 4, 2003; San Diego, CA, EUA). Todos os testes foram realizados assumindo-se hipóteses bilaterais e nível de significância de 5%. Inicialmente, foi utilizada a estatística descritiva para avaliar a média e o desvio padrão (DP) das variáveis de interesse. Os dados são apresentados como média e DP. As comparações das médias das variáveis entre os três grupos (FS, FP e RAF) foram realizadas pela ANOVA. Para as diferenças significativas, o *post-hoc* de *Tukey* foi aplicado para identificar onde ocorreram essas diferenças.

Resultados e discussão

O método foi validado nas condições experimentais do nosso laboratório, utilizando-se um *pool* de conteúdo intestinal de ratos. Para avaliação da linearidade, foram preparadas curvas padrão, utilizando-se dos reagentes usados na extração sequencial, a qual demonstrou boa linearidade (Tabela 2), indicando bom ajuste entre o sinal emitido pelo aparelho e a concentração do analito; no entanto, os dados obtidos mostraram que as curvas padrão correspondentes às frações carbonato (NaOAc 1M como reagente diluente) e orgânica (HNO_3 0,02M + H_2O_2 (300mL/L) + NH_4OAc 3,4M em HNO_3 20%) foram as de menor sensibilidade. Para precisão, foram realizadas 10 repetições da análise (Tabela 2) e foram considerados os resultados dos coeficientes de variação (% CV), nos quais o maior valor intraensaio encontrado foi na fração orgânica (15,5%). Além disso, o método apresentou imprecisão interensaio elevada nas frações carbonato, óxido e orgânica (11, 34 e 15%, respectivamente). Utilizando um sal de Fe de baixa biodisponibilidade (pirofosfato férrico $\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$), a taxa de recuperação variou de 1%, na fração intercambiável, a 38%, na fração residual, corroborando com a sua baixa solubilidade.

Os resultados obtidos no ensaio experimental permitem-nos concluir que a biodisponibilidade de Fe foi positivamente afetada pelo consumo de FOS. No modelo utilizado, a anemia é provocada pela ingestão de rações deficientes em Fe por um período pré-determinado e a velocidade de recuperação dos níveis de Hb circulante é o primeiro parâmetro avaliado, que depende, em última análise, da quantidade de Fe biodisponível (AOACA, 2006c).

A disponibilidade do Fe da dieta depende basicamente do *status* do organismo em relação ao mineral, da sua forma química e da presença e proporção de componentes (promotores e/ou inibidores) na matriz do alimento, que podem influenciar a sua absorção ao longo do trato digestório (SHARP, 2010). O presente trabalho mostrou que a suplementação das rações com os FOS proporcionou recuperação da Hb similar àquela do grupo FS.

O efeito da fermentação bacteriana na biodisponibilidade de minerais em ratos é bem documentado (LOBO, 2006; SCHOLZ-AHRENS, 2007). A produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) afeta o pH no lúmen intestinal e, por sua vez, a solubilidade dos minerais. Assim, avaliamos a solubilidade de Fe no conteúdo intestinal, por meio da técnica da extração sequencial do mineral, que foi modificada do método de extração sequencial de minerais em solo e reproduzida no conteúdo intestinal de ratos. Esse método baseia-se na utilização de uma sequência de diversos extratores com forças iônicas crescentes (do $MgCl_2$ ao HNO_3) e pode possibilitar a obtenção de novos dados para prever a absorção de Fe em resposta à suplementação das dietas com frutanos. Nesse grupo, foi observado o aumento de conteúdo no ceco (FS $2,59 \pm 0,45$ g; FP $2,83 \pm 0,20$ g e RAF $7,83 \pm 1,84$ g) e, quando submetido, à extração sequencial, os dados revelam maior concentração de Fe na FI do grupo RAF (FS $0,06 \pm 0,02$; FP $0,06 \pm 0,01$ e RAF $0,11 \pm 0,02$ μmol Fe/g úmido) – aumento de aproximadamente 183%. Dessa forma, houve mobilização do Fe extraído para a FI nas amostras obtidas no período de repleção (Tabela 3), confirmando seu potencial em modificar a disponibilidade do mineral. Assim, acreditamos que os resultados obtidos são um bom indicativo dos efeitos dessas fibras na solubilidade do mineral no intestino grosso dos animais.

Conclusão

Em ratos anêmicos, a presença de raftilose na rações modificou a solubilidade intestinal de Fe, de uma fonte de baixa biodisponibilidade, quando comparada à ração sem FOS. Esse efeito provavelmente explica a maior biodisponibilidade do pirofosfato, nesse grupo, observada anteriormente (LOBO, 2011). A extração sequencial permitiu identificar a fração intercambiável como a de maior concentração em Fe solúvel, sendo influenciada pela fermentação dos FOS.

Tabelas e figuras

Tabela 1. Formulação das rações experimentais.

Ingrediente (%)	<i>FS</i>	<i>FP</i>	<i>RAF</i>
Caseína ¹	20,00	20,00	20,00
Fibra	5,00	5,00	5,00
Óleo de soja ²	7,00	7,00	7,00
L-cistina	0,30	0,30	0,30
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25
Mix vitamínico ³	1,00	1,00	1,00
Mix mineral ⁴	3,50	3,50	3,50
Sacarose	10,00	10,00	2,50
Amido	49,40	49,40	52,40
Raftilose P95 ⁵	-	-	8,05

AIN = American Institute of Nutrition; ¹ 92.9% proteína; ² Cargill Agrícola S.A.; ³ AIN-93-VX mix vitamínico (Reeves *et al.*, 1993); ⁴ Modificado do mix mineral (AIN-93G-MX, Reeves *et al.*, 1993) oferecendo (g/kg mix): CaCO₃, 538,18; KH₂PO₄, 196; NaCl, 74; K₂SO₄, 46,6; K₃C₆H₅O₇.H₂O, 70,78; MgO, 24; pirofosfato férrico, 4,12 (ou FeSO₄, 2,71); ZnCO₃, 1,65; MnCO₃, 0,63; CuCO₃, 0,3; KIO₃, 0,01; Na₂SeO₄, 0,01025; paramolibdato de amônio tetra-hidratado, 0,00795; Na₂SiO₃, 1,45; KCr(SO₄)₂.12H₂O, 0,275; H₃BO₃, 0,0815; NaF, 0,0635; NiCO₃, 0,0318; LiCl, 0,0174; NH₄VO₃, 0,0066; sacarose, 39,846; ⁵ Orafiti Active Food International (Clariant, São Paulo, Brasil), 94,96% frutanos;

Tabela 2.

Parâmetros de validação do método de extração sequencial em conteúdo intestinal de ratos.

Fração	Linearidade	LD ($\mu\text{g Fe/mL}$)	LQ ($\mu\text{g Fe/mL}$)	Precisão		Recuperação (%)
				intra-ensaio RSD (%)	inter-ensaio RSD (%)	
INT	$y = 0,0256x + 0,0044$ $R^2 = 0,999$	0,031	0,102	6,8	5,8	1
CAR	$y = 0,0253x + 0,0039$ $R^2 = 1$	0,073	0,245	11,5	11,5	5
OXI	$y = 0,0308x + 0,0022$ $R^2 = 1$	0,028	0,094	6,3	34,4	28
ORG	$y = 0,0267x + 0,0044$ $R^2 = 1$	0,075	0,249	15,5	15,5	28
RES	$y = 0,0307x + 0,0034$ $R^2 = 0,997$	0,066	0,22	9,7	6,9	38

INT, Fração intercambiável ; CAR, Fração carbonato; OXI, Fração Oxido; ORG, Fração orgânica e RES, Fração residual. ¹77,17% de umidade.

Tabela 3.

Especiação de ferro ($\mu\text{mol/g}$), obtida pela extração sequencial, no conteúdo intestinal de ratos deficientes em Fe alimentados com rações contendo sulfato ferroso (SF) ou pirofosfato férrico (PF) e suplementadas com 7,5% de FTI como raftilose P95 (RAF) 14 dias.

Frações	Grupos Experimentais		
	FS	FP	RAF
Intercambiável			
$\mu\text{mol Fe/g}$	$0,06 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,02$
$\mu\text{mol/ceco}$	$0,14 \pm 0,03$	$0,18 \pm 0,04$	$0,81 \pm 0,33$
% Total	$2,31 \pm 0,58$	$2,32 \pm 0,42$	$4,50 \pm 0,97$
Carbonato			
$\mu\text{mol Fe/g}$	$1,63 \pm 0,48$	$1,24 \pm 0,22$	$1,06 \pm 0,14$
$\mu\text{mol/ceco}$	$3,96 \pm 0,89$	$3,50 \pm 0,68$	$8,20 \pm 2,31$
% Total	$61,23 \pm 5,67$	$46,48 \pm 7,12$	$44,58 \pm 6,89$
Óxido			
$\mu\text{mol Fe/g}$	$0,30 \pm 0,11$	$0,63 \pm 0,08$	$0,71 \pm 0,24$
$\mu\text{mol/ceco}$	$0,79 \pm 0,38$	$1,78 \pm 0,23$	$5,71 \pm 3,13$
% Total	$11,72 \pm 5,06$	$23,99 \pm 4,99$	$29,38 \pm 7,84$
Orgânica			
$\mu\text{mol Fe/g}$	ND	ND	ND
$\mu\text{mol/ceco}$	ND	ND	ND
% Total	ND	ND	ND
Residual			
$\mu\text{mol Fe/g}$	$0,66 \pm 0,26$	$0,75 \pm 0,34$	$0,54 \pm 0,27$
$\mu\text{mol/ceco}$	$1,66 \pm 0,77$	$2,10 \pm 0,94$	$3,93 \pm 2,53$
% Total	$24,75 \pm 7,79$	$27,20 \pm 9,22$	$21,53 \pm 8,94$
TOTAL			
$\mu\text{mol Fe/g}$	$2,64 \pm 0,62$	$2,68 \pm 0,38$	$2,42 \pm 0,44$
$\mu\text{mol/ceco}$	$6,54 \pm 1,42$	$7,55 \pm 1,06$	$18,66 \pm 7,15$

FS, sulfato ferroso; FP, pirofosfato férrico e RAF, raftilose. ¹ Resultados expressos em base úmida. A fração residual foi obtida pela diferença da fração total menos a soma de todas as outras frações. Fração intercambiável (MgCl_2 1M); Fração carbonato (NaOAc 1M); Fração óxido ($\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ 0,04M em ácido acético [250 mL/L]); Fração orgânica (HNO_3 0,02M + H_2O_2 (300mL/L) + NH_4OAc 3,4M em HNO_3 20%); Fração residual (HNO_3 1%). ² Peso (g) do conteúdo cecal para os grupos FS, FP e RAF: $2,59 \pm 0,45$; $2,83 \pm 0,20$ e $7,83 \pm 1,84$, respectivamente.

Figura 1.

Extração sequencial das espécies de Fe no conteúdo intestinal. Após cada etapa de extração, os extratos foram submetidos à centrifugação a 10.000 g por 30 min para obtenção do sobrenadante, o qual foi coletado para análise do mineral por EAA.

REFERÊNCIAS

- [AOAC] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists*. 18th ed., Maryland, Current through Revision 1, 2006a, chapter 12, p.7 (method 960.52).
- [AOAC] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists*. 18th ed., Maryland, Current through Revision 1, 2006b, chapter 50, p.15-7 (method 985.35).
- [AOAC] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists*. 18th ed., Maryland, Current through Revision 1, 2006c, chapter 45, p.80-1 (method 974.31).
- COCATO, M.L.; RÉ, M.I.; TRINDADE NETO, M.A. *et al.* Avaliação por métodos *in vitro* e *in vivo* da biodisponibilidade de sulfato ferroso microencapsulado. *Rev. Nutr.*, v.20, p.239-247, 2007.
- DRABKIN, D.L.; AUSTIN, J.H. Spectrophotometric studies. II. Preparations from washed blood cells: nitric oxide hemoglobin and sulphemoglobin. *J. Biol. Chem.*, v.112, p.51-65, 1935.
- FRAZER, D.M.; ANDERSON, G.J. Iron imports I. Intestinal iron absorption and its regulation. *Am.J.Physiol.*, v.289, p.G631-5, 2005.
- GIBSON, R.S. The role of diet- and host-related factors in nutrient bioavailability and thus in nutrient-based dietary requirement estimates. *Food and Nutrition Bulletin*, n.28 (Suppl.1), p.S77-S100, 2007.
- LOBO, A.R.; COCATO, M.L.; BORELLI, P.; GAIEVSKI, E.H.S.; CRISMA, A.R.; NAKAJIMA, K.; NAKANO, E.Y.; COLLI, C. Iron bioavailability from ferric pyrophosphate in rats fed fructan-containing yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.) flour. *Food Chem.*, v. 126(3), p.885-891, 2011.
- LOBO, A.R.; COLLI, C.; ALVARES, E.P.; FILISETTI, T.M.C.C. Effects of fructans-containing yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.) flour on caecum mucosal morphometry, calcium and magnesium balance and bone calcium retention in growing rats. *Brit. J. Nutr.*, v.97, p.766-85, 2007.

LOBO, A.R.; COLLI, C.; FILISETTI, T.M.C.C. Fructooligosaccharides improve bone mass and biomechanical properties in rats. *Nutrition Research*, v.26, p.413-20, 2006.

LU, ZX; GIBSON, PR; MUIR, JG; FIELDING, M; O'DEA, K. (2000) Arabinoxylan fiber from a by-product of wheat flour processing behaves physiologically like a soluble, fermentable fiber in the large bowel of rats. *J Nutr* 130, 1984-1990, 2000.

MAHONEY, AW; VAN ORDEN, CC; HENDRICKS, DG. Efficiency of converting food iron into haemoglobin by the anemic rat. *Nutr Metab*, v.17:223-230, 1974.

PROSKY, L.; ASP, N.G.; SCHWEIZER, T.F.; DEVRIES, J.W.; FURDA, I. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study. *J. AOAC Int.*, v.71, p.1017-23, 1988.

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

ROBERFROID, M. Prebiotics: the concept revisited. *J Nutr*, v.137, p. 830S-837S, 2007.

ROBERFROID, M.; GIBSON, G. R.; DELZENNE, N. The biochemistry of oligofructose, a nondigestible fiber: an approach to calculate its caloric value. *Nutr. Rev.*, v.51, p.137-46, 1993.

SCHOLZ-AHRENS, K; SCHREZENMEIR, J. Inulin and oligofructose and mineral metabolism: the evidence from animal trials. *J Nutr*, v.137, p. 2513-2523, 2007.

SHARP, P.A. Intestinal iron absorption: regulation by dietary & systemic factors. *Int J Vitam Nutr Res.*, v.80(4-5), p.231-242, 2010.

SIMPSON, R.J.; SIDHAR, S.; PETERS, T.J. Application of selective extraction to the study of iron species present in diet and rat gastrointestinal tract contents. *Brit. J. Nutr.*, v.67, p.437-44, 1992.

STEEGMANS, M.; ILIAENS, S.; HOEBREGS, H. Enzymatic, spectrophotometric determination of glucose, fructose, sucrose, and inulin/oligofructose in foods. *J. AOAC Int.*, v.87, p.1200-7, 2004.

TESSIER, A.; CAMPBELL, P.G.C.; BISSON, M. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate metals. *Anal. Chem.*, v.51, p.844-51, 1979.

ZHAO, G; NYMAN, M; JÖNSSON, JA. Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography. *Biomed Chromatography*,. v.20(8), p.674-82, 2006.