FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
14294

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

Sobrecarga moderada de ferro em ratos: interação com frutanos e/ou fitato no metabolismo hepático e ósseo

Maria Lucia Cocato

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Célia Colli

São Paulo
2008

DEDALUS - Acervo - CQ

30100014831

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

Cocato, Maria Lucia
C659s Sobrecarga moderada de ferro em ratos: interação com frutanos e/ou fitato no metabolismo hepático e ósseo / Maria Lucia Cocato. -- São Paulo, 2008.
91p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Orientador: Colli, Célia

1. Nutrição experimental : Ciências dos alimentos 2. Ferro: Ciência dos alimentos I. T. II. Colli, Célia, orientador.

641.1 CDD

Maria Lucia Cocato

Sobrecarga moderada de ferro em ratos: interação com frutanos e/ou fitato no metabolismo hepático e ósseo

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Célia Colli
orientadora/presidente

_____
1°. examinador

_____
2°. examinador

_____
3°. examinador

_____
4°. examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2008.

Agradecimentos

À minha mãe, Lucia R. Cocato, que, com toda a sua sabedoria, soube me ensinar que os mais importantes ingredientes do ser humano residem na sua fé e perseverança para superar os obstáculos.

À minha irmã e amiga, Cida Cocato, por todos os momentos em que soube me ouvir, pelas palavras de incentivo e pelo maior carinho de todos: o de compartilhar comigo as suas filhas Mariana C. Zuchetti e Luisa C. Zuchetti, meus potes de ouro no fim do arco-íris.

Aos meus irmãos José Carlos Cocato e Valdecir S. Cocato, pelo carinho vivenciado em família.

A todos os meus familiares pelo incentivo e confiança, fundamentais para o meu crescimento.

À memória do meu pai, Pedro Cocato, e do meu irmão, Pedro Luiz Cocato.

- À Profa. Célia Colli, minha professora de gradução e orientadora de Mestrado e Doutorado, um especial agradecimento por ter me recebido em seu laboratório, por ter sido tão generosa ao partilhar seus conhecimentos e idéias e pela imensa confiança depositada em mim, dando-me liberdade absoluta na realização do meu trabalho.

- Ao amigo de todas as horas, Alexandre Rodrigues Lobo, por tudo o que conseguimos realizar juntos. Nunca vou esquecer as discussões para a elaboração do projeto FAPESP, o processamento de 500kg de raízes de yacon, as noitadas peletizando as rações e todas as excelentes discussões sobre os resultados encontrados, além daquelas conversas pelo MSN, claro. Valeu a pena cada momento.

- Às queridas amigas Helena Pontes Chiebao e Renata Trommer, por terem me mostrado que a verdadeira amizade é o maior tesouro que se pode obter. Obrigada por terem me ensinado o árduo caminho para a fé.

- À amiga querida de tantos anos, Walkyria Sigler, pelas longas conversas ao telefone, pelo carinho de tantos anos e pelos constantes incentivos.

- À Patrícia Dias, estagiária do projeto, pela participação em várias atividades relacionadas ao projeto, em especial na determinação da atividade das enzimas antioxidantes.

- À amiga e técnica do laboratório Tatiana Garofalo, pela imensa ajuda no Biotério durante os 3 meses de ensaio, pela participação no sacrifício dos animais e, acima de tudo, pela amizade sincera.

- Aos amigos do laboratório, Luciana Setaro, Caroline Capitani (ex-laboratório), Viviane Rocha, Ivana Lavanda, Liliana Mistura, Cassiana Ganem, Eduardo Gaievski, William Latorre, Edna Machado, Cristiane Hermes e Bruna Pincette, por tantos momentos partilhados, pelas risadas e todas aquelas longas reuniões. Tenho certeza que jamais esquecerei os momentos que passamos juntos.

Agradecimentos

À minha mãe, Lucia R. Cocato, que, com toda a sua sabedoria, soube me ensinar que os mais importantes ingredientes do ser humano residem na sua fé e perseverança para superar os obstáculos.

À minha irmã e amiga, Cida Cocato, por todos os momentos em que soube me ouvir, pelas palavras de incentivo e pelo maior carinho de todos: o de compartilhar comigo as suas filhas Mariana C. Zuchetti e Luísa C. Zuchetti, meus potes de ouro no fim do arco-íris.

Aos meus irmãos José Carlos Cocato e Valdecir S. Cocato, pelo carinho vivenciado em família.

A todos os meus familiares pelo incentivo e confiança, fundamentais para o meu crescimento.

À memória do meu pai, Pedro Cocato, e do meu irmão, Pedro Luiz Cocato.

- À Profa. Célia Colli, minha professora de gradução e orientadora de Mestrado e Doutorado, um especial agradecimento por ter me recebido em seu laboratório, por ter sido tão generosa ao partilhar seus conhecimentos e idéias e pela imensa confiança depositada em mim, dando-me liberdade absoluta na realização do meu trabalho.

- Ao amigo de todas as horas, Alexandre Rodrigues Lobo, por tudo o que conseguimos realizar juntos. Nunca vou esquecer as discussões para a elaboração do projeto FAPESP, o processamento de 500kg de raízes de yacon, as noitadas peletizando as rações e todas as excelentes discussões sobre os resultados encontrados, além daquelas conversas pelo MSN, claro. Valeu a pena cada momento.

- Às queridas amigas Helena Pontes Chiebao e Renata Trommer, por terem me mostrado que a verdadeira amizade é o maior tesouro que se pode obter. Obrigada por terem me ensinado o árduo caminho para a fé.

- À amiga querida de tantos anos, Walkyria Sigler, pelas longas conversas ao telefone, pelo carinho de tantos anos e pelos constantes incentivos.

- À Patrícia Dias, estagiária do projeto, pela participação em várias atividades relacionadas ao projeto, em especial na determinação da atividade das enzimas antioxidantes.

- À amiga e técnica do laboratório Tatiana Garofalo, pela imensa ajuda no Biotério durante os 3 meses de ensaio, pela participação no sacrifício dos animais e, acima de tudo, pela amizade sincera.

- Aos amigos do laboratório, Luciana Setaro, Caroline Capitani (ex-laboratório), Viviane Rocha, Ivana Lavanda, Liliana Mistura, Cassiana Ganem, Eduardo Gaievski, William Latorre, Edna Machado, Cristiane Hermes e Bruna Pincette, por tantos momentos partilhados, pelas risadas e todas aquelas longas reuniões. Tenho certeza que jamais esquecerei os momentos que passamos juntos.

- À Silvânia M.P. Neves, responsável pelo Biotério, às técnicas Flávia P. Ong, Renata S. Fontes, Fátima e a todos os funcionários direta ou indiretamente envolvidos no projeto, muito obrigada pelo desvelo com que cuidaram dos animais nos momentos em que eu não estava presente.

- Às professoras colaboradoras do projeto: Eliana Parisi, Vanda Jorgetti e Primavera Borelli, um agradecimento especial por terem aceitado fazer parte do projeto, sem quaisquer ressalvas.

- Às alunas de pós-graduação do Bloco 17, Amanda Rabello e Karina Nakajima, e à técnica Mariana C. F. Silva, pela intensa participação no sacrifício dos animais e pelas análises realizadas.

- Ao Prof. Jorge Mancini Filho, por ter me dado livre acesso ao seu laboratório para realizar experimentos e pelas palavras de incentivo.

- À Rosângela P. Torres, pelo carinho ao me ensinar a extrair os ácidos graxos e pela realização das leituras no cromatógrafo.

- À amiga e professora Anna Karenina A. Martins, pelas análises das enzimas antioxidantes, mas, muito mais do que isso, por todos aqueles anos compartilhados no Crusp.

- À Profa. Lilian Sá que, apesar de tantos compromissos, aceitou fazer parte do projeto através das análises histopatológicas do fígado.

- Ao Prof. Hélio Vannucchi e à técnica Mônica, pela determinação da vitamina E.

- Ao técnico do B-16, Alexandre M. Rodrigues, pelo auxílio na realização do ensaio mecânico.

- Ao Álvaro A. F. Pereira, pelo belo trabalho de tradução dos textos para o inglês e, acima de tudo, por ter aceitado fazer tudo com um prazo mínimo e, mesmo assim, não perder a paciência nas centenas de vezes em que alterei o texto e as tabelas.

- Ao amigo e Prof. Eduardo Purgatto, pela amizade e pelos longos papos corredores afora.

- À Profa. Dominique C. Hermine Fischer, por ceder a estufa ventilada altas horas da noite, quando achávamos que perderíamos todo o trabalho do dia.

- Aos Professores Thomaz P. Ong e Nágila R. T. Damasceno, pelas valiosas sugestões no exame de qualificação.

- Ao Renato Astorino, pela ajuda na peletização das rações madrugada adentro.

- Ao meu amigo e sempre técnico de atletismo Celso B. Teixeira, que foi o meu primeiro incentivador a fazer a pós-graduação.

- Ao Eduardo Nakano, pelas análises estatísticas.

- À técnica Ivanir Pires, pela ajuda nos momentos mais atribulados.

- Aos secretários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental: Mônica D. Perussi, Edílson F. Santos e Cleonice E. C. Gonçalves, e aos secretários do Curso de Pós-Graduação: Jorge de Lima e Elaine M. Ychico (não sei o que seria de mim sem você!). Muitíssimo obrigada por vocês terem sido sempre tão carinhosos.

- À funcionária do Departamento Maria de Lourdes Pedrosa (Lurdinha), pelos papos, risadas e, claro, lavagem dos materiais. Muitíssimo obrigada, Lu.

- A todos aqueles que, por descuido meu, não foram mencionados, meus sinceros agradecimentos.

- Ao CNPq, pela bolsa concedida, e à FAPESP, pelo auxílio à pesquisa.

A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É esta a emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e arte. O homem que desconhece esse encanto, incapaz de sentir admiração e estupefação, esse já está, por assim dizer, morto e tem os olhos extintos.

(Albert Einstein)

RESUMO

COCATO, M. L. **Sobrecarga moderada de ferro em ratos: interação com frutanos e/ou fitato no metabolismo hepático e ósseo.** São Paulo, 2008. [Tese de Doutorado – Programa de Ciência dos Alimentos – Universidade de São Paulo].

O excesso de Fe no organismo gera espécies reativas de oxigênio (ERO) que são potencialmente tóxicas. Entretanto, a magnitude dos efeitos da exposição à moderada sobrecarga de Fe e da sua interação com facilitadores e/ou inibidores da absorção mineral não é conhecida. O objetivo deste trabalho foi avaliar esses efeitos e a sua interação com frutanos e/ou fitato (facilitadores e inibidores da absorção de Fe, respectivamente) nos índices séricos do estado nutricional em Fe, no perfil dos lipídeos séricos e em parâmetros do metabolismo hepático e ósseo. Para o experimento foram utilizados 34 ratos machos Wistar, pesando inicialmente 49,3 $\pm$ 3,9g, alojados individualmente em gaiolas de aço semimetabólicas por 92 dias. Uma dieta AIN-93G (Dieta 1: Grupo Controle) e quatro dietas AIN93G modificadas foram usadas para o estudo, com as seguintes características: Dieta 2: sobrecarga moderada de ferro com 550mgFe/kg de ração (Grupo SBC); Dieta 3: sobrecarga moderada de ferro + 18% de farinha de yacon (Grupo SBC+FY); Dieta 4: sobrecarga moderada de ferro + 0,6% de fitato (Grupo SBC+FIT); Dieta 5: sobrecarga moderada de ferro + 18% de farinha de yacon + 0,6 % de fitato (Grupo SBC+FY+FIT). Os resultados demonstraram que a moderada sobrecarga de Fe ou a sua interação com farinha de yacon e/ou fitato não alterou os índices séricos do estado nutricional em Fe. Ocorreu aumento na atividade sérica da AST apenas no grupo SBC ($p=0,055$). Nos grupos SBC e SBC+FY houve diminuição na concentração do colesterol sérico ($p=0,002$) e, apenas no grupo SBC+FY+FIT, diminuição da concentração sérica do VLDL. No fígado, houve aumento significativo ($p=0,002$) da concentração de Fe não-heme nos grupos IO (+83%) e SBC+FIT (+117%) e, em todos os grupos SBC, na atividade da enzima GPx ($p=0,000$). A atividade da CAT foi menor ($p=0,036$) apenas para o grupo SBC+FY+FIT. Em todos os grupos SBC ocorreu significativo aumento nos depósitos de hemossiderina em torno das células de Kupffer ($p=0,000$). Houve aumento na apoptose em todos os grupos SBC, com os grupos SBC+FY e SBC+FY+FIT apresentando o maior número de corpúsculos apoptóticos/área (+405% e +342%, respectivamente) ($p=0,000$). Não houve alteração nos parâmetros relacionados ao metabolismo ósseo. No grupo SBC+FY houve significativo aumento na absorção aparente de Ca ($p<0,05$). **Conclusões:** A moderada sobrecarga de Fe não alterou os índices séricos do estado nutricional em Fe, mas resultou em alterações no tecido hepático e no perfil dos lipídeos séricos. Com exceção do perfil de lipídeos séricos, no qual apenas o fitato pareceu exercer efeito protetor, nos demais parâmetros avaliados a interação com farinha de yacon rica em frutanos e/ou fitato reverteu parcial ou totalmente as alterações induzidas pela moderada sobrecarga de Fe.

Palavras-chave: sobrecarga moderada de Fe, farinha de yacon, fitato, fígado, osso.

ABSTRACT

COCATO, M. L. **Moderate iron overload in rats: interaction with fructans and/or phytate in the hepatic and bone metabolisms.** São Paulo, 2008. [Doctoral Thesis – Food Science Program – University of São Paulo].

Excess Fe in the organism generates potentially toxic reactive oxygen species (ROS). However, the magnitude of the effects of a moderate Fe overload and its interaction with factors which inhibit or facilitate mineral absorption is not known. The aim of the present work was to evaluate such effects and their interaction with fructans and/or phytate (compounds which facilitate and inhibit Fe absorption, respectively) on serum iron status indices, on the profile of serum lipids and on hepatic and bone metabolism parameters. In the experiment, thirty-four male Wistar rats initially weighing 49.3 ± 3.9g were used. The rats were housed in individual stainless-steel wire-mesh cages for 92 days. An AIN-93G diet (Diet 1: Control Group) and four modified AIN-93G diets were used in the study. The modified diets presented the following formulations: Diet 2: moderate Fe overload with 550mgFe/kg diet (IO Group); Diet 3: moderate Fe overload + 18% yacon flour (IO-YF Group); Diet 4: moderate Fe verload + 0.6% phytate (IO-Phy Group); Diet 5: moderate Fe overload + 18% yacon flour + 0.6 % phytate (IO-YF-Phy Group). The results demonstrated that a moderate Fe overload or its interaction with yacon flour and/or phytate did not alter the serum iron status indices. An increase in the serum AST activity was observed only in the IO group (p=0,055). In the IO and IO-YF groups, there was a reduction in the serum cholesterol concentration (p=0,002) and a reduction in the serum VLDL concentration was observed only in the IO-YF-Phy group. In the liver, there was a significant increase (p=0,002) in non-heme Fe concentration in the IO (+83%) and IO-Phy (+117%) groups. Also, GPx activity was significantly increased (p=0,000) in all IO groups. CAT activity was lower (p=0,036) only in the IO-YF-Phy group. A significant increase in hemosiderin deposition around Kupffer cells was observed in all IO groups (p=0,000). Apoptosis was increased in all IO groups, whereas the IO-YF and IO-YF-Phy groups showed the largest number of apoptotic bodies/area (+405% and +342%, respectively) (p=0,000). There was no alteration in the parameters related to bone metabolism. In the IO-YF group, there was a significant increase in Ca apparent absorption (p<0,05).**Conclusions:** The moderate Fe overload did not alter the serum iron status índices, but led to alterations in the hepatic tissue and in the profile of serum lipids. Except for the profile of serum lipids where only phytate seemed to have a protective effect, in the other evaluated parameters the interaction with yacon flour rich in fructans and/or phytate partially or totally reversed the alterations induced by the moderate Fe overload.

Keywords: moderate Fe overload, yacon flour, phytate, liver, bone

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

Pág.

1. INTRODUÇÃO 01
2. REVISÃO DA LITERATURA 04
2.1 Metabolismo do Fe 04
2.2 Sobrecarga de Fe 07
2.3 Sobrecarga de Fe e estresse oxidativo 11
2.4 Fitato 15
2.5 Frutanos 19
3. REFERÊNCIAS 22
4. OBJETIVOS 35
4.1 Objetivo geral 35
4.2 Objetivo específico 35

CAPÍTULO 1. Efeitos da moderada sobrecarga de Fe e sua interação com farinha de yacon e/ou fitato nos índices de estresse oxidativo hepático e no perfil dos lipídeos séricos. Estudo em ratos 36

RESUMO 36
INTRODUÇÃO 36
MATERIAL E MÉTODOS 39
Animais e dietas 39
Protocolo experimental 40
Composição química das dietas experimentais 40
Coleta de sangue 41
Parâmetros hepáticos 41
Concentração de minerais 41
Incorporação de ácidos graxos 42
Atividade das enzimas antioxidantes 42
Atividade da catalase 42
Atividade da superóxido dismutase total e da isoforma Mn-SOD 42
Atividade da glutationa peroxidase 43
Análises histológicas 43
Vitamina E 44
Fezes 44
Análises estatísticas 44
RESULTADOS 45
Composição química das dietas experimentais 45
Ganho de peso e consumo alimentar 45
Parâmetros fecais 45

Umidade 45
Ferro 46
Cobre e zinco 46
Absorção aparente 46
Análises do sangue 46
Índices do estado nutricional em Fe 46
Concentração dos lipídeos séricos e atividade das transaminases séricas 46
Colesterol 46
Triacilgliceróis 47
HDL e VLDL 47
AST e ALT 47
Parâmetros hepáticos 47
Concentração de Fe, Cu e Zn 47
Incorporação e ácidos graxos 47
Vitamina E, SOD total, MnSOD e CuZnSOD 47
Catalase 48
GPx 48
Análises histológicas 48
Macroscopia 48
Microscopia de luz 48
Avaliação semiquantitativa dos depósitos de hemossiderina 48
Apoptose 48
DISCUSSÃO 49
CONCLUSÃO 54
REFERÊNCIAS 55
CAPÍTULO 2. Efeitos da moderada sobrecarga de Fe e da sua interação com farinha de yacon e/ou fitato no metabolismo ósseo. Estudo em ratos. 71
RESUMO 71
INTRODUÇÃO 71
MATERIAL E MÉTODOS 74
Animais e dietas 74
Protocolo experimental 75
Composição química das dietas experimentais 76
Balanço mineral 76
Concentração de minerais e avaliação biomecânica nos ossos 77
Determinação da osteocalcina plasmática 77
Determinação da creatinina e da deoxipiridinolina (DPD) urinárias 77
Análise estatística 77

RESULTADOS 78
Composição química das dietas experimentais 78
Ganho de peso e consumo alimentar 78
Excreção de minerais nas fezes e absorção aparente 79
Parâmetros bioquímicos ósseos 80
Concentração de minerais e teste biomecânico nos ossos 80
DISCUSSÃO 81
REFERÊNCIAS 84
5. CONCLUSÕES DA TESE DE DOUTORADO 90

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

Pág.

Tabela 1. Recomendações nutricionais para ingestão de Fe 10

CAPÍTULO 1

Pág.

Tabela 1. Formulação das dietas experimentais 63

Tabela 2. Consumo de ração, ganho de peso, consumo de minerais e excreção fecal de minerais de ratos alimentados com rações controle ou com moderada sobrecarga de Fe suplementadas ou não com farinha de yacon e/ou fitato por 92 dias 64

Tabela 3. Parâmetros bioquímicos de ratos alimentados com rações controle ou com moderada sobrecarga de Fe suplementadas ou não com farinha de yacon e/ou fitato por 92 dias 65

Tabela 4. Concentração de minerais e atividade antioxidante no tecido hepático de ratos alimentados com rações controle ou com moderada sobrecarga de Fe suplementadas ou não com farinha de yacon e/ou fitato por 92 dias 66

Tabela 5. Número de corpúsculos apoptóticos e células de Kupffer com depósito de hemossiderina no fígado de ratos alimentados ações controle ou com moderada sobrecarga de Fe suplementadas ou não com farinha de yacon e/ou fitato por 92 dias 67

CAPÍTULO 2

Pág.

Tabela 1. Formulação das dietas experimentais 88

Tabela 2. Consumo de ração, ganho de peso, consumo de minerais e excreção fecal de minerais de ratos alimentados com ração controle ou rações com moderada sobrecarga de Fe suplementadas ou não com farinha de yacon e/ou fitato por 92 dias..... 89

LISTA DE ESQUEMAS

		Pág.
Esquema 1.	Reações de Fenton e Haber-Weiss	11
Esquema 2.	Destruição das ERO pela SOD, CAT e GPx	12

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

		Pág.
Figura 1.	Captação intestinal de Fe	06
Figura 2.	Regulação da expressão da ferroportina pela hepcidina	07
Figura 3.	Secções de um grão de trigo	16
Figura 4.	Estrutura molecular do ácido fítico	17
Figura 5.	Representação da estrutura química geral dos frutanos	20

CAPÍTULO 1.

		Pág.
Figura 1.	Corpúsculos apoptóticos no fígado	68
Figura 2.	Depósito de hemossiderina no fígado	69

LISTA DE LEGENDAS

		Pág.
Legenda 1.	Cortes histológicos do fígado	70
Legenda 2.	Cortes histológicos do fígado	70

1. INTRODUÇÃO

Programas de fortificação de alimentos com sais de Fe vêm sendo utilizados em vários países como uma das principais estratégias para combater a anemia por deficiência de Fe, a mais comum doença nutricional do mundo, que afeta quase dois milhões de pessoas, entre homens e mulheres, em todas as faixas etárias (WHO, 2007). No Brasil, onde, em algumas cidades, a prevalência atingiu índice de até 70% entre crianças de 0 a 5 anos de idade (WHO, 2007), esse programa foi estabelecido em 2002, através da resolução RDC n. 344 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002) que tornou obrigatória a fortificação das farinhas de trigo e milho com Fe e ácido fólico.

Entretanto, por atingir inespecificamente todos os grupos populacionais, há a preocupação de que indivíduos que já consumam o Fe dentro das recomendações, e tenham seus estoques corporais repletos, possam ingerir o mineral acima das recomendações propostas nas IDR (Ingestão Dietética de Referência) (INSTITUTE OF MEDICINE, 2000). Sabe-se que, em modelos de hemocromatose hereditária, o excesso de Fe no organismo pode levar a alterações fisiológicas que afetam o metabolismo hepático, ósseo, intestinal e o perfil das lipoproteínas plasmáticas. Contudo, poucos são os trabalhos na literatura relativos à moderada sobrecarga de Fe em indivíduos ou animais saudáveis.

Por outro lado, em grande parte dos trabalhos desenvolvidos, a avaliação do excesso de Fe foi realizada de forma isolada, em dietas semipurificadas, sem a presença de inibidores ou facilitadores da absorção do mineral. Entretanto, nos últimos anos, os estudos das propriedades funcionais dos componentes da dieta demonstram, cada vez mais, a sua complexidade e apontam que as avaliações devem supor essas inter-relações.

Nesse contexto, um dos componentes da dieta mais estudado quando se pensa na absorção de Fe é o fitato (IP6 - hexafosfato de mioinositol). São inúmeros os trabalhos na literatura que relatam diminuição na biodisponibilidade do Fe com o consumo desse composto (HALLBERG *et al.*, 1987; HURREL *et al.*, 1992; HUNT, 2003; LIND *et al.*, 2003; BOHN *et al.*,

2008), o que ocorre em função da ligação irreversível entre os grupos fosfato do composto e o Fe, tornando o mineral indisponível para absorção no lúmen intestinal. Entretanto, Hallberg e colaboradores (1989) demonstraram que, na presença de ácido ascórbico, essa interferência foi reduzida, indicando que os componentes da dieta exerciam importante papel na avaliação da biodisponibilidade dos minerais.

Além disso, na última década, o fitato tem demonstrado exercer efeitos sistêmicos, como redução da carcinogênese e dos ácidos graxos livres no soro (SHARMA *et al.*, 2003; SZKUDELSKI, 2005; VUCENIK e SHAMSUDDIN, 2006), podendo ser considerado uma referência para os estudos dessas inter-relações.

Por outro lado, em se tratando do aumento da biodisponibilidade de Fe, os carboidratos fermentáveis, em particular os frutanos [inulina e frutooligossacarídeos (FOS)], têm recebido considerável atenção na última década. Estes, por serem resistentes à digestão no intestino delgado, são metabolizados pela microbiota residente no intestino grosso (ROBERFROID, 2007), processo que resulta na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) que desempenham importante função na manutenção da integridade da mucosa intestinal, no metabolismo de carboidratos e lipídeos e na função imunológica (SEIFERT e WATZL, 2007; DELZENE *et al., 2007)*. Além disso, a produção de AGCC leva à diminuição do pH, aumentando a biodisponibilidade de minerais (SCHOLZ-AHRENS *et al.,* 2007). A fermentação aumentada no ceco também promove, aparentemente, melhor hidrólise do fitato, minimizando os efeitos negativos deste na absorção de minerais (LOPEZ *et al.*, 2000). Desta forma, o consumo dos FOS tem sido associado com efeitos locais e sistêmicos, influenciando a homeostase de minerais, o metabolismo ósseo e intestinal e a concentração dos lipídeos séricos. Mais recentemente, Lobo e colaboradores (2007) demonstraram que, em ratos, a utilização de ração suplementada com farinha de yacon (*Smallanthus sonchiflolius*), rica fonte de FOS, modificou a arquitetura da mucosa cecal, a retenção mineral óssea e as propriedades mecânicas dos ossos (carga máxima e elasticidade).

Assim, considerando que fatores de ordem fisiológica e nutricional podem interferir na absorção, no transporte e no armazenamento do Fe

dietético, a proposta deste trabalho é avaliar se, consumidos em uma mesma dieta, fitato e/ou farinha de yacon, rica em frutanos, podem reverter os possíveis danos causados pela sobrecarga de Fe nos tecidos hepático e ósseo e no perfil dos lipídeos séricos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Metabolismo do ferro

O Fe é essencial para grande número de processos biológicos, variando do transporte de O_2 à síntese de DNA e transporte de elétrons. Dessa forma, a aquisição de Fe é uma necessidade fundamental em quase todos os organismos vivos (MCKIE *et al.*, 2001). Em homens e mulheres adultos sadios estima-se que a sua concentração represente, respectivamente, 45 e 35mg/kg do peso corporal (ANDREWS, 1999). Destes, entre 60 e 70% estão presentes na hemoglobina, 10% estão presentes nas formas de mioglobina, citocromos e enzimas contendo Fe (oxidases, catalase, peroxidases, citocromos, ribonucleotídeo redutase, aconitase e óxido nítrico sintase) e 20 a 30% estão estocados como ferritina e hemossiderina nos hepatócitos e nos macrófagos do sistema reticuloendotelial (SRE) (CONRAD *et al.*, 1999).

Umas das mais peculiares características do metabolismo do Fe é o grau com que este é conservado. Na ausência de sangramento e gravidez, dos típicos 3 a 4g de Fe contidos no organismo adulto normal, em torno de 0,03% (ou 1mg) são perdidos diariamente, principalmente como resultado de perdas obrigatórias de células mucosas esfoliadas (KNUTSON e WESSLING-RESNICK, 2003). Desta forma, um indivíduo adulto deve absorver aproximadamente 1mg de Fe da dieta por dia para a manutenção do balanço de Fe corporal. Essa necessidade é maior para crianças, principalmente em períodos de rápido crescimento (dos 6 aos 24 meses), adolescentes, mulheres em idade fértil e mulheres grávidas (INSTITUTE OF MEDICINE, 2000).

Por outro lado, esta relativamente pequena quantidade de Fe que deve ser absorvida para suprir as perdas diárias contrasta com a grande necessidade interna. A medula óssea, por exemplo, utiliza em torno de 24mg de Fe por dia para a produção de cerca de 200 bilhões de novos eritrócitos. Para alcançar essa demanda o Fe deve ser reciclado das células vermelhas senescentes (KNUTSON e WESSLING-RESNICK, 2003). Esse processo ocorre via macrófagos do SRE, principalmente no baço (o sítio mais ativo), no fígado e na medula óssea.

A absorção do Fe da dieta ocorre no intestino delgado e o conhecimento dos mecanismos que a regulam avançou bastante na última década, principalmente em função da utilização das técnicas de biologia molecular, que levou à identificação de proteínas relacionadas à regulação da absorção do Fe pelos enterócitos, os quais representam o ponto chave da absorção desse mineral pelo organismo (CHEN *et al.*, 2003). O Fe deve atravessar a membrana apical do enterócito, translocar-se da superfície apical à superfície basolateral e, desse local, chegar à circulação sangüínea. A absorção de Fe não-heme, até o presente momento, tem sido mais bem caracterizada que a de Fe heme.

O Fe não-heme dos alimentos existe, primariamente, na valência férrica (Fe^{3+}) de baixa biodisponibilidade, devendo ser primeiro reduzido à valência ferrosa (Fe^{2+}) que, por ser solúvel no pH do lúmen intestinal, é mais biodisponível. A enzima responsável por essa redução, Dcytb (citocromo b duodenal), foi descrita em camundongos por McKie e colaboradores em 2001. Após redução, o Fe é absorvido via DMT1 (transportador de metais divalentes 1), localizado na borda apical dos enterócitos maduros do duodeno e jejuno proximal (FRAZER e ANDERSON, 2005; MACKENZIE e GARRICK, 2005) (Figura 1).

Por outro lado, os mecanismos para a absorção do Fe heme não estão ainda elucidados. Sugere-se que este seja absorvido no enterócito como uma metaloproteína intacta, via endocitose mediada por receptor (RME). Após internalização, o Fe é liberado do anel de porfirina pela ação da enzima heme oxigenase, passando a fazer parte do *pool* de Fe intracelular (LIEU *et al.*, 2001; WEST e OATES, 2008) (Figura 1). Uma vez no enterócito, o Fe de ambas as fontes pode ser utilizado para processos metabólicos, ser estocado na forma de ferritina ou, ainda, ser translocado para a circulação sangüínea. Este mecanismo é mediado pela ferroportina 1, proteína de transporte de Fe (também conhecida como IREG1: transportador 1 regulado pelo ferro), e pela hefaestina, uma ferroxidase dependente de Cu (WESSLING-RESNICK, 2006), liberando o Fe para a transferrina plasmática (Figura 1). Uma vez ligado à transferrina, o Fe é então captado pelos tecidos via receptores de transferrina (Tfr) das membranas celulares (GANZ e NEMETH, 2006; GRAHAM *et al.*, 2007).

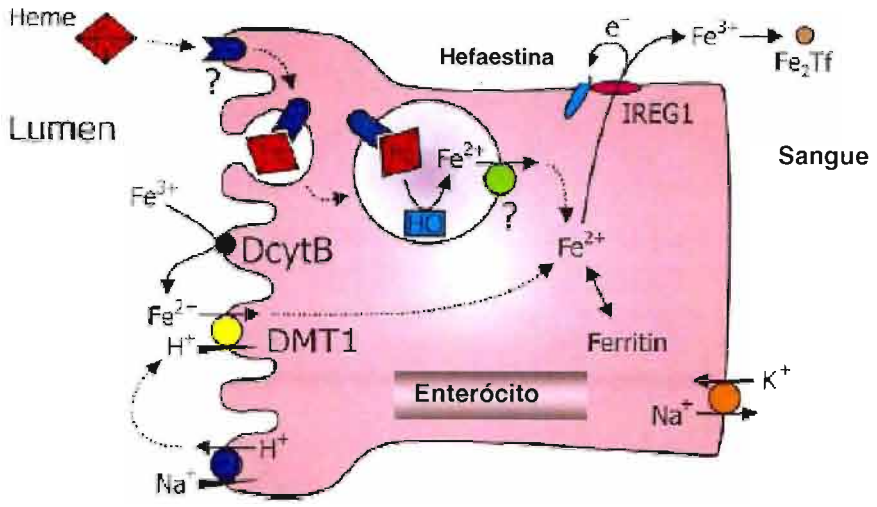


Figura 1. Captação intestinal de Fe. Fe não-heme da dieta inclui Fe^{2+} e Fe^{3+}, que é reduzido a Fe^{2+} pela ferriredutase Dcytb. O microclima ácido do lúmen intestinal gera um potencial eletroquímico que dirige a absorção de Fe^{2+} via DMT1. O Fe heme pode ser captado por endocitose, mas as proteínas envolvidas ainda não foram relatadas. O efluxo de Fe para a corrente sangüínea é mediado via ferroportina (IREG1) em associação com a hefaestina (MACKENZIE e GARRICK, 2005).

Entretanto, a descoberta recente mais importante para o entendimento dos mecanismos que regulam a absorção intestinal de Fe é a hepcidina. Esta molécula foi inicialmente descoberta como um peptídeo antimicrobiano presente no sangue humano (KRAUSE *et al.*, 2000) e em amostras de urina (PARK *et al.*, 2001). O gene que codifica a hepcidina é fortemente expresso no fígado, mas também pode ser detectado no coração, medula espinhal, estômago, intestino e pulmões (KRAUSE *et al.*, 2000; PIGEON *et al.*, 2001).

O envolvimento da hepcidina no metabolismo do Fe foi sugerido pela observação de que a sua síntese é induzida pelo Fe da dieta (PIGEON *et al.*, 2001). Um dos mecanismos propostos para a ação da hepcidina sugere que, quando os estoques de Fe corporal estão altos ou adequados, o fígado produz hepcidina que circula até o intestino delgado onde se liga diretamente à ferroportina na membrana basolateral do enterócito, causando a sua internalização e degradação e, conseqüentemente, bloqueando o efluxo de Fe para a corrente sangüínea. Ao contrário, quando os estoques estão baixos, a produção de hepcidina é suprimida e as moléculas de ferroportina ligam-se à membrana basolateral do enterócito, permitindo a saída de Fe para a corrente sangüínea (GANZ e NEMETH, 2006) (Figura 2).

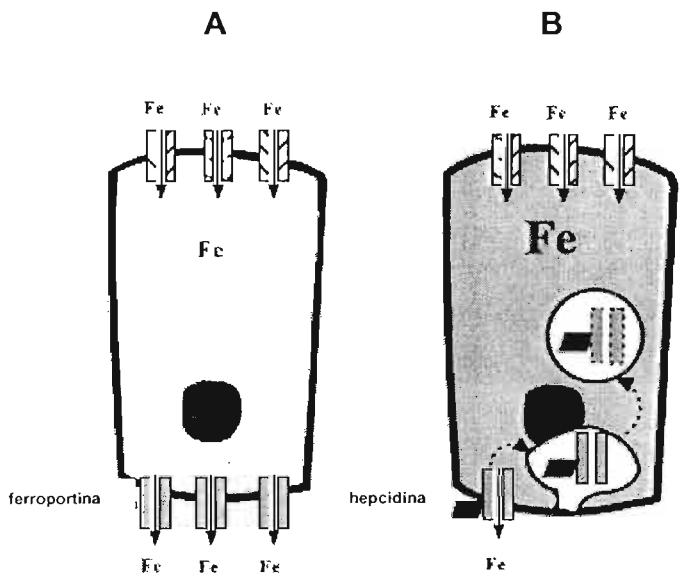


Figura 2. A hepcidina regula a expressão da ferroportina na membrana basolateral do enterócito. **A:** Deficiência de Fe, com expressão de hepcidina suprimida e ferroportina fortemente expressa. A absorção de Fe é máxima; **B:** Excesso de Fe. O fígado secreta hepcidina, que interage com a molécula de ferroportina na membrana basolateral do enterócito, causando a sua internalização e degradação. Há diminuição da saída de Fe do enterócito (GANZ e NEMETH, 2006).

Por outro lado, ao bloquear a saída de Fe da célula intestinal, causando aumento dos níveis intracelulares de Fe, a hepcidina pode influenciar indiretamente o nível de DMT1 na superfície apical do enterócito, levando à diminuição da sua expressão, via inibição do complexo IRP/IRE (proteínas reguladoras do Fe e elementos responsivos ao Fe, respectivamente). Em acréscimo, a hepcidina também controla a liberação de Fe pelos hepatócitos e a reciclagem de Fe nos macrófagos (GANZ e NEMETH, 2006).

Desta forma, a absorção de Fe é um processo adaptativo complexo, o qual é regulado pela exposição das células intestinais a sinais que refletem o estado nutricional em Fe do organismo.

2.2 Sobrecarga de ferro

Dentre as mais comuns doenças humanas estão aquelas relacionadas ao metabolismo do Fe (ANDREWS, 1999). Estas incluem tanto a deficiência como a sobrecarga do mineral. Como não há um mecanismo fisiológico para a excreção do Fe, a deficiência ocorre se a ingestão dietética for inferior às

necessidades corporais. Ao contrário, a sobrecarga pode ocorrer se houver excesso no consumo do mineral que, em grande parte, fica estocado em proteínas específicas (LYNCH, 1995).

Mulheres e homens adultos têm estoque de Fe corporal em torno de 2 e 4g, respectivamente, basicamente ligados à transferrina (ANDREWS, 1999; ANDREWS, 2000; KNUTSON e WESSLING-RESNICK, 2003). Entretanto, em distúrbios inerentes ao metabolismo do Fe, essa quantidade pode ser aumentada em 20 a 30 vezes (LYNCH, 1995). Dentre esses distúrbios encontram-se os geneticamente definidos, como a hemocromatose hereditária (HH) associada ao gene HFE (WHITTINGTON e KOWDLEY, 2002). Este gene está localizado no braço curto do cromossomo 6 (DISTANTE, 2006) e apresenta dois alelos. A maior parte dos pacientes com HH apresenta mutação C282Y (uma substituição do aminoácido cisteína pelo aminoácido tirosina na posição 282 da pré-proteína HFE) e uma parcela menor apresenta mutação H63D (substituição do ácido aspártico pela histidina) em um ou em ambos os alelos do gene HFE, sendo caracterizados como homo ou heterozigotos para C282Y e H63D (THE UK HAEMOCHROMATOSIS CONSORTIUM, 1997; HEATH e FAIRWEATHER-TAIT, 2003). Entretanto, nem todos os pacientes com hemocromatose familiar têm mutação no gene HFE. Um subgrupo de pacientes com hemocromatose não-HFE é caracterizado por predisposição genética à severa sobrecarga de Fe nas primeiras três décadas de vida. Esta desordem é classificada como hemocromatose juvenil.

Além disso, a sobrecarga de Fe pode ocorrer em função de eritropoiese ineficaz ou de terapia de transfusão de sangue, tal como ocorre nas talassemias, na anemia sideroblástica e no transplante da medula óssea (KUSHNEr *et al.,* 2001; ENG *et al.,* 2005). Pacientes com cirrose ou em estágios avançados de doenças hepáticas, especialmente no alcoolismo ou nas hepatites crônicas, podem manifestar sobrecarga de Fe hepática em níveis equivalentes ao da HH (DEUGNIER *et al.*, 1997; COTLER *et al.,* 1998). O grau com que estes distúrbios afetam o organismo depende tanto da sua natureza quanto da extensão do dano ao tecido provocado pelo Fe (LYNCH, 1995).

Em indivíduos normais, a reserva de Fe corporal é distribuída em proporções quase semelhantes entre o fígado, a medula óssea, o baço e o

músculo esquelético. No fígado, o Fe é estocado tanto nos hepatócitos como nas células de Kupffer (macrófagos do fígado), enquanto que na medula óssea, no baço e nos músculos o Fe encontra-se no SRE (LYNCH, 1995). Entretanto, na sobrecarga de Fe, este mineral pode acumular-se em todos os tecidos e órgãos na forma não ligada, podendo causar danos irreversíveis aos mesmos. Assim, apesar de poucos trabalhos na área, a preocupação com a excessiva ingestão de Fe por indivíduos saudáveis começa a ser delineada.

A IDR (Ingestão Dietética de Referência) define o Nível Superior de Ingestão Tolerável (UL) para um nutriente como o maior nível diário que esse pode ser ingerido, com pouco risco de causar efeitos adversos à saúde, para quase todos os indivíduos da população em geral (INSTITUTE OF MEDICINE, 2000). Segundo este órgão, o termo tolerável foi escolhido em função de conotar um nível de ingestão que, com elevada probabilidade, pode ser biologicamente tolerado pelos indivíduos. Todavia, o UL não indica que possa haver ingestão dos nutrientes acima da RDA (Recomendação Dietética) ou da AI (Ingestão Adequada). Para o Fe o UL está entre 40 e 45mg (Tabela 1).

Nesse contexto, os efeitos fisiológicos do aumento da ingestão de Fe por indivíduos normais que consumam alimentos fortificados e/ou que estejam fazendo uso de suplementos orais do mineral devem ser considerados. Sabe-se que, em ratos, a moderada sobrecarga de Fe induz ao aumento da peroxidação lipídica das membranas biológicas, principalmente em animais inicialmente deficientes (KNUTSON *et al.*, 2000), e ao aumento do foco de criptas aberrantes no cólon (ZUNQUIN *et al.*, 2006).

Em humanos não-HH, os efeitos fisiológicos do excesso de Fe corporal passaram a receber considerável atenção dos pesquisadores entre o final da década de 1980 e durante a década de 1990 (SELBY e FRIEDMAN, 1988; STEVENS *et al.*, 1988; TAKKUNEN *et al.*, 1989; STEVENS *et al.*, 1994; KNET *et al.*, 1994). Dentre esses, destacamos o trabalho de Knekt e colaboradores (1994). Em um estudo de coorte com duração de 14 anos, com pacientes da Finlândia inicialmente livres de câncer, os autores encontraram elevado risco de câncer de pulmão e de câncer colorretal em indivíduos com índice de saturação de transferrina (IST) acima de 60%. Os riscos relativos, ajustados para idade, sexo e hábito de fumar foram de 3,04 e de 1,51 para câncer

colorretal e câncer de pulmão, respectivamente, quando comparados a indivíduos com níveis menores de IST. Nesse trabalho, os autores concluíram que o elevado estoque de Fe corporal foi um fator promotor do câncer, mas que seriam necessários mais trabalhos para avaliar o impacto dos estoques de Fe na saúde pública.

Tabela 1. Recomendações nutricionais para a ingestão de Fe (INSTITUTE OF MEDICINE, 2000).

	Idade (anos)	EAR[1]	RDA[2]	UL[3]
Ferro (mg/dia)	0-12 meses			40,0
	1-3	3,0	7,0	40,0
	4-8	4,1	10,0	40,0
Mulheres	9-13	5,7	8,0	40,0
	14-18	7,9	15,0	45,0
	19-50	8,1	18,0	45,0
	51>70	5,0	8,0	45,0
	Gestantes			
	14-18	23,0	27,0	45,0
	19-50	22,0	27,0	45,0
	Lactantes			
	14-18	7,0	10,0	45,0
	19-50	6,5	9,0	45,0
Homens	9-13	5,9	8,0	40,0
	14-18	7,7	11,0	45,0
	19>70	6,0	8,0	45,0

[1] EAR (Necessidade Média Estimada): nível médio diário estimado de ingestão de nutrientes para alcançar as necessidades nutricionais de metade dos indivíduos saudáveis em um particular estágio de vida e faixa etária.
[2] RDA (Recomendação Dietética): nível médio diário da ingestão de nutrientes suficiente para alcançar as necessidades nutricionais de 97 a 98% dos indivíduos saudáveis em um particular estágio de vida e faixa etária.
[3] UL (Nível Superior de Ingestão Tolerável).

Segundo a *American Dietetic Association* (ADA REPORTS, 2001), homens adultos e mulheres na pós-menopausa têm de adequados a elevados estoques de Fe corporal, de forma que a fortificação de alimentos com Fe pode aumentar o risco de ingestão excessiva do mineral por esse grupo. Neste contexto, estudos de coorte conduzidos por Milmam e colaboradores (2000), em 1.319 mulheres dinamarquesas de 40 a 70 anos de idade, demonstraram que, após 7 anos de encerramento do programa de fortificação de alimentos

com Fe, havia prevalência de sobrecarga de Fe (ferritina > 300µg/l) em 1,32% das mulheres no estágio de vida de 40 anos. No estágio de vida de 60 e 70 anos, a prevalência foi maior, sendo de 5,14% e 7,03%, respectivamente. Entretanto, segundo Heath e Fairweather-Tait (2003), ainda não se sabe se o moderadamente elevado estado nutricional em Fe, tal como aquele que pode ser alcançado pela ingestão dietética, representa risco à saúde.

2.3 Sobrecarga de Fe e estresse oxidativo

Metais de transição, tais como o Fe, estão totalmente envolvidos em muitas reações bioquímicas de oxi-redução, essenciais para o desenvolvimento da vida. Porém, as mesmas propriedades químicas que permitem que esse mineral atue como um eficiente cofator, também o habilitam a mediar oxidação deletéria de biomoléculas se estiver em excesso no organismo (WELCH *et al.*, 2002). A participação do Fe nesses processos ocorre devido à reversibilidade nos seus estados de valência (FAIRWEATHER-TAIT, 1995), sendo um importante fator na geração de espécies reativas derivadas do O_2 (ERO). Tais espécies compreendem o radical superóxido (O_2^-), o radical hidroperoxila (HO_2^-), o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete ($^1O_2$). O papel desempenhado pelo Fe na formação dessas espécies pode ser visualizado pelas reações de Fenton e de Haber-Weiss catalisada por Fe (FERREIRA e MATSUBARA, 1997) (Esquema 1).

Esquema 1. Reações de Fenton e de Haber-Weiss na formação das ERO.

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightleftharpoons Fe^{3+} + O_2^{-\bullet}$$
$$2O_2^- + 2H^+ \rightleftharpoons O2 + H_2O_2$$
$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightleftharpoons Fe^{3+} + {}^{\bullet}OH + OH^-$$

(Reação de Fenton)

$$Fe^{3+} + O_2^{-\bullet} \rightleftharpoons Fe^{2+} + O_2$$
$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightleftharpoons Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet}$$
$$O_2^{-\bullet} + H_2O_2 \rightleftharpoons O_2 + OH^- + OH^-$$

(Reação de Haber-Weiss catalisada por Fe)

Em humanos, a atividade biológica normal e fatores do meio ambiente levam, todos os dias, à formação de grande quantidade de radicais altamente reativos (HALLIWELL, 1994), conseqüência direta tanto do metabolismo de O_2 como da exposição da célula a xenobióticos que provocam a redução incompleta de O_2 (FERREIRA e MATSUBARA, 1991). Entretanto, se, por um lado, baixos níveis de ERO sejam indispensáveis a grande número de processos biológicos, tais como proliferação ou apoptose, imunidade e defesa contra microorganismos (MATÉS e SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 1999), por outro, na presença de cátions divalentes, como o Fe (NELSON, 1992), altas doses ou remoção inadequada dessas espécies podem resultar em estresse oxidativo. Este pode causar várias disfunções metabólicas e danos irreversíveis a vários tecidos e órgãos (LLEDIAS *et al.,* 1998). Todavia, o desenvolvido sistema de defesa antioxidante do organismo, tanto enzimático, que inclui a ação das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa (GSH) e glutationa peroxidase (GSH-Px), quanto não enzimático, tais como α-tocoferol (vitamina E), β-caroteno, vitamina A e ácido ascórbico (vitamina C), pode protegê-lo dos danos oxidativo causados por esses radicais (BERNOTTI *et al.*, 2003). Há uma inter-relação entre a atividade e os níveis intracelulares desses sistemas protegendo a si próprios da destruição pelas ERO. Assim, a SOD age destruindo o radical superóxido, convertendo-o à espécie menos reativa peróxido (**H_2O_2**). Esse, reage com CAT ou com GSH-Px para formar água e oxigênio molecular (**O_2**). Nesse processo, a glutationa (GSH) é convertida à sua forma dissulfeto, glutationa oxidada (GSSH) (MATÉS *et al.,* 1999). (Esquema 2).

Esquema 2. Destruição das ERO pela SOD, CAT e GPx.

$$O_2^{-\bullet} + O_2^{-\bullet} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

$$2\,H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2\,H_2O + O_2$$

$$GSH \xrightarrow{GPX} GSSH$$

Em humanos há três formas de SOD: Cu/Zn-SOD citossólica, Mn-SOD mitocondrial e SOD extracelular, as quais parecem atuar de forma diferente. Mn-SOD foi encontrada em altos níveis em tumores enquanto, neste local, a concentração de Cu/Zn-SOD não foi diferente dos níveis encontrados em tecidos normais (WESTMAN e MARKLUND, 1981). Por outro lado, acredita-se que a Cu/Zn-SOD, ao catalisar a desmutação do radical O_2^- a H_2O_2 e O_2, seja o antioxidante de primeira linha na defesa do organismo contra esses radicais (MATÉS e SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 1999). Bezerros alimentados com leite suplementado com 25 µg/g de Cu e 100 µg/g Zn demonstraram maior resposta imune e maior atividade da Cu/Zn-SOD (PRASAD e KUNDU, 1995). A SOD extracelular, por sua vez, é uma das maiores enzimas antioxidantes contra a ação dos radicais O_2^- nos vasos sangüíneos, sendo sua atividade regulada por vários estímulos, tais como óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias (KIM *et al.*, 2007).

A catalase, que contém quatro grupos ferriprotoporfirina por molécula, é uma enzima altamente eficiente e desempenha papel importante na resposta adaptativa da célula ao estresse oxidativo ao capturar o H_2O_2 antes dessa espécie ser capaz de sair da célula (LLEDIAS *et al.*, 1998; MATÉS e SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 1999).

A glutationa peroxidase, uma peroxidase contendo selênio, catalisa a redução de uma variedade de hidroperóxidos (ROOH e H_2O_2), usando GSH, protegendo as células contra danos oxidativos (MATÉS e SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 1999).

Entretanto, em muitas condições, tais como na sobrecarga de Fe, a elevada produção de radicais pode se sobrepor aos sistemas de defesa antioxidante, ocasionando o estresse oxidativo, o qual é definido como o desequilíbrio entre as espécies pró e antioxidantes (BERNOTTI *et al.*, 2003). Neste aspecto, Brown e colaboradores (1998) demonstraram que, em ratos alimentados durante 10 semanas com dietas com sobrecarga de Fe (2% p/p de Fe reduzido), houve expressiva diminuição na atividade das enzimas GSH, CU/Zn-SOD e Mn-SOD. Esta alteração oxidativa pode levar à perda de funcionalidade das membranas biológicas e falha múltipla nos órgãos (MATÉS *et al.*, 1999).

Em humanos com HH e em animais de experimentação recebendo dietas com sobrecarga de Fe, vários trabalhos relacionam o estresse oxidativo gerado pelo excesso desse mineral a alterações nos tecidos hepático e ósseo, além de alterações no perfil das lipoproteínas plasmáticas.

Neste contexto, Brunet e colaboradores (1997) relataram, em ratos que receberam sobrecarga de Fe através de injeção intraperitonial de $FeCl_3$ (duas doses de 15 mg/kg peso corporal), diminuição na concentração plasmática de colesterol, éster de colesterol e de lipoproteína de alta densidade (HDL). Os autores também observaram depleção de éster de colesterol nas lipoproteínas séricas de muito baixa densidade (VLDL), de densidade intermediária (IDL) e de baixa densidade (LDL), além de alterações na distribuição das apolipoproteínas destas lipoproteínas. Assim como no plasma, no fígado também ocorreu diminuição no colesterol total, essencialmente devido à redução no éster de colesterol. Os autores concluíram que a sobrecarga de Fe induziu à peroxidação lipídica, afetou profundamente os lipídeos intra-hepáticos e intravasculares e o metabolismo das lipoproteínas plasmáticas.

Nesta mesma linha, Ceccarelli e colaboradores (1995) demonstraram haver relação direta entre o nível de Fe livre, a indução de peroxidação lipídica e a disfunção mitocondrial em fígado de ratos alimentados com dieta contendo excesso de Fe (2,5% p/p Fe carbonil). Mesmo em dieta com moderada sobrecarga de Fe (450 mgFe/kg dieta), como a utilizada por Wright e colaboradores (1999), também houve aumento da peroxidação lipídica no fígado de ratos após 3 e 10 semanas de tratamento. Mais recentemente, Asare e colaboradores (2006) encontraram efeito direto entre a hepatocarcinogenicidade e o Fe livre, capaz de gerar ERO e danos oxidativos mutagênicos e carcinogênicos.

Além disso, Troadec e colaboradores (2006) demonstraram que a sobrecarga de Fe promove, nesse órgão, ultra-expressão da ciclina D1 (proteína envolvida na fase G1 do ciclo celular), o que poderia contribuir no desenvolvimento de anormalidades no ciclo celular, sugerindo o papel dessa proteína na hepatocarcinogênese relacionada ao Fe.

Em relação aos ossos, o efeito da sobrecarga de Fe sobre o metabolismo e o estresse oxidativo desse tecido tem sido extensivamente documentado (MATSUSHIMA *et al.*, 2003; ISOMURA *et al.*, 2004; NORRDIN *et*

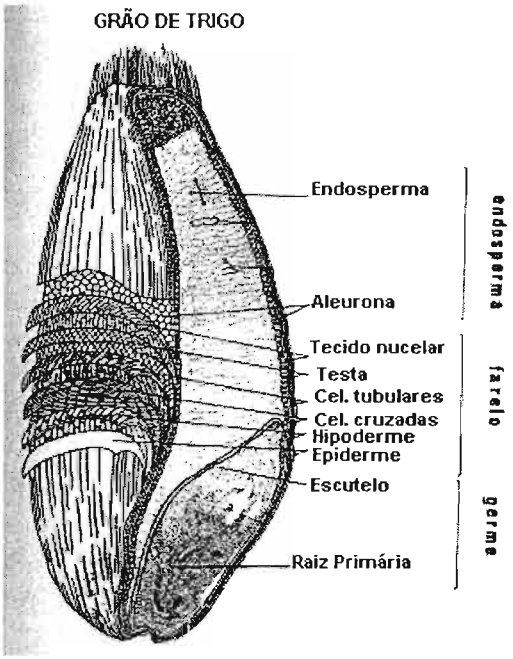
al., 2004; GUGGENBUHL *et al.*, 2005; MANDALUNIS e UBIOS, 2005; ANGELOPOULOS *et al.*, 2006). Dentre os estudos, destacamos o trabalho de Isomura e colaboradores (2004), que demonstraram, em ratas na pós-menopausa e alimentadas com dietas com sobrecarga de Fe (5% p/p de Fe lactato) por 4 semanas, diminuição da osteocalcina (marcador de formação óssea), da GPx e do TGFβ-1 (que aumenta a formação dos osteoclastos, sendo implicado na patogênese da perda óssea). Os autores concluíram que o estresse oxidativo induzido pelo excesso de Fe poderia estar envolvido na patogênese de doenças metabólicas, tais como a osteoporose. Ainda, Angelopoulos e colaboradores (2006) demonstraram que, em um paciente com hemocromatose juvenil HFE2 apresentando osteoporose e aumento na reabsorção óssea, houve aumento na densidade mineral da espinha dorsal, após normalização da ferritina sérica, que foi alcançada por freqüentes flebotomias, demonstrando que o excesso de Fe era o principal fator envolvido nesta patologia.

2.4 Fitato

Fitato, hexafosfato de mio-inositol ou IP_6, é um constituinte de ocorrência natural em todas as sementes e possivelmente de todas as células dos vegetais (HARLAND e MORRIS, 1995), compreendendo de 1 a 3% do peso de grãos integrais, cereais, legumes e sementes oleaginosas (REDDY *et al.,* 1982; GRAF e EATON, 1990). Em seu estado nativo o fitato se complexa tanto com proteínas quanto com cátions mono e divalentes, sendo assim consumido por humanos ou animais (HARLAND e MORRIS, 1995).

Segundo Torre e colaboradores (1991), o ácido fítico é a principal forma de estoque de fósforo nas plantas, localizando-se na camada de aleurona (grânulos de proteína encontrados no endosperma de sementes maduras) de grãos como o arroz e o trigo (Figura 3), no germe do milho ou no endosperma das dicotiledôneas, podendo representar de 60 a 90% do fósforo total da semente (CAMPBELL *et al.*, 2002). Além de armazenar fósforo e cátions, os fitatos fornecem matéria-prima para a formação das paredes celulares das

plantas após a germinação da semente e a protegem contra o dano oxidativo durante o seu armazenamento (LOLAS e MARKAKIS, 1975; ERDMAN, 1979).



Fonte: http://www.pgie.ufrgs.br

Figura 3. Secções de um grão de trigo

A quantidade de fitato presente nos alimentos de origem vegetal é variável e depende de uma série de fatores, tais como: tipo da planta, tipo de adubação e grau de maturação. Em média, estima-se que a ingestão de fitato em dietas vegetarianas e naquelas de habitantes de áreas rurais de países em desenvolvimento, esteja entre 2 e 2,6 g/dia e, em dietas mistas, entre 0,2 e 1,4 g/dia (GREINER e KONIETZNY, 2007).

Por ser altamente carregada com seis grupos fosfato (Figura 4), a molécula de fitato quela e reduz a atividade de minerais, tais como Ca, Zn e Fe, interferindo negativamente na biodisponibilidade dos mesmos (HALLBERG *et al.*,1987; TORRE *et al.*, 1991; LOPEZ *et al.*, 1998). Em função desta propriedade, durante muitas décadas esse composto foi considerado apenas como fator antinutricional (SANDBERG *et al.*, 1999), principalmente em dietas consumidas por populações com elevada prevalência de anemia por deficiência de Fe. Entretanto, Hallberg e colaboradores (1989) demonstraram

que, na presença de ácido ascórbico, essa interferência foi reduzida, possivelmente porque o ácido ascórbico diminuiu o pH do lúmen intestinal o que, por um lado, favoreceu a ação das fitases intestinais e, por outro, levou à redução do Fe^{3+} presente nos alimentos a Fe^{2+}, mais solúvel no pH intestinal e, portanto, mais biodisponível. Esse trabalho já apontava para a importância da avaliação da matriz complexa, que é a dieta, no estudo da biodisponibilidade de minerais.

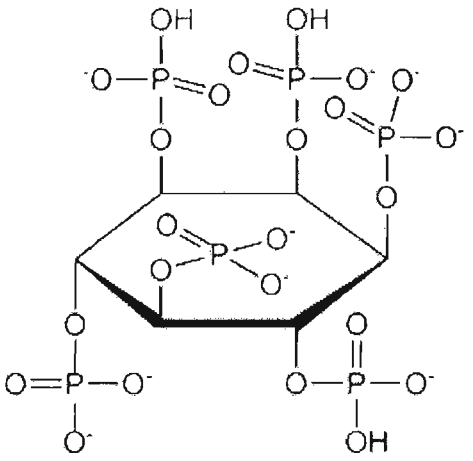


Figura 4. Estrutura molecular do ácido fítico

Por outro lado, a mesma propriedade que faz do ácido fítico um fator antinutricional, também o faz ser considerado um antioxidante natural (JENAB e THOMPSON, 1998). Desta forma, em anos recentes, outra importante abordagem tem sido dada aos efeitos sistêmicos do IP_6. Estudos em ratos têm demonstrado que o seu consumo, quando adicionado na ração ou na água, pode induzir alterações metabólicas nesses animais. Neste contexto, Szkudelski (2005) demonstrou que em ratos cujas dietas foram suplementadas com 0,1; 0,2; 0,3 e 1,0% de ácido fítico, houve redução de ácidos graxos livres no soro (grupos com 0,1 e 0,2%) e triacilgliceróis hepáticos (todos os grupos). O Fe sérico foi reduzido, mas apenas no grupo que recebeu 1% de ácido fítico. O autor sugeriu que os resultados obtidos claramente indicavam que o ácido fítico seria capaz de induzir alterações metabólicas e hormonais nos animais.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

No cólon, Jenab e Thompson (2000) demonstraram que, em ratos tratados com azoximetano, um potente carcinógeno, e que receberam dietas contendo ácido fítico (do farelo de trigo ou adicionado) durante 100 dias, houve aumento da apoptose e da diferenciação celular, com redução do foco de criptas aberrantes. Estão descritos ainda efeitos anticarcinogênicos contra tumores de próstata (SHARMA *et al.*, 2003) e pâncreas (SOMASUNDAR *et al.*, 2005) e efeitos quimiopreventivos contra dano oxidativo no DNA (MIDORIKAWA *et al.*, 2001), sendo os três últimos avaliados por método *in vitro* em linhagens celulares.

Segundo Vucenik e Shamsuddin (2006), quase todas as células animais contêm IP_6 e formas menos fosforiladas deste composto com poucos grupos fosfato (IP_{1-5}), sendo a ação anticarcinogênica mediada por essas formas, especialmente IP_3 e IP_4. Trabalho conduzido por Sakamoto e colaboradores (1993) com IP_6 marcado radioativamente demonstrou que, quando administrado oralmente a ratos, esse composto foi absorvido pelo trato gastrintestinal (estômago e intestino delgado) e distribuído a vários órgãos dos animais apenas 1h após a administração. Enquanto neste período de tempo a radioatividade isolada do epitélio gástrico foi associada com as formas IP_{1-6}, a radioatividade no plasma e na urina foi associada com a forma IP_1. Estes dados indicaram que a molécula intacta foi transportada através das células epiteliais gástricas, onde foi rapidamente desfosforilada, e que a metabolização do IP_6 foi muito rápida. Ainda, quando IP_6 marcado foi administrado, por gavagem, a ratos com tumores de mama, grande quantidade de radioatividade foi encontrada no tecido tumoral apenas 1h após a administração, explicando em parte a atividade antineoplásica do IP_6 em sítios distantes do trato gastrintestinal. Segundo os mesmos autores (1994), as células tumorais captam o IP_6 por pinocitose e/ou endocitose mediada por receptores. Dentre os mecanismos propostos para a atividade anticarcinogênica do IP_6 estão a sua capacidade de quelar Fe^{3+}, a supressão da formação de radicais $OH^{\bullet}$ e a inibição da enzima xantina oxidase, prevenindo a iniciação da peroxidação lipídica (GRAF e EATON, 1990; MURAOKA e MIURA, 2004). Ainda, trabalhos *in vitro* com linhagens de células cancerosas humanas demonstraram que este composto induz a inibição da fase G1 do ciclo celular e a significativa

diminuição da fase S, através da modulação de ciclinas e de quinases dependentes de ciclinas, além de diminuição na fosforilação da proteína retinoblastoma, compostos envolvidos na proliferação celular (EL-SHERBINY *et al.*, 2001; SINGH *et al.*, 2003).

Segundo Grases e colaboradores (2005), grande parte do IP_6 extracelular encontrado em órgãos, tecidos e fluidos biológicos é derivada da dieta e não uma conseqüência da síntese endógena. Nesse sentido, a depleção de IP_6 extracelular ocorre em elevada proporção quando uma dieta pobre nesse componente é consumida, o que pode afetar os benefícios à saúde proporcionados pelo mesmo.

Desta forma, em função das propriedades acima citadas e por sua abundância na dieta humana, a utilização de dietas ricas em fitato pode ser uma importante estratégia no combate às alterações fisiológicas produzidas pela sobrecarga de Fe.

2.5 Frutanos

Frutanos são carboidratos de reserva constituídos por uma ou mais unidades de frutose ligadas (GFn) ou não (Fn) a uma molécula terminal de sacarose. Podem apresentar uma estrutura linear ou ramificada com moléculas unidas por ligações do tipo $\beta(2\rightarrow1)$ (Figura 5).

Atualmente, esses compostos vêm sendo estudados e comercializados no Japão, nos EUA e na Europa como produtos para a indústria de alimentos, com teor calórico reduzido (LOBO e LEMOS SILVA, 2003). Estima-se que o consumo diário nos EUA esteja em torno de 1 a 4 g, chegando a 11 g/dia na Europa (VAN LOO *et al.*, 1995). Os frutanos são encontrados em quase todas as espécies da família Asteraceae, muitas das quais apresentando importância econômica, como o almeirão (*Chicorium intybus*), o tupinambo (*Helianthus tuberosus*) e o yacon (*Smallanthus sonchifolius*). O yacon é originário da região dos Andes e foi introduzido no Brasil no início da década de 1990.

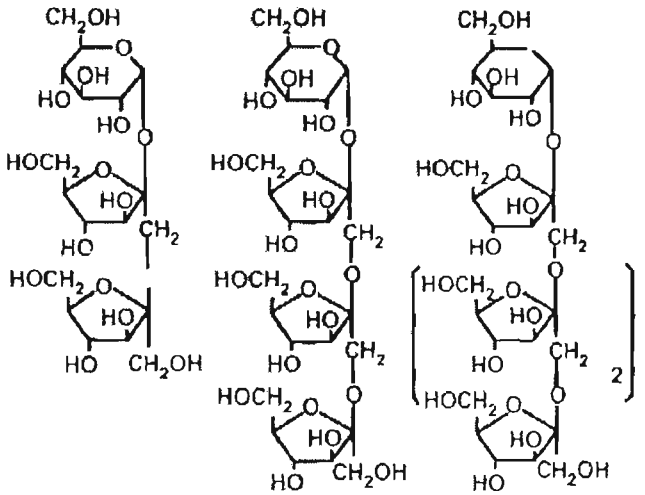


Figura 5. Representação da estrutura química geral dos frutanos
Extraído de Ohta *et al.*(1996)

Nos últimos anos, estudos têm ressaltado a importância do consumo de frutanos que, por serem resistentes à digestão no intestino delgado, são metabolizados pela microbiota residente no intestino grosso. Este processo resulta na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), os quais desempenham importante função na manutenção da integridade da mucosa intestinal, bem como na biodisponibilidade de minerais, no metabolismo de carboidratos e lipídeos e na função imunológica. A produção de AGCC leva a diminuição do pH, que aumenta a concentração de minerais ionizados e favorece a diminuição na solubilidade de componentes tóxicos para a mucosa intestinal (CAMPBELL *et al.*, 1997). Além disso, o aumento da fermentação no ceco também parece promover uma mais efetiva hidrólise do fitato, inibindo os efeitos negativos desse composto na absorção mineral (LOPEZ *et al.*, 2000).

Neste contexto, estudos adicionais demonstram a característica prebiótica dos frutanos de modular seletivamente a atividade e o crescimento de bactérias bifidogênicas que, por sua vez, podem reduzir a colonização de patógenos intestinais, pela produção de ácidos orgânicos ou pela competição por nutrientes ou sítios de adesão (GIBSON e ROBERFROID, 1995; CAMPBELL *et al.*, 1997). No entanto, embora esse efeito esteja bem documentado na literatura, ainda existem controvérsias, uma vez que uma intensa acidificação do lúmen intestinal poderia afetar a barreira de proteção da mucosa e aumentar a permeabilidade intestinal e o risco de translocação bacteriana (TEN BRUGGENCATE *et al.*, 2004). Assim, frutanos podem

modular o sistema imune sistêmico e local pela modificação da composição da microbiota intestinal. Além disso, estes carboidratos podem influenciar indiretamente no metabolismo hepático de lipídeos (DELZENNE *et al.*, 2002) e exercer hepatoproteção em modelo de dano induzido por lipopolissacarídeo de origem bacteriana (NEYRINCK *et al.*, 2004).

Estudos adicionais em ratos demonstraram que a absorção de Ca, estimulada por frutanos, pode ocorrer em resposta a aumento na expressão da calbindina na mucosa colônica, em um mecanismo independente da regulação pela $1,25(OH)_2D_3$ (OHTA *et al.*, 1998), levantando a hipótese, neste caso, da possível influência destes carboidratos na absorção transcelular de Fe.

Além disso, como conseqüência da influência dos frutanos na absorção intestinal de minerais, os estudos passaram a avaliar a extensão dos seus efeitos na mineralização óssea por análises densitométricas e histomorfométricas, demonstrando a contribuição dos frutanos na prevenção dos sintomas relacionados à osteoporose (HIRAMA *et al.*, 2003; LOBO, 2007).

Com base nestes estudos, sugere-se que a ingestão de frutanos possa ter importante implicação para a saúde óssea e a prevenção do desenvolvimento de osteoporose. Entretanto, são necessários estudos sobre os efeitos dos frutanos no metabolismo hepático e ósseo na presença de sobrecarga de Fe na dieta. Cabe ressaltar ainda que, até o momento, esses estudos foram realizados utilizando-se fontes purificadas de frutanos. No presente trabalho, utilizamos a farinha de yacon. Trabalho conduzido por Lobo e colaboradores (2007) demonstrou que, em ratos, a utilização de ração suplementada com farinha de yacon, rica fonte de FOS, influenciou positivamente a morfometria da mucosa cecal, a retenção mineral óssea e as propriedades mecânicas dos ossos (carga máxima e elasticidade).

Desta forma, a hipótese do presente estudo é que, oferecidos em uma mesma dieta, frutanos e IP_6 possam contrabalancear os efeitos deletérios causados ao organismo pela sobrecarga de Fe. Assim, para avaliar tais efeitos no organismo vivo e tomando o rato como modelo, selecionamos o fígado e os ossos para serem avaliados. Além desses, também foram avaliados os parâmetros bioquímicos relacionados ao Fe, ao perfil das lipoproteínas plasmáticas e à lesão dos tecidos.

3. REFERÊNCIAS

ADA REPORTS. POSITION OF THE AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION: FOOD FORTIFICATION AND DIETARY SUPPLEMENTS. *J. AM. DIET. ASSOC.*, V.101, P.115-125, 2001.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. Legislação específica por área de assunto. Regulamentos técnicos por assunto: F. *Farinha de trigo e/ou milho fortificados com ferro. Resolução RDC n.344*, de 13 de Dezembro de 2002. Disponível em: http://e-legis.bvacas.br/leisref/public/showAct.php?id=1679. Acesso em 22 Out 2007.

ANDREWS, N.C. Disorders of iron metabolism. *N. Engl. J. Med.,* v. 341, p. 1986-1995, 1999.

ANDREWS, N.C. Iron Metabolism: Iron deficiency and iron overload. *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.*, v.01, p.75-98, 2000.

ANGELOPOULOS, N.G.; GOULA, A.K.; PAPANIKOLAOU, G.; TOLIS, G. Osteoporosis in HFE2 juvenile hemochromatosis. A case report and review of the literature. *Osteop. Int.*, v.17, p.150-155, 2006.

BERNOTTI, S.; SEIDMAN, E.; SINNETT, D.; BRUNET, S.; DIONNE, S.; DELVIN, E.; LEVY, E. Inflammatory reaction without endogenous antioxidant response in CaCo-2 cells exposed to iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. *Am .J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, v.285, p.G898-G906, 2003.

BOHN, L.; MEYER, A.S.; RASMUSSEN, S.K. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *J. Zhejiang Univ. Sci.B*, v.9(3), p.165-191, 2008.

BROWN, K.E.; KINTER, M.T.; OBERLEY, T.R.; FREEMAN, M.L.; FRIERSON, H.F.; RIDNOUR, L.A.; TAO, Y.; OBERLEY, L.W.; SPITZ, D.R. Enhanced γ-glutamyl transpeptidase expression and selective loss of CuZn superoxide dismutase in hepatic iron overload. *Free Rad. Biol. Med.*, v.24(4), p.545-555, 1998.

BRUNET, S.; GUERTIN, F.; THIBAULT, L.; GAVINO, V.; DELVIN, E.; LEVY, E. Iron salicylate complex induces peroxidation, alters hepatic lipid profile and affects plasma lipoprotein composition. *Atherosclerosis*, v.129, p.159-168, 1997.

CAMPBELL, J. M.; FAHEY Jr., G. C.; WOLF, B. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *J. Nutr.*, v. 127, p. 130-136, 1997.

CAMPBELL, M.; DUNN, R.; DITTERLINE, R.; PICKETT, S.; RABOY, V. Phytic acid represents 10 to 15% of total phosphorus in alfafa root and crown. *J. Plant Nutr.*, v.14(9), p.26-27, 2002. In: MARTINS, N.G.S. Os fosfatos na cana-de-açúcar. Dissertação de Mestrado. ESALQ, Piracicaba, 2004.

CECCARELLI, D.; GALLESI, D.; GIOVANNINI, F.; FERRALI, M.; MASINI, A. Relationship between free iron level and rat liver mitochondrial dysfunction in experimental dietary iron overload. *Bioch. Bioph. Res. Communic.*, v.209(1), p.53-59, 1995.

CHEN, H.; SU, T.; ATTHIEH, Z.K.; FOX, T.C.; MCKIE, A.T.; ANDERSON, G.J.; VULPE, C.D. Systemic regulation of hephaestin and Ireg 1 revealed in studies of genetic and nutritional iron deficiency. *Blood*, v.102, p.1893-1899, 2003.

CONRAD, M.E.; UMBREIT, J.N.; MOORE, E.G. Iron absorption and transport. *Am. J. Med. Sci.,* v.318, p. 213-229, 1999.

COTLER, S.J.; BRONNER, M.P.; PRESS, R.D.; CARLSON, T.H.; PERKINS, J.D.; EMOND, M.J.; KOWDLEY, K.V. End-stage liver disease without hemochromatosis associated with elevated hepatic iron index. *J. Hepatol.*, v.29 (2), p.257-262, 1998.

DELZENNE, N. M.; DAUBIOUL, C.; NEYRINCK, M.; LASA, M.; TAPER, H. S. Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animals: review of biochemical events and future prospects. *Brit. J. Nutr.*, v. 87 (suppl. 2), p. S255-S259, 2002.

DELZENNE, N.M.; CANI, P.D.; NEYRINCK, A.M. Modulation of glucagons like-peptide 1 and energy metabolism by inulin and oligofructose: experimental data. *J. Nutr.*, v.137, p.2547S-2551S, 2007.

DEUGNIER, Y.; TURLIN, B.; LE QUILLEUC, D.; MOIRAND, R.; LOREAL, O.; MESSNER, M.; MEUNIER, B.; BRISSOT, P.; LAUNOIS, B. A Reappraisal of Hepatic Siderosis in Patients With End-Stage Cirrhosis: Practical Implications for the Diagnosis of Hemochromatosis. *Am. J. Surg. Patholog.* v. 21(6), p.669-675, 1997.

DISTANTE, S. Genetic predisposition to iron overload: Prevalence and phenotypic expression of hemochromatosis-associated HFE-C282Y gene mutation. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, v.66, p.83-100, 2006.

EL-SHERBINY, Y.; COX, M.C.; ISMAIL, Z.A.; SHAMSUDDIN, A.M.; VUCENIK, I. G_0/G_1 arrest and S phase inhibition of human cancer cell lines by inositol hexaphosphate (IP_6). *Anticancer Res.*, v.21, p.2393-2404, 2001.

ENG, S.C.; TAYLOR, S.L.; REYES, V.; RAAKA, S.; BERGER, J.; KOWDLEY, K.V. Hepatic iron overload in alcoholic end-stage liver disease is associated with iron deposition in other organs in the absence of HFE-1 hemochromatosis. *Liver Internat.*, v.25, p.513-517, 2005.

ERDMAN, J.W. Oilseed phytates nutritional implications. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 56(7), p.736-741, 1979.

FAIRWEATHER-TAIT, S. Iron Biochemistry. In: Iron Nutritional and physiological significance. The report of the British Nutrition Foundation's Task Force. London: Chapman e Hall, 1995.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Med. Bras.* v.43 (1), p.61-68, 1997.

FRAZER, D.M.; ANDERSON, G.J. Iron imports I. Intestinal iron absorption and its regulation. *Am.J.Physiol.Gastrontest.Liver Physiol.*, v. 289, p.G631-G635, 2005.

GANZ, T.; NEMETH, E. Iron imports.IV.Hepcidin and regulation of body iron metabolism. *Am.J.Physiol.Gastrontest.Liver Physiol.*, v. 290, p.G199-G203, 2006.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota – introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*, Philadelphia, v. 125, p. 1401-1412, 1995.

GRAF, E.; EATON, J.W. Antioxidant functions of phytic acid. *Free Rad. Biol. Med.*, v.8, p.61-69, 1990.

GRAHAM, R.M.; CHUA, A.C.G.; HERBISON, C.E.; OLYNK, J.K.; TRINDER, D. Liver iron transport. *World J. Gastroenterol.*, v.13, n.35, p.4725-4736, 2007.

GREINER, R.; KONIETZNY, U. Functional properties of phytate. *Nutrire*, v. 32(2), p.75-89, 2007.

GRASES, F.; COSTA-BAUZA, A.; PRIETO, R.M. Intracellular and extracellular myo-inositol hexakisphosphate (InsP6), from rats to humans. *Anticancer Res.*, v.25, n.3c, p.2593-2597, 2005.

GUGGENBUHL, P.; DEUGNIER, Y.; BOISDET, J.F.; ROLLAND, Y.; PERDRIGUER, A.; PAWLOTSKY, Y.; CHALÉS, G. Bone mineral density in men with genetic hemochromatosis and HFE gene mutation. *Osteoporosis Int.*, v.16, p.1809-1814, 2005.

HALLBERG, L.; ROSSANDER, L.; SKANBERG, L. Phytates and inhibitory effects of bran on iron absorption in man. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.45, p.988-996, 1987.

HALLBERG, L.; BRUNE, M.; ROSSANDER, L. Iron absorption in man: ascorbic-acid and dose-dependent inhibition by phytate. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.49, p.140-144, 1989.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev.*, v.52, p.253-265, 1994.

HARLAND, B.F.; MORRIS, E.R. Phytate: A good or a bad food component? *Nutr. Res.*, v.15(5), p.733-754, 1995.

HEATH, A.L.M.; FAIRWEATHER-TAIT, S.J. Health implication of iron overload: The role of diet and genotype. *Nutr. Rev.*, v.61(2), p.45-62, 2003.

HIRAMA, Y.; MOROHASHI, T.; SANO, T.; MAKI, K.; OHTA, A.; SAKAI, N.; YAMADA, SASA, R. Fructooligosaccharides prevent disorders of the femoral neck following gastrectomy in growing rats. *J. Bone Miner. Res.*, v. 21, p. 294-298, 2003.

HUNT, J.R. Bioavailability of iron, zinc, and other trace minerals from vegetarian diets.*Am. J. Clin. Nutr.*, v.78(Suppl.), p.633S-639S, 2003.

INSTITUTE OF MEDICINE.Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc (2000), 2000. 800p. Disponível em http://www.nap.edu/openbook/0309071836/html. Acesso em 06 Out 2007.

ISOMURA, H.; FUJIE, K.; SHIBATA, K.; INOUE, N.; IIZUKA, T.; TAKEBE, G.; TAKAHASHI, K.; NISHIHIRA, J.; IZUMI, H.; SAKAMOTO, W. Bone metabolism and oxidative stress in postmenopausal rats with iron overload. *Toxicology*, v. 197, p.93-100, 2004.

JENAB, M.; THOMPSON, L.U. Phytic acid in wheat bran affects colon morphology cell differentiation and apoptosis. *Carcinogenesis*, v.21(8), p.1547-1552, 2000.

KIM, H.W.; LIN, A.; GULDBERG, R.E.; USHIO-FUKAI, M.; FUKAI, T. Essential role of extracellular SOD in reparative neovascularization induced by hindlimb ischemia. *Circ. Res.*, v.101, p.409-419, 2007.

KNEKT, P.; REUNANEN, A.; TAKKUNEN, H.; AROMAA, A.; HELIÖVAARA, M.; HAKULINEN, T. Body iron stores and risk of cancer. *Int. J. Cancer*, v.56, p.379-382, 1994.

KNUTSON, M.; WESSLING-RESNICK, M. Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Crit. Rev. Bioch. Mol. Biol.*, v. 38, n.1, p.61-88, 2003.

KRAUSE, A.; NEITZ, S.; MAGERT, H.J.; SCHULZ, A.; FORSSMANN, W.G.; SCHULZ-KNAPPE, P.; ADERMANN, K. LEAP-1, a novel highly disulfide-bounded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBBS Letter*, v.480, p.147-150, 2000.

KUSHNER, J.P.; PORTER, J.P.; OLIVIERI, N.F. Secondary iron overload. *Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Progr.)*, p.47-61, 2001.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

LLEDIAS, F.; RANGEL, P.; HANSBERG, W. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J. Biol. Chem.*, v. 273 (17), p.10630-10637, 1998.

LIEU, P.T.; HEISKALA, M.; PETERSON, P.A.; YANG, Y. The roles of iron in health and disease. *Mol. Aspects of Med.*, v.22, p.1-87, 2001.

LIND, T.; LÖNNERDAL, B.; PERSSON, L.A.; STENLUND, H.; TENNEFORS, C.; HERNELL, O. Effects of weaning cereals with different phytate contents on hemoglobin, iron stores, and serum zinc: a randomized intervention in infants from 6 to 12 mo of age. *Am. J. Clin. Nutr.*., v.78, p.168-175, 2003.

LOBO, A.R.; LEMOS SILVA, G.M. Aspectos tecnológicos de produtos de panificação e massas alimentícias com teor calórico reduzido. *Bol. Soc. Bras. Cienc. Tecnol. Alim.*, v. 37(1), p.1-8, 2003.

LOBO, A.R.; COLLI, C.; ALVARES, E.P.; FILISETTI, T.M.C.C. Effects of fructans-containing yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp e Endl.) flour on caecum mucosal morphometry, calcium and magnesium balance and bone calcium retention in growing rats. *Brit. J. Nutr.,* v.97, p.766-785, 2007.

LOLAS, G.M.; MARKAKIS, P. Phytic acid and other phosphorus compounds of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.*, v.23(1), p.13-15, 1975.

LOPEZ, H.W.; COUDRAY, C.; BELLANGER, J.; YOUNES, H.; DEMIGNÉ, C.; RÉMÉSY, C.. Intestinal fermentation lessens the inhibitory effects of phytic acid on mineral utilization in rats. *J. Nutr.*, v.128, p.1192-1198, 1998.

LOPEZ, H.W.; COUDRAY, C.; LEVRAT-VERNY, M.A.; FEILET-COUDRAY, C.; DEMIGNÉ, C.; RÉMÉSY, C. Fructooligosaccharides enhance mineral apparent absorption and counteract the deleterius effects of phytic acid on mineral homeostatic in rats. *J. Nutr. Biochem.*, v.11, p.500-508, 2000.

LYNCH, S.R. Iron Overload: Prevalence and impact on health. *Nutr. Rev.*, v.53, p.255-260, 1995.

MACKENZIE B.; GARRICK, M.D. Iron Imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine. *Am.J.Physiol.Gastrontest.Liver Physiol.*, v. 289, p.G981-G986, 2005.

MANDALUNIS, P.M.; UBIOS, A.M. Experimental renal failure and iron overload: A histomorphometric study in rat tibia. *Toxicol. Pathol.*, v. 33, p.398-403, 2005.

MATÉS, J.M.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front. Biosc.*, v.4, p.d339-345, 1999.

MATÉS, J.M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; CASTRO, I.N. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.*, v.32, n.8, p.595-603, 1999.

MATSUSHIMA, S.; TORII, M.; OZAKI, K.; NARAMA, I. Iron lactate-induced osteomalacia in association with osteoblast dynamics. *Toxicol. Pathol.*, v.31, p.646-654, 2003.

McCULLOUGH, J. S.; RATCLIFFE, B.; MANDIR, N.; CARR, K. E.; GOODLAD, R. A. Dietary fibre and intestinal microflora: effects on intestinal morphometry and crypt branching. *Gut*, v. 42, p. 799-806, 1998.

McKIE, A.T.; BARROW, D.; LATUDEN-DADA, G.O.; ROLFS, A.; SAGER, G.; MUDALY, E.; MUDALY, M.; RICHARDSON, C.; BARLOW, D.; BOMDFORD, A.; PETERS, T.J.; RAJA, K.B.; SHIRALI, S.; HEDIGER, M.A.; FARZANEH, F.; SIMPSON, R.J. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science*, v.291, p.1755-1759, 2001.

MIDORIKAWA, K.; MURATA, M.; OIKAWA, S.; HIRAKU, Y.; KAWANISHI, S. Protective effect of phytic acid on oxidative DNA damage with reference to cancer chemoprevention. *Biochem. Byophys. Res. Commun.*, v.288, p.552-557, 2001.

MILMAN, N.; BYG, K.E.; OVESEN, L. Iron status in Danes 1994. II. Prevalence of iron deficiency and iron overload in 1319 Danish women aged 40-70 years. Influence of blood donation, alcohol intake and iron supplementation. *Ann. Hematol.*, v.79, p.612-621, 2000.

MURAOKA, S.; MIURA, T. Inhibition of xantine oxidase by phytic acid and its antioxidative action. *Life Sci.*, v.74, p.1691-1700, 2004.

NELSON, R.L. Dietary iron and colorectal cancer risk. *Free Rad. Biol. Med.*, v.12, p.161-168, 1992.

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

NEYRINCK, A.M.; ALEXIOU, H; DELZENNE, N.M. Kupffer cell activity is involved in the hepatoprotective effect of dietary oligofructose in rats with endotoxic shock. *J. Nutr.*, v.134(5), p.1124-1129, 2004.

NORRDIN, R.; HOOPES, K.J.; O'TOOLE, D. Skeletal changes in hemochromatosis of Salers Catle. *Vet. Pathol.*, v.41, p.612-623, 2004.

OHTA, A.; MOTOHASHI, Y.; OHTSUKI, M.; HIRAYAMA, M.; ADACHI, T.; SAKUMA, K. Dietary fructooligosaccharides change the concentration of calbindin-D9k differently in the mucosa of the small and large intestine of rats. *J. Nutr.*, v. 128, p. 934-39, 1998.

PARK, C.H.; VALORE, E.V.; WARING, A.J.;GANZ,T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J. Biol. Chem.*, v.276, p.7806-7810, 2001.

PIGEON, C.; ILYIN, G.; COURSELAUD, B.; LEROYER, P.; TURLIN, B.; BRISSOT, P.; LOREAL, O. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J. Biol. Chem.*, v.276, p.7811-7819, 2001.

PRASAD, T.; KUNDU, M.S. Serum IgG and IgM responses to sheep red blood cells (SRBC) in weaned calves fed milk supplemented with Zn and Cu. *Nutrition*, v.11, p.712-715, 1995.

REDDY, N.R.; SATHE, S.K.; SALUNKHE, D.K. Phytates in legumes and cereals. *Adv. Food Res.*, v.28 (1), p.1-92, 1982.

ROBERFROID,M.B.; VAN LOO, J.A.E.; GIBSON, G.R. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *J. Nutr.*, v.128, p.11-19, 1998.

SAKAMOTO, K.; VUCENIK, I.; SHAMSUDDIN, A.M. [^{3}H]-Phytic acid (inositol hexaphosphate) is absorbed and distributed to various tissues in rats. *J. Nutr.*, v.123, p.713-720, 1993.

SANDBERG, A.S.; BRUNE, M.; CARLSSON, N.G.; HALLBERG, L.; SKOGLUND, E.; ROSSANDER-HULTHÉN, L. Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.70, p.240-6, 1999

SCHOLZ-AHRENS, K.E.; ADE, P.; MASTEN, B.; WEBER, P.; TIMM, W.; ASIL, T.; GLUER, C.C; SCHREZENMEIR, J. Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone content, and bone structure. *J. Nutr.*, v.137, p.838S-846S, 2007.

SEIFERT, S.; WATZL, B. Inulin and oligofructose: Review of experimental data on immune modulation. *J. Nutr.*, v.137, p.2563S-2567S, 2007.

SELBY, J.V.; FRIEDMAN, G.D. Epidemiologic evidence of an association between body iron stores and risk of cancer. *Int. J. Cancer*, v.41, p.677-682, 1988.

SHARMA, G.; SINGH, R.P.; AGARWAL, R. Growth inhibitory and apoptotic effects of inositol hexaphosphate in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP-C1) cells. *Int. J. Oncol.*, v.23, p.1413-8, 2003.

SINGH, R.P.; AGARWAL, C.; AGARWAL, R. Inositol hexaphosphate inhibits growth, and induces G_1 arrest and apoptotic death of prostate carcinoma DU145: modulation of CDK1-CDK-cyclin and pRb-related protein-E2F complexes. *Carcinogenesis*, v.24, p.555-563, 2003.

SOMASUNDAR, P.; RIGGS, D.R.; JACKSON, B.J.; CUNNINGHAM, C.; VONA-DAVIS, L.; MCFADDEN, D.W. Inositol hexaphosphate (IP6): A novel treatment for pancreatic cancer. *J. Surg. Res.*, v.126, p.199-203, 2005.

STEER, T.E.; GIBSON, G.T. The microbiology of phitic acid metabolism by gut bacteria and relevance for bowel cancer. *Int. J. Fod Sci.*, v.37, p.783-790, 2002.

STEVENS, R.G.; JONES, D.Y.; MICOZZI, M.S. Body iron stores and the risk of cancer. *New Engl. J. Med.*, v.319 (14), p.1047-1052, 1988.

STEVENS, R.G.; GRAUBARD, B.I.; MICOZZI, M.S.; NERIISH, K.; BLUMBERG, B.S. Moderate elevation of body iron level and incresead risk of cancer occurrence and death. *Int. J. Cancer*, v.56, p.364-369, 1994.

SZKUDELSKI, T. Phytic acid-induced metabolic changes in the rat. *J. Anim. Phys. Anim. Nutr.*, v.89, p.397-402, 2005.

TAKKUNEN, H.; REUNANEN, A.; KNEKT, P.; AROMA, A. Body iron stores and the risk of cancer. *New Engl. J. Med.*, v.320 (14), p.1013-1014, 1989.

TEN BRUGGENCATE, S. J. M.; BOVEE-OUDENHOVEN, I. M. J.; LETTINKWISSINK, M. L. G.; KATAN, M. B.; VAN DER MEER, R. Dietary fructooligosaccharides and inulin decrease resistance of rats to salmonella: protective role of calcium. *Gut*, v. 53, p. 530-535, 2004.

THE UK HAEMOCHROMATOSIS CONSORTIUM. A simple genetic test indentifies 90% of UK patients with haemochromatosis. *Gut*, v.41, p.841-844, 1997.

TORRE, M.; RODRIGUEZ, A.R.; SAURA-CALIXTO, F. Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v.1 (1), p.1-22, 1991.

TROADEC, M.B.; COURSELAUD, B.; DÉTIVAUD, L.; HAZIZA-PIGEON, C.; LEROYER, P.; BRISSOT, P.; LORÉAL, O. Iron overload promotes Cyclin D1 expression and alters cell cycle in mouse hepatocytes. *J. Hepat.*, v.44, p.391-399, 2006.

VAN LOO, J.; COUSSEMENT, P.; DE LEENHEER, L.; HOEBREGS, H.; SMITS, G. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the Western Diet. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v.35(6), p.525-552, 1995.

VUCENIK, I.; SHAMSUDDIN A.M. [^{3}H]-Phytic acid (inositol hexaphosphate) is rapidly absorbed and metabolized by murine and human malignant cells in vitro. *J. Nutr.*, v.124, p.861-868, 1994.

VUCENIK, I.; SHAMSUDDIN A.M. Protection against cancer by dietary IP6 and inositol. *Nutr. Cancer*, v. 55, n.2, p.109-125, 2006.

WELCH, K.D.; DAVIS, T.Z.; VAN EDEN, M.E.; AUST, S.D. Deleterius iron-mediated oxidation of biomolecules. *Free Rad. Biol Med.*, v.32, n.7, p.577-583, 2002.

WESSLING-RESNICK, M. Iron Imports. III. Transfer of iron from the mucosa into circulation. *Am.J.Physiol.Gastrontest.Liver Physiol.*, v. 290, p.G1-G6, 2006.

WEST, A.R.; OATES, P.S. Subcellular location of heme oxygenase 1 and 2 and divalent metal transporter 1 in relation to endocytotic markers during heme iron absorption. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, v.23, n.1, p.150-158, 2008.

WESTMAN, N.; MARKLUND, S.L. Copper- and zinc- containing superoxide dismutase and manganese-containing superoxide dismutase in human tissues and human malignant tumors. *Cancer Res.*, v.41, p.2962-2966, 1981.

WHITTINGTON, C.A.; KOWDLEY, K.V. Haemochromatosis. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, v.16, p.1963-1975, 2002.

WRIGHT, M.O.; BURDEN, V.; LEE, J.; EITENMILLER, R.R.; FISCHER, J.G. High dietary iron enhances oxidative stress in liver but does not incresead aberrant crypt foci development in rats with low vitamin E status. *Nutr. Cancer*, v.35(2), p.243-152, 1999.

YUANGKLANG, C.; WENSING, T.; LEMMENS, A.G.; JITTAKHOT, S.; BEYNEN, A.C. Effect of sodium phytate supplementation on fat digestion and cholesterol metabolism in female rats. *J. Anim. Phis. Anim. Nutr.*, v.89, p.373-378, 2005.

ZUNQUIN, G.; ROULEAU, V.; BOUHALLAB, S.; BUREAU, F.; THEUNYNCK, D.; ROUSSELOT, P.; ARHAN, P.; BOUGLE, D. Iron and exercise induced alterations in antioxidant status. Protection by dietary milk proteins. *Free Rad. Res.*, v.40 (5), p.535-542, 2006.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

- ✓ Avaliar, em ratos, se a moderada sobrecarga de Fe provoca lesões nos tecidos hepático e ósseo e alterações no perfil das lipoproteínas plasmáticas e se a suplementação com farinha de yacon rica em FOS e/ou fitato podem reverter esses efeitos.

4.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito desses componentes:

CAPÍTULO 1

- ✓ na absorção aparente de Fe, Zn e Cu
- ✓ na peroxidação hepática
- ✓ na eritropoiese e na histopatologia hepática
- ✓ no perfil dos lipídeos séricos

CAPÍTULO 2

- ✓ na formação e na reabsorção ósseas
- ✓ na absorção aparente de Ca
- ✓ nas propriedades mecânicas dos ossos

CAPÍTULO 1

Efeitos da moderada sobrecarga de Fe e da sua interação com farinha de yacon e/ou fitato nos índices de estresse oxidativo hepático e no perfil dos lipídeos séricos. Estudo em ratos.

RESUMO

O excesso de Fe no organismo, como o que ocorre nas sobrecargas de Fe primária e secundária, pode gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) potencialmente tóxicas para o tecido hepático, uma vez que localiza-se neste órgão o principal estoque de Fe corporal. Outra conseqüência desta exposição excessiva ao Fe é a alteração no perfil sérico das lipoproteínas, principalmente em modelos de hipercolesterolemia. Entretanto, não é conhecido se essas alterações ocorrem na presença de moderada sobrecarga de Fe e qual o efeito desta quando da interação com inibidores e facilitadores da absorção do Fe. O objetivo do presente estudo foi avaliar, em ratos saudáveis, o efeito da moderada sobrecarga de Fe e a interação desta com fitato e/ou farinha de yacon rica em frutanos, reconhecidos inibidor e facilitador da absorção de Fe, no tecido hepático e no perfil sérico dos lipídeos. Para este fim foram avaliados: absorção aparente de Fe, Cu e Zn; estado nutricional em Fe pelos parâmetros séricos e hemograma; perfil dos lipídeos séricos; alteração do tecido hepático (AST e ALT no soro, hemossiderina e apoptose, perfil de ácidos graxos); estresse oxidativo. Os resultados demonstraram que a moderada sobrecarga de Fe pode causar alterações no tecido hepático e no perfil dos lipídeos séricos e que a interação com farinha de yacon, rica em frutanos e/ou fitato, pode reverter parcial ou totalmente estas alterações.

INTRODUÇÃO

Metais de transição, tais como o Fe, estão totalmente envolvidos em muitas reações bioquímicas de oxi-redução, essenciais para o desenvolvimento da vida. Porém, as mesmas propriedades químicas que permitem que esse mineral atue como um eficiente cofator também o habilitam a mediar oxidação de biomoléculas se o mesmo estiver em excesso no organismo (WELCH *et al.*,

2002). O fígado é especialmente sujeito a este efeito tóxico por ser o maior sítio de estoque de Fe corporal. Em doenças inerentes ao metabolismo do Fe, como na hemocromatose hereditária (HH), o excesso de Fe leva a fibrose portal, cirrose e carcinoma hepatocelular (ASARE *et al.*, 2006). A participação do Fe nesses processos ocorre devido à reversibilidade nos seus estados de valência (FAIRWEATHER-TAIT, 1995), sendo um importante fator na geração de espécies reativas derivadas do O_2 (ERO). Tais espécies compreendem o radical superóxido (O_2^-), o radical hidroperoxila (HO_2^-), o radical hidroxila ($OH^\bullet$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete ($^1O_2$). Todavia, nosso desenvolvido sistema de defesa antioxidante, tanto enzimático, que inclui a ação das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa (GSH) e glutationa peroxidase (GSH-Px), quanto não enzimático, tais como α-tocoferol (vitamina E), β-caroteno, vitamina A e ácido ascórbico (vitamina C), pode proteger-nos dos danos oxidativos causados por esses radicais (BERNOTTI *et al.*, 2003).

Entretanto, altas doses ou remoção inadequada dessas espécies podem resultar em estresse oxidativo. Este pode causar várias disfunções metabólicas e danos irreversíveis a diversos tecidos e órgãos (LLEDIAS *et al.*, 1998).

Em humanos com HH e em animais de experimentação recebendo dietas com elevada sobrecarga de Fe, vários trabalhos relacionam o estresse oxidativo gerado pelo excesso desse mineral a marcantes alterações no tecido hepático e a alterações no perfil das lipoproteínas plasmáticas (BRUNET *et al.*, 1997; CECCARELLI *et al.*, 1995; ASARE *et al.*, 2006; TROADEC *et al.*, 2006). Entretanto, sabe-se que, em ratos, mesmo a moderada sobrecarga de Fe induz a geração de ERO que levam ao aumento da peroxidação lipídica das membranas celulares e/ou a dano ao DNA (KNUTSON *et al.*, 2000; FISCHER *et al.*, 2002).

Todavia, nesses trabalhos, a avaliação do excesso de Fe fez-se, em geral, de forma isolada, por via parenteral ou em dietas semipurificadas, sem que fossem avaliados os possíveis interferentes da biodisponibilidade do mineral. Assim, a questão que colocamos é quais seriam os efeitos no fígado e no perfil das lipoproteínas plasmáticas da interação entre a moderada

sobrecarga de Fe com fitato e/ou frutanos, reconhecidos inibidor e facilitador da absorção do Fe, respectivamente.

A molécula de fitato (hexafosfato de mioinositol - IP_6), por ser altamente carregada com seis grupos fosfato, quela e reduz a atividade de minerais, tais como Ca, Zn e Fe, interferindo negativamente na biodisponibilidade dos mesmos (HALLBERG *et al.*,1987; TORRE *et al.*, 1991; LOPEZ *et al.*, 1998). Entretanto, essa caracteristica também o faz ser considerado um antioxidante natural (JENAB e THOMPSON, 1998), reduzindo a carcinogênese e o dano celular mediados por ERO (VUCENIK e SHAMSUDDIN, 2006) e diminuindo a concentração de ácidos graxos livres no soro, de triacilgliceróis e colesterol hepáticos (SZKUDELSKI, 2005; YUANGKLANG *et al.*, 2005)

Por outro lado, os carboidratos fermentáveis, em particular os frutanos (inulina e frutooligossacarídeos), por serem resistentes à digestão no intestino delgado, são metabolizados pela microbiota residente no intestino grosso (ROBERFROID, 2007). Esse processo resulta na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) que desempenham importante função na manutenção da integridade da mucosa intestinal, no metabolismo de carboidratos e lipídeos e na função imunológica (SEIFERT e WATZL, 2007; DELZENE *et al.*, 2002; DELZENE *et al., 2007).* Neste contexto, Delzenne e colaboradores (2004) demonstraram que os frutooligossacarídeos (FOS) exerceram hepatoproteção em ratos submetidos a choque endotóxico produzido por lipopolissacarídeos, através de maior atividade fagocítica das células de Kupffer. Ainda, a produção de AGCC leva a diminuição do pH, aumentando a biodisponibilidade de minerais (SCHOLZ-AHRENS *et al.,* 2007). A fermentação aumentada no ceco também promove, aparentemente, melhor hidrólise do fitato, conteragindo os efeitos deste na absorção de minerais (LOPEZ *et al.*, 2000). Desta forma, o consumo dos FOS tem sido associado com efeito locais e sistêmicos, influenciando a homeostase de minerais, o metabolismo hepático, ósseo, intestinal e as lipoproteínas plasmáticas. Os FOS do yacon (*Smallanthus sonchifolis* [Poepp e Endl.] H. Robinson, Asteracea), raiz tuberosa andina, objeto do nosso estudo, acumulam elevadas concentrações de frutanos com baixo grau de polimerização (DP < 10, FOS) (ITAYA *et al.*, 2002), sendo que

somos o primeiro grupo a utilizar a farinha de yacon como fonte de FOS na avaliação sistêmica de seus efeitos.

Desta forma, a hipótese do presente estudo é que a farinha de yacon, rica em FOS, e IP_6, oferecidos em uma mesma dieta, possam contrabalancear os possíveis efeitos deletérios provocados no fígado pela moderada sobrecarga de Fe. Além desse tecido também foram avaliados os parâmetros bioquímicos relacionados ao Fe, ao perfil das lipoproteínas plasmáticas e à lesão tecidual.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e dietas

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Trinta e quatro ratos Wistar machos, pesando 49,3 + 3,9 g, foram obtidos a partir da colônia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os ratos foram alojados individualmente em gaiolas semimetabólicas de aço inoxidável, sob temperatura controlada (22 ± 2 °C) e umidade relativa de 55 ± 10%, com um ciclo claro/escuro de 12h (luzes acesas das 8:00 às 20:00h). Uma dieta modificada AIN-93G (REEVES *et al.*, 1993) foi utilizada para o estudo (Tabela 1). Cinco dietas foram preparadas (uma dieta controle AIN93G e quatro dietas com moderada sobrecarga Fe) e suplementadas com $FeSO4.7H_2O$ microencapsulado (COCATO *et al.*, 2007) obtidos da empresa Fermavi Eletroquímica Ltda. (São Paulo, Brasil). Três das quatro dietas com sobrecarga de Fe foram suplementadas com farinha de yacon rica em frutanos (FOS) e/ou fitato (hexafosfato de mioinositol - Sigma-Aldrich®). As quantidades de FOS e açúcares solúveis presentes nas dietas foram subtraídas das de sacarose e amido. Após a preparação, amostras das rações foram recolhidas para análise da composição química e armazenadas (cerca de 4°C) até à sua utilização.

Protocolo experimental

Para aclimatação, os animais foram alimentados por cinco dias com a dieta controle AIN-93G e, então, foram aleatoriamente distribuídos nos cinco grupos formados (n = 7 por grupo), tal que o peso médio de cada grupo foi igual (Tabela 3). Os ratos tiveram livre acesso à água desmineralizada e às dietas com adequada (grupo controle) ou moderadamente elevada concentração de ferro (grupos sobrecarga de Fe) (45 e 550mg de ferro/kg de ração, respectivamente), por 92 dias. Adicionalmente, os grupos com moderada sobrecarga de ferro foram suplementados com farinha de yacon rica em FOS e/ou fitato, nas concentrações de 3,6% FOS/kg dieta e 0,6% fitato/kg dieta. Os grupos foram assim denominados: controle, sobrecarga de ferro (SBC), sobrecarga de ferro + farinha de yacon (SBC+FY), sobrecarga de ferro + fitato (SBC+FIT), sobrecarga de ferro + farinha yacon + fitato (SBC+FY+FIT). O consumo de ração foi avaliado diariamente e a pesagem dos animais foi efetuada a cada três dias. As fezes foram coletadas nos 5 dias anteriores ao sacrifício (do 82° ao 87° dia), reunidas e armazenadas a -20 °C até a análise. A umidade das fezes foi determinada por gravimetria após o aquecimento das mesmas a 105°C. Ao término do ensaio, os animais foram anestesiados por injeção intraperitonial com uma mistura de cloridrato de quetamina (10mg/kg), cloridrato de xilazina (25mg/kg), acepromazina (2mg/ml) e H_2O desmineralizada, na proporção de 1,0:1,0: 0,4:1,6, respectivamente.

Composição química das dietas experimentais

Os seguintes componentes das dietas foram determinados: umidade, cinzas, lipídios totais (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1995) e proteínas pelo método de micro-Kjeldahl (AOAC, 1985) (fator de conversão de 6,25). As concentrações de Fe, Zn e Cu foram determinadas por EAA, de acordo com o método da AOAC (1985) (AAnalyst 100, Perkin Elmer, USA), empregando lâmpadas de catodo oco com comprimentos de onda de 283,4; 213,9 e 324,8 nm e fendas de 0,2; 1,3 e 1,3nm, respectivamente, após digestão úmida com

HNO3: H2O2 (5:1). As soluções padrão foram preparadas por diluição dos padrões de $FeCl_3$, $ZnCl_2$ e $CuCl_2$ (Tritisol, Merck, Darmstadt, Germany).

Coleta de sangue

O sangue foi coletado da veia cava inferior com K_3EDTA 10% para realização do hemograma (hematócrito, hemoglobina, contagem de hemácias, leucócitos totais e reticulócitos) (DRABKIN e AUSTIN, 1935) e sem EDTA para as demais análises. A concentração de Fe sérico e a capacidade total de ligação com o Fe foram determinadas segundo Williams e Conrad (1972). Extensões sangüíneas foram feitas imediatamente após a coleta, para contagem diferencial dos leucócitos e análises morfológicas (ROSENFELD, 1947). Para detecção das possíveis lesões causadas pela sobrecarga de Fe, foram avaliadas as atividades séricas da aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) por *kits* comerciais (Labtest® Diagnóstica S/A). Triacilgliceróis, colesterol total e HDL-colesterol foram determinados por método enzimático colorimétrico (Labtest® Diagnóstica S/A).

Parâmetros hepáticos

Após a anestesia, os fígados foram perfundidos com solução salina de NaCl 0,85%, removidos, pesados e armazenados a -20°C até o momento das análises.

Concentração de minerais: os fígados foram descongelados à temperatura ambiente para a determinação da concentração de Fe, Zn e Cu. Aproximadamente 2g de cada fígado, retirados do lobo médio, foram digeridos, segundo as normas da AOAC (1995). A concentração dos minerais nas amostras foi determinada pelo método de Espectrofotometria de Absorção Atômica (EAA) (Perkin Elmer, AAnalyst 100, USA).

Incorporação de ácidos graxos: a fração lipídica foi extraída de acordo com o método de Folch *et al.* (1957) e, em seguida, esterificada segundo técnica

descrita por Hartman e Lago (1973). Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram analisados por cromatografia a gás, segundo Moreira e Mancini (2003).

Atividade das enzimas antioxidantes: para a determinação da atividade das enzimas, amostras de fígado foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio 10mM, pH 7,5, na proporção de 1:10. Após a homogeneização, os extratos foram centrifugados a 10.000*g* durante 1 minuto (SPIN 1, Incibras, SP, Brasil) e o sobrenadante foi utilizado para determinar a atividade das enzimas em espectrofotômetro (Pharmacia). A quantificação de proteína e a dosagem enzimática foram feitas em duplicatas.

Atividade da catalase (E.C.1.11.1.6): os ensaios da atividade da catalase foram realizados segundo o método descrito por Aebi (1984). Neste, a atividade da enzima é determinada pelo consumo de H_2O_2 a 230nm e 30° C. A reação ocorreu em pH 8,0 e foi monitorada por aproximadamente 10 min, utilizando-se tampão fosfato como referência. A cada ensaio foram adicionados por volta de 20µl de amostra, 30µl de H_20, 50µl de tampão Tris-Base e 900 µl de H_2O_2. Para o cálculo da atividade, o valor da Δ DO (variação de absorbância) foi dividido pelo coeficiente de extinção mM do H_2O_2:0,071mmol^{-1}cm^{-1}. O resultado foi multiplicado pela diluição e dividido pela concentração de proteína (U por mg de proteína). Assim, foi utilizada a seguinte equação:

Atividade da catalase = (Δ absorbância / 0,071) x diluições / mg de proteína

Atividade da superóxido dismutase total (E.C.1.15.1.1) e da isoforma Mn-SOD: a atividade da SOD total foi monitorada pela redução do citocromo *c* (0,15g/L) pelos radicais superóxidos gerados no sistema xantina-xantina oxidase (em quantidade suficiente para que a taxa de redução do citocromo *c*, na ausência da amostra, fosse cerca de 0,025 unidades de absorbância por minuto). A determinação foi realizada a 550nm e 25°C (FLOHE, 1984). Primeiramente, foi determinado o branco, encontrando-se a quantidade adequada de tampão e xantina oxidase para que a absorbância estivesse o mais próximo de 0,025. Feito isso, para cada ensaio foram adicionados 2µl de amostra, 184µl de solução A (citocromo C, EDTA e xantina em tampão fosfato) e as quantidades encontradas no branco de tampão fosfato de sódio 50mM e

xantina oxidase. Para determinação da atividade de Mn-SOD, foi adicionada uma solução aquosa de KCN (1mM concentração final) à mistura de ensaio que inibe em 100%, aproximadamente, a atividade da CuZn-SOD. A unidade enzimática foi considerada como a quantidade necessária para que a taxa de redução de citocromo *c* pelo superóxido diminuísse pela metade. A atividade foi expressa em U por mg de proteína seguindo a seguinte equação:

Atividade da SOD = [(absorbância do branco – absorbância da amostra) / (absorbância do branco / 2)] x diluições / mg de proteína

Atividade da glutationa peroxidase (E.C.1.11.1.9): a atividade da glutationa peroxidase foi determinada segundo o método descrito por Wendel (1981). A determinação da atividade enzimática foi realizada indiretamente, monitorando-se o consumo de NADPH a 340 nm. Foram adicionadas, aproximadamente, em cada ensaio, concentrações finais de 0,25 mM de NaN_3, 0,25U/ml de glutationa redutase, 1mM de GSH, 15µl de amostra, 360µl de Stoch Buffer (fosfato de sódio 143mM e EDTA 6,3mM – pH 7,5) e 0,12mM de NADPH. Após incubação a 37°C por aproximadamente 30 segundos, foram adicionados 50µl de TBHP (t-butil-hidroperóxido), sendo a reação monitorada por 10 minutos. Utilizou-se 1 ml de Stoch Buffer como referência. Os resultados foram expressos em nmol de TBHP reduzido por minuto por mg de proteína, considerando-se o coeficiente de extinção do NADPH (ε_{NADPH}) de 6,22 $nM^{-1} . cm^{-1}$. A atividade da GPX foi obtida segundo a equação:

Atividade da GPX = (Δ absorbância / 6,22) x diluições / mg de proteína

Análises histológicas: para avaliação da sobrecarga de Fe os fragmentos de fígado foram fixados em Metacarn (70% MetOH, 20% $CHCl_3$, 10% AcOH), incluídos em parafina e, posteriormente, seccionados em cortes de aproximadamente 5µm de espessura e corados por hematoxilina e eosina e pelo método de Perls (BEHMER *et al.*, 1976). O exame histológico das lâminas foi realizado em microscopia de luz, com aumentos de 40, 100 e 400x. A intensidade do depósito de hemossiderina hepática foi analisada semiquantitativamente na escala de 0 a 3, onde: 0= parâmetro tido como dentro da normalidade com ausência de pigmento de hemossiderina; 1= alterações mínimas caracterizadas por presença de até 2 células de Kupffer

com hemossiderina por campo de 400x e ausência de macrófagos portais e hepatócitos com pigmentos; 2= alterações grau moderado no qual se observam de 3 a 6 células de Kupffer com pigmentos, raros hepatócitos com pigmentos; 3= grau máximo de alteração no qual há mais de 6 células de Kupffer com pigmentos por campo de 400x e presença de hepatócitos e macrófagos portais com pigmentos.

A apoptose foi avaliada empregando-se o método de microscopia de fluorescência descrito por Stinchcombe *et al.* (1995). Foi utilizado microscópio de epifluorescência (Nikon E-800, Japão) em aumento de 400x, para quantificar o número de corpúsculos apoptóticos (CA) nas áreas de lesão ou de tecido "normal". Foram contados todos os corpúsculos apoptóticos e mensurada a área do corte. Esta análise foi feita com auxílio do sistema de análise de imagens Image Pro-Plus, versão 4.5.

Vitamina E*:* cerca de 200mg do fígado foram homogenizados com etanol e n-hexano sendo, em seguida, centrifugados por 10 minutos a 3.500rpm. Retirou-se 500ul do sobrenadante, secando a amostra em nitrogênio. Ressuspendeu-se a amostra com 500 µl de fase móvel (70% de acetonitrila; 20% de diclorometano; 10% de metanol). Para a análise da vitamina E, injetaram-se 20µl no HPLC [(Shimadzu (Japan), modelo LC9, coluna tipo C18 (OD5) (25cm x 0,46cm)], usando um fluxo de 1,0ml/min e comprimento de onda de 292nm. O resultado do alfa-tocoferol foi expresso em µM/g tecido através da curva de calibração traçada no HPLC (ARNAUD *et al.*, 1991).

Fezes: as determinações das concentrações de Fe, Zn e Cu foram realizadas por Espectrofometria de Absorção Atômica (EAA) (Perkin Elmer Analyst A100), segundo as normas da AOAC (1995).

Análise estatística

A análise dos dados foi feita com o pacote estatístico *SPSS* (*Statistical Package for Social Sciences*) *for Windows* versão 11.5. Todos os testes foram realizados assumindo um nível de significância α=5%. Inicialmente foi utilizada a estatística descritiva para avaliar a média e desvio-padrão das variáveis de interesse. A medida de correlação de Pearson (BUSSAB e MORETTIN, 2001)

foi calculada para medir o grau de associação entre algumas variáveis. As comparações das médias das variáveis, entre os cinco grupos (Controle, SBC, SBC+FOS, SBC+FIT e SBC+FOS+FIT), foram realizadas através da ANOVA (MONTGOMERY, 2001). Para as diferenças significativas, o *Post-Hoc* de Tukey foi aplicado para identificar onde ocorrem essas diferenças. A normalidade das observações foi verificada através do teste não paramétrico de Komogorov-Smirnov (CONOVER, 1999).

RESULTADOS

Composição química das dietas experimentais

A análise química das dietas revelou concentrações de Fe de 48,8; 575,7; 585,5; 556,1 e 604,2mg Fe/kg nos grupos controle, SBC, SBC+FY, SBC+FIT e SBC+FY+FIT, respectivamente. Não foram verificadas diferenças significativas nas concentrações de Zn e Cu nas dietas (38,2; 41,2; 43,3; 42,1; 38,1mg de Zn/kg e 6,1; 6,0; 6,9; 5,5; 7,1mg de Cu/kg, nos grupos controle, SBC, SBC+FY, SBC+FIT e SBC+FY+FIT, respectivamente) ou nas concentrações de proteínas e lipídeos (18% e 6%, respectivamente, para todos os grupos).

Ganho de peso e consumo alimentar

A ingestão alimentar e o ganho de peso não foram alterados ($p > 0,05$) pela concentração de Fe na dieta ou pela presença de farinha de yacon e/ou fitato (Tabela 2).

Parâmetros fecais

Umidade: não houve diferença significativa na quantidade de fezes excretadas por todos os grupos ao longo do período de cinco dias (entre o 82° e o 87° dias de experiência), em peso seco. No entanto, a farinha de yacon aumentou significativamente a umidade das fezes ($p=0,000$) quando comparada com os grupos sem esse componente. Este efeito foi ainda mais intenso na interação entre farinha de yacon e fitato (grupo SBC+FY+FIT) (Tabela 2).

Ferro: o aumento na ingestão de Fe por todos os grupos SBC resultou em aumento na excreção fecal deste mineral quando comparados com o grupo controle (p=0,000). No entanto, nos grupos que receberam SBC + farinha de yacon (grupos SBC+FY e SBC+FY+FIT), houve redução significativa na excreção deste mineral, quando comparado com o grupo SBC (p<0,05) (Tabela 2).

Cobre e Zinco: não houve diferença na excreção fecal de cobre e zinco entre todos os grupos (p>0,05). No entanto, houve forte tendência de menor excreção de zinco (p=0,08) pelo grupo SBC+FY+FIT (Tabela 2).

Absorção aparente (%): o aumento na excreção fecal de Fe observada nos grupos SBC não se refletiu na redução da absorção aparente deste mineral. Pelo contrário, todos os grupos com moderada sobrecarga de Fe apresentaram aumento na absorção aparente de Fe quando comparados com o grupo controle (p<0,05). Em relação ao Zn, a moderada sobrecarga de Fe, mesmo na presença de fitato (grupos SBC e SBC+FIT), não alterou significativamente a absorção aparente deste mineral quando comparada com o grupo controle. A moderada sobrecarga de Fe também não alterou a absorção aparente de Cu, mas a presença da farinha de yacon (grupo SBC+FY) aumentou a absorção aparente deste mineral (+ 75%) quando comparada com o grupo controle (p<0,05) (Tabela 2).

Análises do sangue

Índices do estado nutricional em Fe: não houve diferença significativa (p>0,05) no Fe sérico, ST (saturação de transferrina, em %) ou CTLF (capacidade total de ligação do ferro) (Tabela 3). O mesmo foi observado no hemograma (hematócrito, hemoglobina, leucócitos e reticulócitos) (dados não apresentados).

Concentração dos lipídeos séricos e atividade das transaminases séricas

Colesterol: a moderada sobrecarga de Fe reduziu o colesterol sérico (-29%) em comparação com o grupo controle (p=0,002), que persistiu na presença de farinha de yacon (grupo SBC+FY). Na interação entre SBC+FIT e

SBC+FY+FIT, a concentração do colesterol retornou para o nível observado no grupo controle (Tabela 3).

Triacilglicerol: a interação SBC+FY+FIT reduziu a concentração sérica de triacilglicerol (-51% em comparação com o grupo controle, p=0,047). Nos grupos SBC e SBC+FY, embora não significativamente (p>0,05), também ocorreu diminuição neste parâmetro (-27% e -40%, respectivamente, em comparação com o grupo controle) (Tabela 3).

HDL e VLDL: a interação SBC+FY+FIT reduziu significativamente (-51%) a concentração sérica de VLDL (p=0,047). Ainda que de forma não significativa (p=0,07), a moderada sobrecarga de Fe (grupo SBC) diminuiu a concentração sérica de HDL (-33%), que retornou aos níveis observados no grupo controle quando na presença de farinha de yacon e/ou fitato (Tabela 3).

AST e ALT: as possíveis lesões teciduais causadas pela moderada sobrecarga de Fe foram avaliadas através das transaminases séricas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Houve aumento de +40% na concentração sérica de AST no grupo SBC quando comparado com o grupo controle (p=0,055), retornando aos níveis observados no grupo controle nas interações SBC+FY, SBC+FIT e SBC+FY+FIT. Não foi observada diferença na concentração sérica de ALT em todos os grupos (Tabela 3).

Parâmetros hepáticos

Concentração de Fe, Cu e Zn: o aumento na ingestão de Fe resultou em aumento na concentração hepática deste mineral nos grupos SBC e SBC+FIT quando comparados com o grupo controle (p=0,002). No entanto, nos grupos SBC+FY e SBC+FY+FIT, não houve diferença na concentração hepática de Fe quando comparados com o grupo controle. Não houve diferença, entre todos os grupos, nas concentrações hepáticas de cobre e zinco (Tabela 4).

Incorporação de ácidos graxos: não houve diferença estatisticamente significativa (p>0,05) na incorporação de ácidos graxos no tecido hepático entre todos os grupos experimentais (dados não mostrados).

Vitamina E, SOD total, MnSOD e CuZnSOD: nenhuma diferença foi observada nas concentrações hepáticas de vitamina E, SOD total, MnSOD e CuZnSOD. Entretanto, houve forte tendência a aumento na concentração da

CuZnSOD (p=0,09) para os grupos SBC e SBC+FY (+66% e +106%, respectivamente) (Tabela 4).

Catalase: a interação entre SBC+FY+FIT resultou na diminuição (-25%) da atividade da catalase (p=0,036). Entretanto, apesar de não significativa (p>0,05), houve diminuição da atividade dessa enzima também para os grupos SBC e SBC+FY (-23% e -21%, respectivamente) (Tabela 4).

GPx: a sobrecarga de Fe resultou em elevação da atividade da GPx em todos os grupos com sobrecarga de Fe quando comparados ao grupo controle (p=0,000). Entretanto, na interação SBC+FIT e SBC+FY+FIT houve diminuição da atividade dessa enzima (p<0,05) quando comparada ao grupo SBC (Figura 1).

Análises histológicas

Macroscopia: em nenhum dos grupos foram observadas alterações macroscópicas do fígado quanto a tamanho, coloração, consistência e superfície de corte.

Microscopia de luz: no grupo controle, observou-se mínimo infiltrado de linfócitos e plasmócitos em alguns espaços-porta. Ausência de alteração dos hepatócitos e raras células binucleadas foram vistas. Nos grupos com moderada sobrecarga de Fe foram observados, em alguns animais, discretos focos de infiltrados linfócitos tubulares e alguns casos de degeneração vacuolar microgoticular difusa.

Avaliação semiquantitativa do depósito de hemossiderina: todos os animais do grupo controle apresentaram ausência de depósitos de hemossiderina (escala 0). Nos grupos SBC, com exceção do grupo SBC+FY+FIT, todos os animais apresentaram escala 1 de depósito de hemossiderina, com significativa diferença do grupo controle (p=0,000) (Tabela 5; Figura 1).

Apoptose: houve considerável aumento (p=0,000) no número de corpúsculos apoptóticos observados através da microscopia de fluorescência nos grupos SBC quando comparados ao grupo controle (>200%) (Tabela 5; Figura 2).

DISCUSSÃO

A relação entre a elevada sobrecarga de Fe e as alterações no tecido hepático e no perfil lipídico sérico, ambas relacionadas ao estresse oxidativo, tem sido extensivamente documentada na literatura (STAL *et al.*, 1995; BRUNET *et al.*, 1997; ASARE *et al.*, 2006a; ASARE *et al.*, 2006b). O Fe livre intracelular, causado pelo excesso de Fe no organismo, é um catalisador para a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (DE FREITAS e MENEGHINI, 2001; GALARIS e PANTOPOULOS, 2008) e, como resultado, pode induzir a dano oxidativo ao DNA, a proteínas e a lipídeos (BROWN *et al.*, 2003; RAMM e RUDDEL, 2005; TROADEC *et al.*, 2006). Entretanto, mesmo na leve sobrecarga de Fe há acúmulo de Fe não-heme hepático com significativo aumento na peroxidação lipídica e no dano à mitocôndria e ao DNA mitocondrial (KNUTSON *et al.*, 2000; FISCHER *et al.*, 2002; WALTER *et al.*, 2002). Todavia, a magnitude desses efeitos na presença de componentes dos alimentos, como os FOS e o fitato, que, além de efeitos sistêmicos, são capazes de modificar, positiva e negativamente, a absorção de minerais (DELZENNE *et al.*, 2002; NEYRINCK *et al.*, 2004; SZKUDELSKI, 2005; VUCENIK e SHAMSUDDIN, 2006), não é conhecida, sendo este o foco do presente trabalho.

Sabe-se que, em modelos de hemocromatose hereditária (HH), a sobrecarga de Fe leva a alterações nos índices séricos do estado nutricional em Fe, tais como aumento do Fe sérico, do índice de saturação de transferrina e da capacidade total de ligação do Fe (CTLF) (TURBINO-RIBEIRO *et al.*, 2003). Os resultados do presente estudo demostraram que a moderada sobrecarga de Fe não acarretou diferença nos índices séricos do estado nutricional em Fe (Tabela 3), a despeito do aumento na ingestão diária de Fe pelos grupos com sobrecarga de Fe (10mgFe/dia *versus* 0,8mgFe/dia do grupo controle) e da presença da farinha de yacon (3,6% FOS) e/ou fitato (0,6%), demonstrando que, na moderada sobrecarga de Fe e na ausência de um defeito congênito que altere a homeostase do mineral, os mecanismos que a regulam são suficientes para a manutenção desses índices dentro da normalidade. Em humanos e animais saudáveis, a homeostase de Fe é controlada por alterações na eficiência absortiva do mineral. Quanto maior a

concentração de Fe na dieta, menor será a sua absorção (HALLBERG *et al.*, 1997; POLTRONIERI *et al.*, 2000; COCATO *et al.*, 2007), sendo esta regulação mediada via síntese de hepcidina pelo tecido hepático (GANZ e NEMETH, 2006). Outro importante mecanismo envolvido nessa regulação ocorre via aumento ou diminuição da síntese de ferritina, nos estados de deficiência ou sobrecarga de Fe, respectivamente, envolvendo a ação de IRP/IRE (proteínas reguladoras do Fe e elementos responsivos ao Fe, respectivamente) (CRICHTON *et al.*, 2002). Entretanto, no presente trabalho, houve aumento na absorção aparente deste mineral (Tabela 3). Contudo, como não foram observadas alterações nos índices séricos do estado nutricional em Fe, nós especulamos que, por se tratar de uma sobrecarga de Fe moderada, este tenha sido armazenado na ferritina previamente sintetizada.

Por outro lado, a sobrecarga de Fe não alterou a absorção aparente de Zn e Cu, exceção feita apenas para o grupo SBC+FY, no qual houve aumento na absorção aparente de Cu com relação ao grupo controle ($p<0,05$) (Tabela 2). Entretanto, este aumento na absorção aparente de Cu para o grupo SBC+FY não resultou em diferença na concentração hepática desse mineral, corroborando os resultados encontrados por Vayenas *et al.* (1998), que demonstraram que o excesso de Fe não interfere na concentração de Cu e Zn neste órgão. A associação entre a sobrecarga de Fe e o fitato (SBC+FIT) (concentração na dieta de 0,6%), por sua vez, também não interferiu na absorção aparente de Fe, Zn e Cu. Este resultado confirma os encontrados por Yuangklang *et al.* (2005), que demonstraram que, na concentração de 0,4%, os fitatos não diminuíram a absorção aparente de Ca e Mg ou a concentração hepática de Fe, Zn e Cu. Segundo Szkudelski (2005), ao ser ingerido com uma dieta, o fitato sofre desfosforilação no trato digestivo, processo catalisado pelas fitases, de maneira que formas menos fosforiladas e não fosforiladas do inositol são absorvidas, diminuindo a sua capacidade de quelar os minerais.

O aumento na absorção aparente de Fe verificada em todos os grupos SBC com relação ao grupo controle resultou em aumento na concentração de Fe em todos os grupos com SBC, quando comparados ao grupo controle (Tabela 4), porém com significado estatístico apenas para os grupos SBC e SBC+FIT ($p=0,002$). Entretanto, apesar da sua magnitude não ter sido

tão grande quanto aquelas encontradas em roedores submetidos a modelo de HH (Bacon e Briton, 1990), esse aumento foi suficiente para elevar a atividade hepática da enzima glutationa peroxidase (GPx) em todos os grupos SBC quando comparados com o grupo controle (aumento > 200%) (Tabela 4), sem qualquer participação da enzima MnSOD e com redução da atividade da enzima CAT observada apenas no grupo SBC+FY+FIT (Tabela 4). A enzima GPx está presente em todos os compartimentos celulares (SCHRADER e FAHINI, 2004), sendo uma das principais responsáveis pela redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a H_2O (atividade também desempenhada pela CAT), evitando a formação de radical hidroxila (OH•), a mais reativa espécie de oxigênio. Desta forma, o aumento na atividade da GPx pode indicar que o Fe livre gerado pela moderada sobrecarga de Fe pode ter sido suficiente para reduzir o O_2 molecular citoplasmático, via xantina oxidase, levando ao aumento da produção de radicais superóxido ($O^{\bullet}_2{}^{-}$), o que, por sua vez, resultou em aumento na produção de H_2O_2, via Reação de Fenton (Galaris e Pantopoulos, 2008). Este processo envolveria a ação da CuZnSOD, cujo principal compartimento é o citoplasma das células, na desmutação do $O^{\bullet}_2{}^{-}$. De fato, neste trabalho nós encontramos tendência de aumento da atividade hepática desta enzima em todos os grupos (p=0,09), com exceção do grupo SBC+FIT. Neste aspecto, a presença do fitato, tanto no grupo SBC+FIT como no grupo SBC+FY+FIT, apesar de aumentar em 216% a atividade da GPx com relação ao controle, reduziu a atividade desta enzima em 52%, quando comparada ao grupo SBC (p<0,05), confirmando as propriedades antioxidantes deste composto. Segundo Muraoka e Miura (2004), o fitato inibe a xantina oxidase e destrói os radicais $O^{\bullet}_2{}^{-}$, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, confirmando que a provável via relacionada ao aumento da atividade da GPx seja através da xantina oxidase.

Por outro, para avaliar o possível dano ocasionado pela moderada sobrecarga de Fe no tecido hepático, nós avaliamos as atividades séricas das enzimas alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase (ALT e AST). Nenhuma alteração foi observada na atividade da ALT, mas houve aumento na atividade da AST (+ 40% *versus* grupo controle, p=0,055) para o grupo SBC. Na presença da farinha de yacon e/ou fitato, a atividade retornou àquela

observada no grupo controle. O padrão de atividade da AST nos grupos com SBC seguiu o mesmo padrão observado na atividade da GPx para os diversos grupos, com o grupo SBC demonstrando a maior atividade enzimática e os grupos com fitato tendendo a menor atividade, quando comparados ao grupo controle. Este resultado, mais uma vez, denota efeito hepatoprotetor do fitato na presença da moderada sobrecarga de Fe.

Entretanto, para aprofundar o conhecimento dos efeitos da moderada sobrecarga de Fe sobre o tecido hepático, nós procedemos a uma avaliação histopatológica, com a finalidade de aferir a magnitude e a distribuição dos depósitos de Fe no fígado, além de avaliar a formação de corpúsculos apoptóticos neste tecido. A moderada sobrecarga de Fe resultou em discreto aumento de depósito de hemossiderina ao redor das células de Kupffer em todos os grupos SBC (Tabela 5; Figura 1). Este padrão de distribuição é o esperado quando o aumento do estoque de Fe corporal é ocasionado por exposição crônica ao suprimento de Fe na ausência de HH (DEUGNIER *et al.*, 2008). As células de Kupffer representam a maior população de macrófagos no organismo e têm uma posição anatômica e histológica que possibilita às mesmas controlar a presença de substâncias estranhas trazidas pelo sangue portal (VANDERKERKEN *et al.,* 1995). Entretanto, a ativação das células de Kupffer pode desencadear processos secundários necro-inflamatórios através da ativação de prostaglandinas (PGE), leucotrienos, fator de necrose tumoral-α (TNF-α), dentre outros, levando a alterações no tecido hepático, tais como inflamação, fibrose e apoptose (VANDERKERKEN *et al.,* 1995; CANBAY *et al.*, 2003).

De fato, nós demonstramos que a moderada sobrecarga de Fe desencadeou, no fígado, aumento significativo na quantidade de corpúsculos apoptóticos por área (aumento de 3 a 5 vezes, quando comparado ao grupo controle) (Tabela 5). A presença de grande número de corpúsculos apoptóticos, para os grupos que receberam dieta com sobrecarga de ferro e farinha de yacon (SBC+FY e SBC+FY+FIT), pode estar relacionada aos efeitos sistêmicos dos AGCC gerados pelos FOS da farinha de yacon. Neyrinck e colaboradores (2004) demonstraram que os FOS da inulina (Raftilose P_{95}, Orafti) aumentaram a secreção de PGE_2 e de TNF-α independente de qualquer

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

estímulo. Ambos, como dito anteriormente, estão envolvidos em processos apoptóticos pelas células de Kupffer. Entretanto, nos grupos que receberam farinha de yacon, não houve aumento nas atividades séricas das enzimas ALT e AST. Assim, o aumento da apoptose pode estar relacionado a mecanismos de proteção ao tecido hepático desencadeados pelos FOS da farinha de yacon.

No presente estudo também buscamos saber se a moderada sobrecarga de Fe alteraria o perfil de ácidos graxos no fígado, as concentrações da vitamina E e dos lipídeos séricos, reconhecidamente alterados na elevada sobrecarga de Fe (BRUNET *et al.*, 1997; TURBINO-RIBEIRO *et al.*, 2003), e se as interações desta com os FOS da farinha de yacon e/ou fitato poderiam reverter este processo. Não houve diferença entre todos os grupos no perfil de ácidos graxos (dados não mostrados) e na concentração de vitamina E (Tabela 4). Entretanto, os resultados obtidos demonstraram que, assim como ocorre na elevada sobrecarga de Fe, a moderada sobrecarga de Fe resultou na diminuição do colesterol (p=0,002), o que foi mantido na interação entre SBC+FY, e, apenas para o grupo SBC+FY+FIT, ocorreu diminuição nos triacilgliceróis séricos e no VLDL (p=0,047). Os mecanismos para os efeitos hipocolesterolêmicos induzidos pela sobrecarga de Fe ainda não são bem compreendidos. Trabalhos envolvendo a excreção de sais biliares e as enzimas lecitina: colesterol aciltransferase (LCAT) e acilcoenzima A:colesterol aciltransferase (ACAT) falharam em responder a essas questões (BRUNET *et al.,* 1997; YUANGKLANG *et al.*, 2005).

A diminuição do colesterol, entretanto, não foi observada quando ocorreu a interação com fitato (grupos SBC+FIT e SBC+FY+FIT). O efeito do fitato no colesterol sérico é controverso e o mecanismo de ação ainda não elucidado. Em ratos alimentados com dietas com excesso de colesterol (10g/kg), 0,4% de fitato resultou em aumento na concentração sérica do colesterol e nenhum efeito na concentrações de triacilgliceróis (YUANGKLANG *et al.*, 2005). Entretanto, em outro trabalho, a redução do colesterol só foi demonstrada com a adição de 1% de fitato à dieta (LEE *et al.*, 2007), enquanto nenhum efeito ocorreu na concentração sérica de triacilgliceróis. Por outro lado, Szkdelski (2005), trabalhando com adições crescentes de ácido fítico nas

dietas livres de colesterol de ratos, demonstrou que as adições de 0,1 e 0,2% de ácido fítico a dietas não resultaram em alterações no colesterol sérico, mas resultaram em diminuição dos triacilgliceróis séricos, enquanto as concentrações de 0,3% e 1% não tiveram nenhum efeito neste parâmetro. Em dietas com elevado teor de sacarose, o efeito do fitato na diminuição do colesterol sérico só foi observado quando a concentração deste composto na dieta foi de 10% (ONOMI *et al.*, 2004). Dentre os mecanismos sugeridos na diminuição do colesterol pelo fitato estão a inibição da síntese da enzima HMGCoA redutase, enzima fundamental na síntese do colesterol (LEE *et al.*, 2005), e das enzimas lipogênicas hepáticas (glicose 6-fosfato desidrogenase e ácido graxo sintase)(ONOMI *et al.*, 2004).

Os FOS da farinha de yacon, por outro lado, não alteraram os efeitos da sobrecarga de Fe nos lipídeos séricos, possivelmente em função da concentração utilizada neste trabalho. Este resultado é importante, considerando que os FOS da inulina, na concentração de 10% na dieta, resultaram na diminuição dos triacilgliceróis séricos, em ratos alimentados com dietas com altas concentrações lipídicas (DELZENNE *et al.*, 2002). Considerando que os mecanismos envolvidos sejam os mesmos, utilizando concentrações menores de FOS, na presença de moderada sobrecarga de Fe que, por si, já diminui a concentração de lipídeos séricos, garantimos que não ocorra mecanismo sinérgico quando da interação entre os dois componentes.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho demonstraram que a moderada sobrecarga de Fe não alterou os índices séricos do estado nutricional em Fe, mas resultou em alterações no tecido hepático, na atividade da enzima GPx e no perfil de lipídeos séricos. Entretanto, na interação com a farinha de yacon rica em FOS e/ou fitato, os efeitos negativos foram total ou parcialmente anulados, caracterizando a importância do consumo destes compostos para grupos expostos a dietas com moderada sobrecarga de Fe.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase *in vitro. Methods Enzymol.,* v.105, p.121-126, 1984.

ALLA, V.; BONKVSKY, H.L. Iron in nonhemochromatotic liver disorders. *Semin. Liver Disease*, v.25(4), p.461-472, 2005.

ARNAUD, J.; FORTIS, I.; BLACHIER, S.; KIA, D.; FAVIER, A. Simultaneous determination of retinol, α-tocopherol and β-carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, v.572, p.103-116, 1991.

ASARE, G.A.; MOSSANDA, K.S.; KEW, M.C.; PATERSON, A.C.; KAHLER-VENTER, C.P.; SIZIBA, K. Hepatocellular carcinoma caused by iron overload: A possible mechanism of direct hepatocarcinogenicity. *Toxicol.*, v. 219, p.41-52, 2006a.

ASARE, G.A.; PATERSON, A.C.; KEW, M.C., KHAN, S.; MOSSANDA, K.S. Iron free neoplastic nodules and hepatocellular carcinoma without cirrhosis in Wistar rats fed a diet high in iron *J.Path.*, v.208, p.82-90, 2006b.

ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis.* 13.ed. Arlington: AOAC, 1985.

BACON, B.R.; BRITTON, R.S. The pathology of hepatic iron overload: a free radical- mediated process? *Hepatol.*, v.11 p.127-137, 1990.

BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS NETO, A.G. *Manual de Técnicas para histologia normal e patológica.* Ed. EDART, São Paulo, 1976, 241p.

BERNOTTI, S.; SEIDMAN, E.; SINNETT, D.; BRUNET, S.; DIONNE, S.;

DELVIN, E.; LEVY, E. Inflammatory reaction without endogenous antioxidant response in CaCo-2 cells exposed to iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. *Am .J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, v.285, p.G898-G906, 2003.

BROWN, K.E.; KINTER, M.T.; OBERLEY, T.R.; FREEMAN, M.L.; FRIERSON, H.F.; RIDNOUR, L.A.; TAO, Y.; OBERLEY, L.W.; SPITZ, D.R. Enhanced γ-glutamyl transpeptidase expression and selective loss of CuZn superoxide

dismutase in hepatic iron overload. *Free Rad. Biol. Med.*, v.24(4), p.545-555, 1998.

BUSSAB, W.O.; MORETTIN, P.A. *Estatística Básica*. 5 ed. Ed. Saraiva. 526p, 2003.

BRUNET, S.; GUERTIN, F.; THIBAULT, L.; GAVINO, V.; DELVIN, E.; LEVY, E. Iron salicylate complex induces peroxidation, alters hepatic lipid profile and affects plasma lipoprotein composition. *Atherosclerosis*, v.129, p.159-168, 1997.

CANBAY, A.; FELDSTEIN, A.; HIGUCHI, H.; WERNEBURG, N.; GRAMBIHLER, A.; BROK, S.F.; GORES, G.J.; CLINIC, M.; ROCHESTER, M.N. Kupffer cell generated death ligands potentiate cholestatic liver injury. *Hepatol.*, v.38 (4), suppl.1, p.169A, 2003.

CECCARELLI, D.; GALLESI, D.; GIOVANNINI, F.; FERRALI, M.; MASINI, A. Relationship between free iron level and rat liver mitochondrial dysfunction in experimental dietary iron overload. *Bioch. Bioph. Res. Communic.*, v.209(1), p.53-59, 1995.

COCATO, M.L.; RÉ, M.I.; TRINDADE-NETO, M.A.; COLLI, C. Avaliação por métodos *in vitro* e *in vivo* da biodisponibilidade de sulfato ferroso microencapsulado. *Braz. J. Nutr.*, v.20 (3), p.239-247, 2007.

CONOVER, W.J. *Practical Nonparametric Statistics*. 3 ed. New York: John Wiley. 597p, 1999.

CRICHTON, R.R.; WILMET, S.; LEGSSYER, R.; WARD, R.J. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *J.Inorg.Biochm.*, v.91, p.9-18, 2002.

DE FREITAS, J.M.; MENEGHINI, R. Iron and its sensitive balance in the cell. *Mut. Res.*, v. 475, p.153-159, 2001.

DELZENNE, N. M.; DAUBIOUL, C.; NEYRINCK, M.; LASA, M.; TAPER, H. S. Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animals: review of biochemical events and future prospects. *Brit. J. Nutr.*, v. 87 (suppl. 2), p. S255-S259, 2002.

DELZENNE, N.M.; CANI, P.D.; NEYRINCK, A.M. Modulation of glucagons like-peptide 1 and energy metabolism by inulin and oligofructose: experimental data. *J. Nutr.*, v.137, p.2547S-2551S, 2007.

DEUGNIER, Y.; BRISSOT, P.; LORÉAL, O. Iron and the liver: Update 2008. *J. Hepatol.*, v.48, p.S113-123, 2008.

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.

FAIRWEATHER-TAIT, S. Iron Biochemistry. In: Iron Nutritional and physiological significance. The report of the British Nutrition Foundation's Task Force. London: Chapman e Hall, 1995.

FILISETTI, T.M.C.C.; LOBO, A.R. Fibra alimentar e seu efeito na biodisponibilidade de minerais. 2ª; Ed. Barueri:Manole, 2006, p.175-215.

FISCHER, J.G.; GLAUERT, H.P.; YIN, T.; REEVES-SWEENEY, M.L.; LARMONIER, N.; BLACK, M.C. Moderate iron overload enhances lipid peroxidation in livers of rats, but does not affect NF-kB activation induced by the peroxisome proliferator, Wy-14,643. *J. Nutr.*, v.132, p.2525-2531, 2002.

FLOHÉ, L.; ÖING, F. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol.*, v.105, p.93-104, 1984.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, v.226, p.497-509, 1957.

GALARIS, D.; PANTOPOULOS, K. Oxidative stress and iron homeostasis: Mechanistic and health aspects. *Critc. Rev. Clin. Laborat. Sci.*, v.45(1), p.1-23, 2008.

GANZ, T.; NEMETH, E. Iron imports.IV.Hepcidin and regulation of body iron metabolism. *Am.J.Physiol.Gastrontest.Liver Physiol.*, v. 290, p.G199-G203, 2006.

HALLBERG, L.; ROSSANDER, L.; SKANBERG, L. Phytates and inhibitory effects of bran on iron absorption in man. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.45, p.988-996, 1987.

HALLBERG, L.; BRUNE, M.; ROSSANDER, L. Iron absorption in man: ascorbic-acid and dose-dependent inhibition by phytate. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.49, p.140-144, 1989.

HALLBERG, L.; HULTÉN, L.; GRAMATKOVSKY, E. Iron absorption from the whole diet in man: how effective is the regulation of iron absorption? *Am. J. Clin. Nutr.*, v.66, p.347-356, 1997.

HURREL, R.F.; JUILLERAT, M.A.; REDDY, M.B.; LYNCH, S.R.; DASSENKO, S.A.; COOK, J.D. Soy protein, phytate, and iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.56, p.573-578, 1992.

INSTITUTE ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3. ed. São Paulo, 1985. v.1, p.533.

INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc, 2000. 800p. Disponível em http://www.nap.edu/openbook/030907/html. Acesso em 12 de setembro de 2007.

ITAYA, N.M.; CARVALHO, M.A.M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, C.L. Fructosyl transferase and hydrolase activities i rizophores and tuberous roots upon growth of *Polymnia sonchifolia* (Asteracea). *Phys. Plant.*, v.116, p.451-459, 2002.

JENAB, M.; THOMPSON, L.U. Phytic acid in wheat bran affects colon morphology cell differentiation and apoptosis. *Carcinogenesis*, v.21(8), p.1547-1552, 2000.

KNUTSON, M.; WESSLING-RESNICK, M. Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Crit. Rev. Bioch. Mol. Biol.*, v. 38, n.1, p.61-88, 2003.

LE, N.T.V.; RICHARDSON, D.R. The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastics cells. *Bioch.Bioph. Acta*, v.1603, p.31-46, 2002.

LEE, S.H.; PARK, H.J.; CHUN, .K.; CHO, S.Y.; JUNG, H.J.; CHO, S.M.; KIM, D.Y.; KANG, M.S.; LILLEHOJ, H.S. Dietary phytic acid improves serum and hepatic lipid levels in aged ICR mice fed a high-cholesterol diet. *Nutr. Res.*, v. 27, p.505-510, 2007.

LOBO, A.R.; COLLI, C.; ALVARES, E.P.; FILISETTI, T.M.C.C. Effects of fructans-containing yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp e Endl.) flour on caecum mucosal morphometry, calcium and magnesium balance and bone calcium retention in growing rats. *Brit. J. Nutr.,* v.97, p.766-785, 2007.

LOPEZ, H.W.; COUDRAY, C.; BELLANGER, J.; YOUNES, H.; DEMIGNÉ, C.; RÉMÉSY, C.. Intestinal fermentation lessens the inhibitory effects of phytic acid on mineral utilization in rats. *J. Nutr.*, v.128, p.1192-1198, 1998.

LOPEZ, H.W.; COUDRAY, C.; LEVRAT-VERNY, M.A.; FEILET-COUDRAY, C.; DEMIGNÉ, C.; RÉMÉSY, C. Fructooligosaccharides enhance mineral apparent absorption and counteract the deleterius effects of phytic acid on mineral homeostatic in rats. *J. Nutr. Biochem.*, v.11, p.500-508, 2000.

MATÉS, J.M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; CASTRO, I.N. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.*, v.32, n.8, p.595-603, 1999.

MONTGOMERY, D.C. *Design and Analysis of Experiments*, 5ª ed. New York John Wiley. 684p, 2001.

MOREIRA, A.V.B.; MANCINI FILHO, J. Atividade antioxidante das especiarias mostarda, canela e erva-doce, em sistemas aquoso e lipídico. *Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.*, v.25, p.45-60, 2003.

MURAOKA, S.; MIURA, T. Inhibition of xantina oxidase by phytic acid and its antioxidative action. *Life Sci.*, v.74, p.1691-1700, 2004.

NEYRINCK, A.M.; ALEXIOU, H; DELZENNE, N.M. Kupffer cell activity is involved in the hepatoprotective effect of dietary oligofructose in rats with endotoxic shock. *J. Nutr.*, v.134(5), p.1124-1129, 2004.

OHTA, AT.; OHTSUKI, M.; UEHARA, M.; HOSONO, A.; HIRAYAMA, M.; ADACHI, T.; HARA, H. Dietary fructooligosacharides prefent postgastrectomy anemia and osteopenia in rats. *J. Nutr.*, v.128, p.485-490, 1998.

ONOMI, S.; OKASAKI, Y.; KATAYAMA, T. Effect of dietary level of phytic acid and serum lipid status in rats fed a high-sucrose diet. *Biosci. Biotech. Bioch.*, v.68(6), p.1379-1381, 2004.

POLTRONIERI, F.; ARÊAS, J.A.G.; COLLI, C. Effect of iron bioavailability in chickpea (*Cicer arietinum L.*). *Food Chem.*, v.70, p.175-180, 2000

RAMM, G.A.; RUDDELL, R.G. Hepatotoxicity of iron overload: Mechanisms of iron –induced hepatic fibrogenesis. *Semin. Liver Dis.*, v.25(4), p.433-449, 2005.

RASCHKA, L.; DANIEL, H. Mechanisms underlying the effects of inulin-type fructans on calcium absorption in the large intestine of rats. *Bone*, v.37, p.728-735, 2005.

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

RÉMÉSY, C.; LEVRAT, M.A.; GAMET, L.; DEMIGNÉ, C. Cecal fermentations in rats fed oligosaccharides (inulin) are modulated by dietary calcium level. *Am. J. Phys.*, v.264, p.G855-G862, 1993.

ROBERFROID, M. Prebiotics: the concept revisited. *J. Nutr.* V.137 (Suppl.2), p.830S-837S, 2007.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. *Mem. Inst. Butantan*, v.20, p.315-28, 1947.

SCHOLZ-AHRENS, K.E.; ADE, P.; MASTEN, B.; WEBER, P.; TIMM, W.; ASIL, T.; GLUER, C.C; SCHREZENMEIR, J. Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone content, and bone structure. *J. Nutr.*, v.137, p.838S-846S, 2007.

SCHRADER, M.; FAHIMI, H.D. Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochem. Cell Biol.*, v.122, p.383-393, 2004.

SEIFERT, S.; WATZL, B. Inulin and oligofructose: Review of experimental data on immune modulation. *J. Nutr.*, v.137, p.2563S-2567S, 2007.

SHARMA, G.; SINGH, R.P.; AGARWAL, R. Growth inhibitory and apoptotic effects of inositol hexaphosphate in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP-C1) cells. *Int. J. Oncol.*, v.23, p.1413-1418, 2003.

STAL, P.; HULTCRANTZ, R.; MOLLER, L.; ERIKSSON, L.C. The effects of dietary iron on initiation and promotion in chemical epatocarcinogenesis. *Hepatology*, v.21, p.521-528, 1995.

STINCHCOMBE S., BUCHMANN, A., BOCK, K.W. AND SCHWARZ, M., Inhibition of apoptosis during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated tumour promotion in rat liver. *Carcinogenesis*, v.16, p.1271-1275,1995.

SZKUDELSKI, T. Phytic acid-induced metabolic changes in the rat. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, v.89, p.397-402, 2005.

TAKO, E.; GLAHN, R.P.; WELCH, R.M.; LEI, X.; YASUDA, K.; MILLER, D.D. Dietary inulin affects the expression of intestinal enterocyte iron transporters, receptors and storage protein and alters the microbiota in the pig intestine. *Br. J. Nutr.*, v.99 (3), p.472-480, 2008.

TORRE, M.; RODRIGUEZ, A.R.; SAURA-CALIXTO, F. Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v.1 (1), p.1-22, 1991.

TROADEC, M.B.; COURSELAUD, B.; DÉTIVAUD, L.; HAZIZA-PIGEON, C.; LEROYER, P.; BRISSOT, P.; LORÉAL, O. Iron overload promotes Cyclin D1 expression and alters cell cycle in mouse hepatocytes. *J. Hepat.*, v.44, p.391-399, 2006.

TURBINO-RIBEIRO, S.M.L.; SILVA, M.E.; CHIANCA, D.A.; PAULA, H.; CARDOSO, L.M.; COLOMBARI, E.; PEDROSA, M.L. Iron overloadin hypercholesterolemic rats affects iron homeostasis and serum lipids but not blood pressure. *J. Nutr.*, v.133, p.15-20, 2003.

VANDERKERKEN, K.; BOUWENS, L.; ROOIJEN, N.V.; VAN DEN BERG, K.; BAEKELAND, M.; WISSE, E. The role of kupffer cells in the differentiation process of hepatic natural killer cells. *Hepatol.*, v.22, p.283-290, 1995.

VAYENAS, D.V.; REPANTI, M.; VASSILOPOULOS, A.; PAPANASTASIOU, D.A. Influence of iron overload on manganese, zinc, and copper concentration

in rat tissues in vivo: study of liver, spleen, and brain. *Int J Clin Lab Res.*, v.28(3), p.183-186, 1998.

VUCENIK, I.; SHANSUDDIN A.M. Protection against cancer by dietary IP6 and inositol. *Nutr. Cancer*, v. 55, n.2, p.109-125, 2006.

WELCH, K.D.; DAVIS, T.Z.; VAN EDEN, M.E.; AUST, S.D. Deleterius iron-mediated oxidation of biomolecules. *Free Rad. Biol Med.*, v.32, n.7, p.577-583, 2002.

WENDEL, A. Glutathione Peroxidase. *Methods Enzimol.*, v.77, p.325-333, 1981.

WILLIAMS, H.L.; CONRAD, M.E. Problems in the measurement of iron binding capacity in serum. *Clin. Chim. Acta,* v.37, p.131-40, 1972.

YUANGKLANG, C.; WENSING, Th.; LEMMENS, A.G.; JITTAKHOT, S.; BEYNEN, A.C. Effect of sodium phytate supplementation on fat digestion and cholesterol metabolism in female rats. *J. Anim. Phys. Anim. Nutr.*., v.89, p.373-378, 2005.

World Health Organization. Vitamin and Mineral Nutrition Information System (VMNIS). WHO database global on anaemia. Disponível em http://who.int/vmnis/anaemia/data/database/countries/bra_ida.pdf. Acesso em 13 de setembro de 2007.

Tabela 1. Formulação das dietas experimentais[1]

Ingredientes (%)	Grupos Experimentais[2]				
	Controle	SBC	SBC+FY	SBC+FIT	SBC+FY+FIT
Caseína (78% proteina) [3]	21,79	21,79	21,79	21,79	21,79
Fibras	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Óleo de soja[4]	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00
L-cistina	0,30	0,30	0,30	0,30	0,03
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Mistura vitamínica[1]	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Mistura salina modificada[1]	3,50	3,50	3,50	3,50	3,05
Sacarose	10,00	10,00	-	10,00	-
Amido	51,15	51,15	45,15	51,15	45,15
Farinha de yacon (18% FOS)[5]	-	-	20,00	-	20,00
Ácido fítico[6]	-			0,60	0,60

[1] De acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* (Reeves *et al.*, 1993) com modificações: $FeSO_4$ foi substituído por $FeSO_4$ microencapsulado em todas as dietas; Grupo Controle: 35mg Fe/kg dieta; Grupos com moderada sobrecarga de Fe: 500mg Fe/kg dieta; Sacarose e parte do amido foram substituídos por farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) na formulação das dietas contendo frutanos;

[2] SBC: Moderada sobrecarga de Fe; SBC+FY: Moderada sobrecarga de Fe + farinha de yacon; SBC+FIT: Moderada sobrecarga de Fe + fitato; SBC+FY+FIT: Moderada sobrecarga de Fe + Farinha de yacon + fitato;

[3] O conteúdo de proteína na caseína foi determinado pelo método de micro-Kjeldahl usando fator de correção de 6,25 (AOAC., 1985);

[4] Cargill Agrícola S/A (Mairinque, São Paulo, Brasil);

[5] 18% de frutanos totais; 28,3% sacarose; 15,7% frutose;

[6] Hexafosfato de mioinositol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)

Tabela 2. Consumo de ração, ganho de peso, consumo de minerais e excreção fecal de minerais de ratos alimentados com rações controle ou com moderada sobrecarga de Fe suplementadas ou não com farinha de yacon e/ou fitato por 92 dias

Parâmetros	Grupos Experimentais[1]					
	Controle	SBC	SBC+FY	SBC+FIT	SBC+FY+FIT	p*
Consumo total de ração (g)	1372,1 ± 150,3	1421,0 ± 93,9	1336,3 ± 155,4	1437,8 ± 136,1	1443,6 ± 119,5	ns**
Ganho de peso (g)	293,9 ± 33,0	288,9 ± 23,4	270,3 ± 37,0	290,1 ± 12,0	289,7 ± 31,8	ns
Eficiência alimentar	0,21 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,01	ns
Consumo de Fe (g/dia)	0,8 ± 0,1[a]	10,5 ± 1,4[b]	9,0 ± 1,0[b,c]	8,6 ± 0,5[c]	10,0 ± 1,4[b,c]	0,000
Consumo de Cu (g/dia)	0,09 ± 0,01[a]	0,09 ± 0,01[a]	0,10 ± 0,01[a,b]	0,09 ± 0,01[a]	0,11 ± 0,01[b]	0,000
Consumo de Zn (g/dia)	0,55 ± 0,05[a]	0,62 ± 0,03[a,b]	0,61 ± 0,06[a,b]	0,64 ± 0,05[b]	0,58 ± 0,04[a,b]	0,015
Umidade das fezes (%)	28,3 ± 3,9[a]	33,1 ± 2,3[a]	39,7 ± 4,7[b]	32,2 ± 4,0[a]	46,5 ± 1,7[c]	0,000
Excreção fecal de Fe (mg)	0,7 ± 0,3[a]	4,3 ± 0,3[b]	3,3 ± 0,2[c]	4,1 ± 0,2[b]	3,3 ± 0,3[c]	0,000
Excreção fecal de Cu (mg)	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	ns
Excreção fecal de Zn (mg)	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,1	ns
Absorção aparente (%)						
Fe	13,4 ± 1,2[a]	58,87 ± 4,9[b,c]	62,7 ± 5,5[b]	52,3 ± 2,0[c]	66,0 ± 4,8[b]	0,050
Cu	21,2 ± 6,3[a]	31,1 ± 10,4[a,b]	37,1 ± 6,8[b]	20,8 ± 9,0[a,b]	35,6 ± 10,1[a,b]	0,050
Zn	34,0 ± 9,0[a]	43,6 ± 18,0[a]	47,7 ± 9,3[a]	43,1 ± 4,3[a]	48,3 ± 10,5[a]	ns

Média ± D.P. (n = 7: Controle, SBC, SBC+FY, SBC+FY+FIT; n = 6: SBC+FIT); [1]Grupos: Controle; Moderada sobrecarga de Fe (SBC); SBC + Farinha de Yacon (SBC+FY); SBC + Fitato (SBC+FIT); SBC + Farinha de Yacon + Fitato (SBC+FY+FIT); Sobrescritos diferentes na mesma linha indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$); *versus* grupo Controle; **Diferença não significativa

Tabela 3. Parâmetros bioquímicos de ratos alimentados com rações controle ou com moderada sobrecarga de Fe suplementadas ou não com farinha de yacon e/ou fitato por 92 dias

Parâmetros	Grupos Experimentais[1]					
	Controle	SBC	SBC+FY	SBC+FIT	SBC+FY+FIT	p*
Fe (mg/dL)	161,67 ± 29,6	206,0 ± 80,0	195,9 ± 33,7	195,8 ± 42,8	216,6 ± 109,8	ns**
CTLF[2] (mg/dL)	405,0 ± 79,7	512,9 ± 171,7	484,0 ± 81,4	488,6 ± 62,3	506,4 ± 80,8	ns
Saturação de transferrina (%)	41,0 ± 9,0	41,0 ± 10,2	41,3 ± 9,11	40,1 ± 7,2	41,0 ± 14,6	ns
Colesterol (mg/dL)	67,4 ± 7,2[a]	48,1 ± 1,7[b]	51,6 ± 12,7[b]	62,2 ± 8,7[a,b]	54,9 ± 9,5[a,b]	0,002
Triacilglicerol (mg/dL)	119,9 ± 33,9[a]	87,1 ± 48,6[a,b]	71,6 ± 26,7[a,b]	96,0 ± 55,1[a,b]	58,7 ± 12,1[b]	0,047
HDL[3] (mg/dL)	44,29 ± 8,2	29,7 ± 11,5	37,57 ± 11,4	43,4 ± 10,4	41,29 ± 7,4	ns
VLDL[4] (mg/dL)	23,97 ± 6,8[a]	17,4 ± 9,7[a,b]	14,3 ± 5,4[a,b]	19,2 ± 11,0[a,b]	11,7 ± 2,4[b]	0,047
AST[5] (UI/L)	58,7 ± 26,7	82,1 ± 32,3	59,3 ± 15,2	43,4 ± 26,1	44,9 ± 19,3	0,055
ALT[6] (UI/L)	36,7 ± 14,7	36,0 ± 10,7	29,9 ± 8,3	26,4 ± 4,2	26,1 ± 6,3	ns

Média ± D.P. (n = 7: Controle, SBC, SBC+FY, SBC+FY+FIT; n = 6: SBC+FIT);

[1] Controle; Moderada sobrecarga de Fe (SBC); SBC + Farinha de Yacon (SBC+FY); SBC + Fitato (SBC+FIT); SBC + Farinha de Yacon + Fitato (SBC+FY+FIT);

[2]Capacidade Total de Ligação do Fe; [3]Lipoproteína de alta densidade; [4]Lipoproteína de muito baixa densidade; [5]Alanina aminotransferase; [6]Aspartato aminotransferase;

Sobrescritos diferentes na mesma linha indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$); * *versus* grupo Controle; **Diferença não significativa

Tabela 4. Concentração de minerais e atividade antioxidante no tecido hepático de ratos alimentados com rações controle ou com moderada sobrecarga de Fe suplementadas ou não com farinha de yacon e/ou fitato por 92 dias

Parâmetros	Grupos Experimentais [1]					
	Controle	SBC	SBC+FY	SBC+FIT	SBC+FY+FIT	p*
Peso do fígado (g)	16,1 ± 4,0	15,1 ± 2,3	15,1 ± 3,2	15,8 ± 2,0	16,6 ± 3,1	ns**
Peso fígado/peso corporal (%)	4,3 ± 1,0	4,1 ± 0,4	4,3 ± 0,9	4,3 ± 0,7	4,5 ± 1,0	ns
Fe (mg/g fígado)	0,38 ± 0,07[a]	0,69 ± 0,22[b,c]	0,49 ± 0,11[a,b]	0,82 ± 0,16[c]	0,63 ± 0,25[a,b,c]	0,002
Cu (µg/g fígado)	15,2 ± 2,6	12,7 ± 2,0	13,2 ± 2,3	13,6 ± 1,4	13,0 ± 3,2	ns
Zn (µg/g fígado)	90,1 ± 25,9	73,6 ± 13,3	83,6 ± 18,7	79,0 ± 20,8	66,4 ± 11,8	ns
GPx[2] (mM/min/mg proteína)	121,2 ± 38,9[a]	803,6 ± 178,4[b]	596,0 ± 195,9[b,c]	383,3 ± 101,0[c]	380,6 ± 122,2[c]	0,000
CAT[3] (µM/min/mg proteína)	6,1 ± 0,8[a]	4,7 ± 0,8[a,b]	4,8 ± 1,0[a,b]	5,2 ± 1,1[a,b]	4,5 ± 0,8[b]	0,036
MnSOD[4] (U/mg proteína)	9,7 ± 3,2	12,8 ± 2,4	11,2 ± 3,1	11,8 ± 2,9	11,1 ± 4,7	ns
CuZnSOD[5] (U/mg proteína)	6,3 ± 1,7	10,5 ± 4,2	13,1 ± 7,7	6,9 ± 2,4	11,1 ± 3,5	ns
Vitamina E (µM/g)	594,4 ± 158,1	624,3 ± 101,9	607,2 ± 129,9	616,7 ± 104,1	659,1 ± 171,3	ns

Média ± D.P. (n = 7: Controle, SBC, SBC+FY, SBC+FY+FIT; n = 6: SBC+FIT);

[1] Controle; Moderada sobrecarga de Fe (SBC); SBC + Farinha de Yacon (SBC+FY); SBC + Fitato (SBC+FIT); SBC + Farinha de Yacon + Fitato (SBC+FY+FIT);

[2] Glutationa peroxidase; [3] Catalase; [4] Mn superóxido dismutase; [5] Cu-Zn superóxido dismutase;

Sobrescritos diferentes na mesma linha indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$); * *versus* grupo Controle; **Diferença não significativa

Tabela 5. Número de corpúsculos apoptóticos e células de Kupffer com depósito de hemossiderina no fígado de ratos alimentados com rações controle e rações com moderada sobrecarga de Fe suplementadas ou não com farinha de yacon e/ou fitato por 92 dias

Parâmetros	Grupos experimentais[1]					
	Controle	SBC	SBC+FY	SBC+FIT	SBC+FY+FIT	p*
Corpúsculos apoptóticos (No. corpúsc/mm^2)	0,1 ± 0,06[a]	0,29 ± 0,05[b]	0,48 ± 0,14[b]	0,27 ± 0,07[b]	0,42 ± 0,18[b]	0,000
	Células de Kupffer com depósito de hemossiderina					
No. de animais por grupo	7	7	7	6	7	
Índice 0**	7/7 (100%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/6 (0%)	2/7 (29%)	0,000
Índice 1***	0/7 (0%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	6/6 (100%)	5/7 (71%)	0,000

Média ± D.P. (n = 7: Controle, SBC, SBC+FY, SBC+FY+FIT; n = 6: SBC+FIT);

[1]SBC: Moderada sobrecarga de Fe; SBC+FY: Moderada sobrecarga de Fe + farinha de yacon; SBC+FIT: Moderada sobrecarga de Fe + fitato; SBC+FY+FIT: Moderada sobrecarga de Fe+ Farinha de yacon + fitato;

Sobrescritos diferentes na mesma linha indicam valores estatisticamente diferentes ($p<0.05$). * *versus* grupo Controle.

**Ausência de depósito de hemossiderina;

*** presença de acima de 2 células de Kupffer com depósito de hemossiderina por campo com aumento de 400 x

Figura 1.

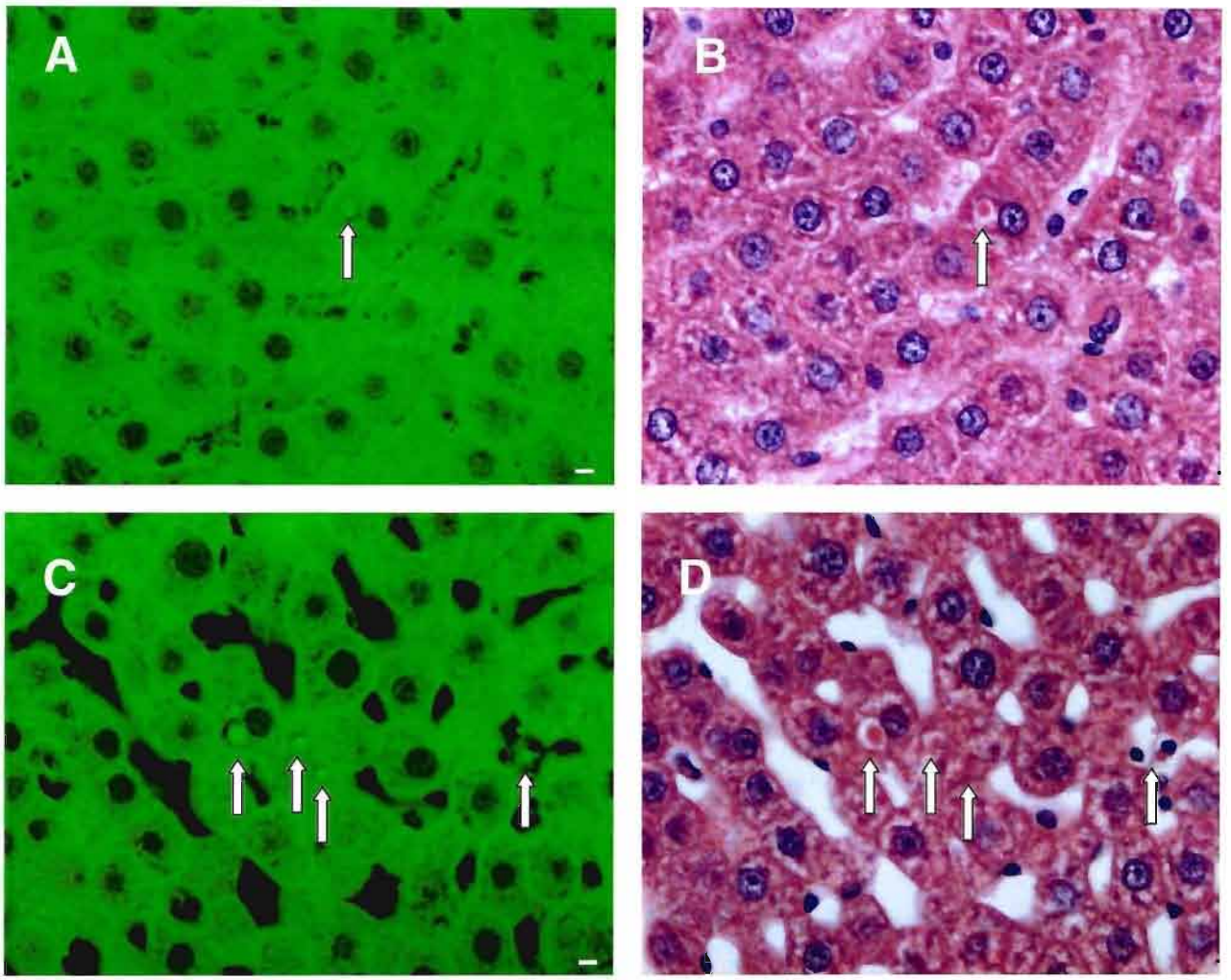
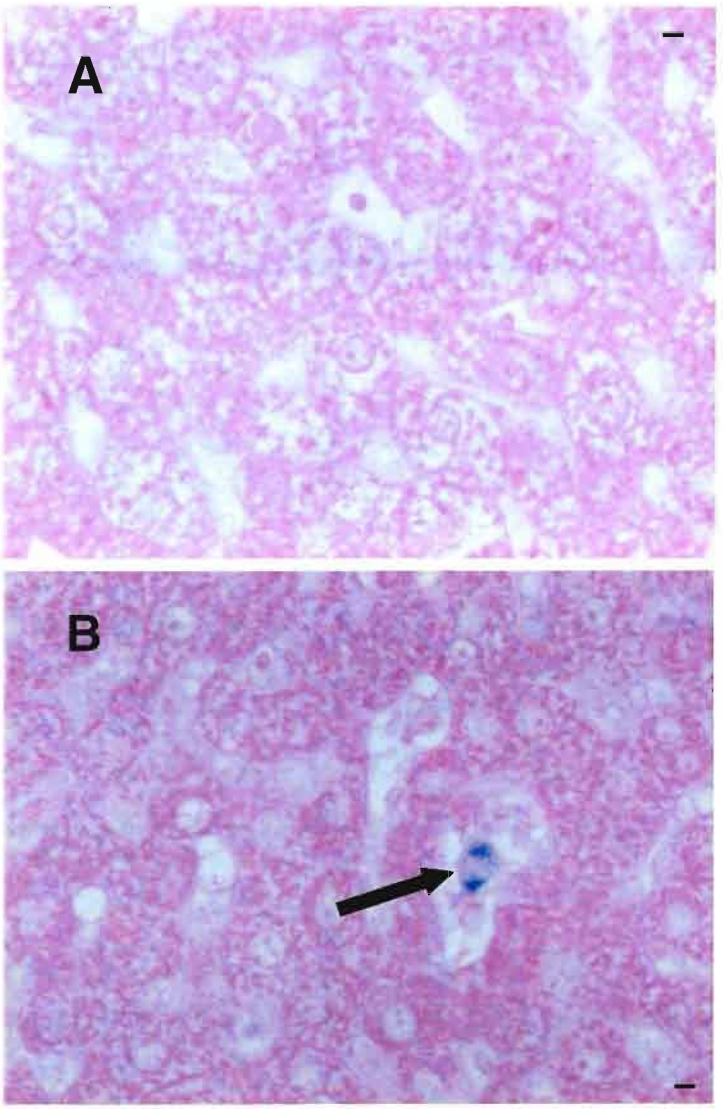


Figura 2.



LEGENDAS DAS FIGURAS:

Figura 1

Cortes histológicos do fígado: A) de um animal do grupo controle, mostrando um corpúsculo apoptótico (seta) (microscopia de fluorescência); B) o mesmo corte histológico da figura **1**A (H&E); C) de um animal do grupo SBC, mostrando corpúsculos apoptóticos (setas) (microscopia de fluorescência); D) o mesmo corte histológico da figura Figura **1**C (H&E). Escala da barra = 5µm.

Figura 2

A) corte histológico do fígado de um animal do grupo controle mostrando ausência de depósito de hemossiderina (H&E); B) depósito de hemossiderina ao redor das células de Kupffer no fígado de um animal do grupo SBC (H&E). Escala da barra = 5 µm.

CAPÍTULO 2

Efeitos da moderada sobrecarga de Fe e da sua interação com FOS da farinha de yacon e/ou fitato no metabolismo ósseo. Estudo em ratos.

RESUMO

Em modelos de hemocromatose hereditária (HH) ou em sobrecarga de Fe secundária, como as que ocorrem no alcoolismo crônico e na talassemia, o excesso de Fe no organismo causa alterações no metabolismo ósseo devido ao desequilíbrio entre a formação e a reabsorção ósseas, levando a doenças como osteoporose, osteomalácia e osteopenia. Entretanto, não é conhecido se estas alterações ocorrem na exposição do organismo à moderada sobrecarga de Fe e qual o efeito no metabolismo ósseo quando da interação desta com inibidores e facilitadores da absorção do Fe. O objetivo do presente estudo foi avaliar, em ratos, o efeito da moderada sobrecarga de Fe e da sua interação com farinha de yacon rica em frutanos, e/ou fitato, reconhecidos inibidores e facilitadores da absorção mineral em parâmetros do metabolismo e força ósseas. Para este fim, foram avaliadas a absorção aparente de Fe e Ca e a concentração destes minerais nos ossos, a concentração urinária da deoxipiridinolina, a concentração plasmática da osteocalcina (marcadores de reabsorção e formação ósseas, respectivamente) e a força óssea. Os resultados obtidos demonstraram que a moderada sobrecarga de Fe e a sua interação com farinha de yacon e/ou fitato não alterou os parâmetros relacionados ao metabolismo e força ósseos. Entretanto, como observado em outros estudos, a presença da farinha de yacon nas dietas aumentou a absorção aparente de Ca.

INTRODUÇÃO

Em desordens inerentes ao metabolismo do Fe, como na hemocromatose herediária (HH), ou em sobrecarga de Fe secundária, como na

que ocorre nas talassemias ou nas doenças renais crônicas, o estresse oxidativo gerado pelo excesso de Fe tem sido relacionado a alterações no metabolismo ósseo. Tais alterações são resultantes de processos que prejudicam o balanço entre a formação e a reabsorção ósseas, levando a patologias como osteomalácia (MATSUSHIMA *et al.*, 2003) e osteoporose (ANGELOPOULOS *et al.*, 2006). Um componente central destas patologias está relacionado ao desequilíbrio entre osteoblastos e osteoclastos, dois elementos chave do *turnover* ósseo (LEEMING *et al.*, 2006).

O osso é composto por fibras colágenas tipo I e cristais de hidroxiapatita $[3Ca_3(PO_4)_2].(OH_2)]$. Em função destas diferenças, este tecido pode ser dividido nos compartimentos trabecular e cortical. O compartimento trabecular (a parte central) é composto de finas trabéculas, formando um osso robusto, porém levemente flexível, enquanto o compartimento cortical (a camada externa) é composto de uma densa camada de tecido calcificado (LEEMING *et al.*, 2006). Durante os processos de remodelamento ósseo, osteoblastos e osteoclastos (envolvidos nos processos de formação e reabsorção ósseas, respectivamente) se interconectam nas Unidades Multicelulares Básicas (BMU) para degradar o osso velho e recolocar no seu lugar a mesma quantidade de osso novo (LEEMING *et al.*, 2006). Entretanto, o excesso de Fe pode prejudicar este balanço. Um dos mecanismos propostos é que, em excesso, o Fe leva à perda da vitamina C por peroxidação o que, por sua vez, diminui a síntese de colágeno, a diferenciação, a proliferação e a função dos osteoblastos (FRANCESCHI, 1992). Outro mecanismo proposto envolve a diminuição na secreção do hormônio paratireóide (PTH) que, por sua vez, tem sido relacionada a aumento na reabsorção óssea (DI STEFANO *et al.*, 2004). A alteração na razão entre osteoclastos e osteoblastos, como conseqüência, pode levar a alterações na força e na resistência ósseas (MANDALUNIS e UBIOS, 2005).

Em modelos animais sabe-se que a moderada sobrecarga de Fe induz a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) que levam ao aumento da peroxidação lipídica das membranas celulares (KNUTSON *et al.*, 2000; FISCHER *et al.*, 2002). Nos ossos, há evidências que estas espécies estão envolvidas na reabsorção óssea, com direta contribuição do radical superóxido

gerado nos osteoclastos, levando à degradação óssea (YANG *et al.*, 2001). Em modelo de moderada sobrecarga de Fe associada à idade, em ratas ovariectomizadas, Liu e colaboradores (2006) demonstraram que o depósito de Fe associado com a idade pode desempenhar significativo papel no desenvolvimento de perda óssea associada com a deficiência de estrogênio. Entretanto, em animais sadios, não há relatos na literatura sobre exposição à moderada sobrecarga de Fe e alterações no metabolismo ósseo. Segundo a *American Dietetic Association* (ADA REPORTS, 2001), esta exposição poderia ocorrer em homens adultos que apresentam de adequados a elevados estoques de Fe corporal. Estes, ao consumirem alimentos fortificados com Fe, estariam sujeitos a risco de ingestão excessiva do mineral. No Brasil, onde a fortificação das farinhas de trigo e milho com Fe e ácido fólico tornou-se obrigatória a partir de 2002 (ANVISA, 2007), atingindo inespecificamente todos os grupos populacionais, inclusive aqueles com os estoques corporais de Fe repletos, esta preocupação começa a ser delineada.

Entretanto, a biodisponibilidade do Fe é modulada por vários componentes da dieta os quais podem afetá-la positiva ou negativamente. Muitos destes componentes estão associados com os polissacarídeos das paredes celulares (fibra dietética, DF) (FILISETTI e LOBO, 2006) dos alimentos vegetais. Neste contexto, os fitatos, por quelarem cátions divalentes, tais como o Fe, no lúmen intestinal, e diminuírem a sua solubilidade são, reconhecidamente, os interferentes ligados à diminuição da biodisponibilidade desse mineral (HALLBERG *et al.*, 1987; HURREL *et al.*, 1992). Entretanto, em anos recentes, este composto também tem sido relacionado a efeitos sistêmicos, com comprovada propriedade antioxidante (JENAB e THOMPSON, 1998).

Por outro lado, atualmente, um grupo de compostos que tem recebido considerável atenção em função de seus efeitos positivos na biodisponibilidade de minerais são os carboidratos não digeríveis (inulina e frutooligossacarídeos). Estes, por serem resistentes à digestão no intestino delgado, são fermentados no intestino grosso, diminuindo o pH deste órgão e criando um ambiente favorável para esta absorção (RÉMÉSY *et al.*, 1993; SCHOLZ-AHRENS *et al.*, 2007; LOBO *et al.*, 2007) e, como conseqüência, afetando o metabolismo

ósseo (LOBO *et al.*, 2006; LOBO *et al.*, 2007). Ainda, a fermentação intestinal gerada pelos frutoologigossacarídeos (FOS) demonstrou diminuir os efeitos inibitórios do ácido fítico na utilização do Fe (LOPEZ *et al.*, 2000).

Frutanos tipo-inulina são comumente encontrados em quase todas as espécies da família Asteracea, muitas das quais de importância econômica, como *Chicorium intybus* e *Helianthus tuberosus* (CARVALHO e FIGUEIREDO-RIBEIRO, 2001). Yacon (*Smallanthus sonchifolius* [Poepp e Endl.] H. Robinson, Asteracea) é uma raiz tuberosa andina, que acumula elevadas quantidades de frutanos com baixo grau de polimerização (DP < 10, FOS) (ITAYA *et al.*, 2002) e tem sido cultivado no sudeste do Brasil desde 1991, entre agosto e setembro, alcançando acima de 100 t/ha (VILHENA *et al.*, 2000). Estudos realizados por Lobo e colaboradores (2007) demonstraram que ratos alimentados com dietas com farinha de yacon rica em frutanos tiveram aumento no balanço de Ca e Mg, levando à maior retenção mineral óssea e força mecânica.

Entretanto, no nosso conhecimento, não existem relatos na literatura sobre efeitos no metabolismo ósseo causados pela interação entre a moderada sobrecarga de Fe e fitato e/ou FOS. Desta forma, o objetivo do presente trabalho é, de um lado, avaliar se a moderada sobrecarga de Fe, em ratos sadios, altera a concentração de Fe e Ca no osso e induz a alterações na força e no metabolismo ósseos e, de outro, avaliar se estes efeitos podem ser modificados quando ocorre a interação entre esta e os FOS da farinha de yacon e/ou fitato.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e dietas

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Trinta e quatro ratos Wistar machos, pesando 49,3 + 3,9 g, foram obtidos a partir da colônia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os ratos foram alojados

individualmente em gaiolas semimetabólicas de aço inoxidável, sob temperatura controlada (22 ± 2°C) e umidade relativa de 55 ± 10%, com um ciclo claro/escuro de 12h (luzes acesas das 8:00 às 20:00h). Uma dieta modificada AIN-93G (REEVES *et al.*, 1993) foi utilizada para o estudo (Tabela 1). Cinco dietas foram preparadas (uma dieta controle AIN93G e quatro dietas com moderada sobrecarga Fe) e suplementadas com $FeSO4.7H_2O$ microencapsulado (COCATO *et al.*, 2007) obtido da empresa Fermavi Eletroquímica Ltda. (São Paulo, Brasil). Três das quatro dietas com sobrecarga de Fe foram suplementadas com farinha de yacon rica em frutanos (FOS) e/ou fitato (hexafosfato de mioinositol - Sigma-Aldrich®). As quantidades de FOS e açúcares solúveis presentes nas dietas foram subtraídas das de sacarose e amido. Após a preparação, amostras das rações foram recolhidas para análise da composição química e armazenadas (acerca de 4°C) até a sua utilização.

Protocolo experimental

Para aclimatação, os animais foram alimentados por cinco dias com a dieta controle AIN-93G e, então, foram aleatoriamente distribuídos nos cinco grupos formados (n = 7 por grupo) de tal forma que o peso médio de cada grupo foi igual (Tabela 2). Os ratos tiveram livre acesso à água desmineralizada e às dietas com adequada (grupo controle) ou moderadamente elevada concentração de ferro (grupos sobrecarga de Fe) (45 e 550mg de ferro/kg de ração, respectivamente), por 92 dias. Adicionalmente, os grupos com moderada sobrecarga de ferro foram suplementados com farinha de yacon rica em FOS e/ou fitato, nas concentrações de 3,6% FOS/kg dieta e 0,6% fitato/kg dieta. Os grupos foram assim denominados: controle, sobrecarga de ferro (SBC), sobrecarga de ferro + farinha de yacon (SBC+FY), sobrecarga de ferro + fitato (SBC+FIT), sobrecarga de ferro + farinha yacon + fitato (SBC+FY+FIT). O consumo de ração foi avaliado diariamente e a pesagem dos animais foi efetuada a cada três dias. As fezes foram coletadas nos 5 dias anteriores ao sacrifício (do 82° ao 87° dia), reunidas e armazenadas a -20 °C até a análise. A umidade das fezes foi determinada por gravimetria,

após o aquecimento das mesmas a 105 °C. A urina foi coletada em frascos escuros durante as 24h antecedentes ao sacrifício e armazenada a -20 °C até o momento da análise. Ao término do ensaio, os animais foram anestesiados por injeção intraperitonial com uma mistura de cloridrato de quetamina (10 mg/kg), cloridrato de xilazina (25 mg/kg), acepromazina (2 mg/ml) e H_2O desmineralizada, na proporção de 1.0:1.0: 0.4:1.6, respectivamente. O sangue foi coletado da veia cava inferior com K_3EDTA a 10%. Os animais foram, então, sacrificados, as patas foram removidas e as tíbias foram descarnadas, pesadas e estocadas a -20 °C até a realização das análises minerais e dos testes mecânicos, considerando que o estoque a -20 °C não altera as propriedades mecânicas dos ossos (SEDLIN e HIRSCH, 1966).

Composição química das dietas experimentais

Os seguintes componentes das dietas foram determinados: umidade, cinzas, lipídios totais (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1995) e proteínas pelo método de micro-Kjeldahl (AOAC, 1985) (fator de conversão de 6,25). As concentrações Ca e Fe foram determinadas por AAS, de acordo com o método da AOAC (1985) (AAnalyst 100, Perkin Elmer, USA), empregando lâmpadas de catodo oco com comprimentos de onda de 422,7 e 283,4nm, respectivamente, e fendas de 0,7 e 0,2 nm, respectivamente, após digestão úmida com HNO3: H2O2 (5:1) e adição de 0,1% (p/v) de lantânio como La_2O_3 (para as análises de Ca). As soluções padrão foram preparadas por diluição dos padrões de $CaCl_2$ e $FeCl_3$ (Tritisol, Merck, Darmstadt, Alemanha).

Balanço mineral

Fezes secas foram trituradas e amostras foram utilizadas para as análises de Ca e Fe. A absorção aparente foi calculada através da seguinte equação:

Absorção aparente (%) = 100X(ingestão – excreção fecal)/ingestão

Concentração de minerais e avaliação biomecânica nos ossos

As concentrações de Ca e Fe nas tíbias previamente secas (105°C, 12 h) foram determinadas. As propriedades biomecânicas dos ossos (força máxima, limite elástico, rigidez, resiliência e energia absorvida) foram avaliadas na região média da diáfise das tíbias direitas, utilizando teste de flexão de três pontos, tal como previamente descrito (LOBO *et al.*, 2006; LOBO *et al.*, 2007). Os ossos foram descongelados à temperatura ambiente e uma solução salina foi aplicada para impedir o ressecamento dos mesmos. O comprimento e o diâmetro tibiais (região média da diáfise) foram medidos por um paquímetro digital (Mitutoyo Sul América Ltda, Suzano, São Paulo, Brasil). O centro dos ossos foi fraturado sob as seguintes condições: 16mm de distância entre os apoios , 0,2mm/s de velocidade e 25kg de carga.

Determinação da osteocalcina plasmática

A concentração da osteocalcina plasmática foi determinada utilizando *kit* comercial ELISA (Metra Biosystems Inc., Palo Alto, California, USA).

Determinação da creatinina e da deoxipiridinolina (DPD) urinárias

A determinação da creatinina foi realizada imediatamente após a coleta da urina, utilizando *kit* Labtest Diagnóstica S/A. Após descongelamento da urina, a DPD foi determinada utilizando *kit* ELISA, da Metra Biosystems Inc. (Palo Alto, California, USA). A DPD foi expressa em nmolDPD/mmol de creatinina.

Análise estatística

A análise dos dados foi feita com o pacote estatístico *SPSS* (*Statistical Package for Social Sciences*) *for Windows* versão 11.5. Todos os testes foram realizados assumindo um nível de significância α=5%. Inicialmente foi utilizada a estatística descritiva para avaliar a média e desvio-padrão das variáveis de interesse. A medida de correlação de Pearson (BUSSAB e MORETTIN, 2001) foi calculada para medir o grau de associação entre algumas variáveis. As comparações das médias das variáveis, entre os cinco grupos (Controle, SBC, SBC+FOS, SBC+FIT e SBC+FOS+FIT), foram realizadas através da ANOVA (MONTGOMERY, 2001). Para as diferenças significativas, o *Post-Hoc* de Tukey foi aplicado para identificar onde ocorrem essas diferenças.

RESULTADOS

Composição química das dietas experimentais

A análise química das dietas mostrou concentrações de Fe de 48,8; 575,7; 585,5; 556,1 e 604,2 mg Fe/kg na dieta controle, SBC, SBC+FY, SBC+FIT e SBC+FY+FIT, respectivamente. Nenhuma diferença significativa foi encontrada na concentração de Ca das dietas (6,9; 7,3; 9,2; 8,0 e 9,2 g Ca/kg nos grupos controle, SBC, SBC+FY, SBC+FIT e SBC+FY+FIT, respectivamente) ou nas concentrações de proteínas e lipídeos (18% e 6%, respectivamente, para todos os grupos).

Ganho de peso e consumo alimentar

A ingestão alimentar e o ganho de peso não foram alterados ($p>0,05$) pela concentração de Fe na dieta ou pela presença de FOS e/ou fitato (Tabela 2). Como esperado, os animais que consumiram rações com sobrecarga de Fe tiveram significativo aumento no consumo deste mineral ($p=0,000$) com relação ao grupo controle. Não houve diferença no consumo de Ca entre o grupo SBC e o grupo controle, mas houve menor

consumo de Ca para o grupo SBC quando comparado aos grupos SBC+FY e SBC+FY+FIT ($p<0,05$) e maior consumo de Ca pelos grupos SBC+FY, SBC+FIT e SBC+FY+FIT com relação ao grupo controle ($p<0,05$) (Tabela 2).

Excreção de minerais nas fezes e absorção aparente

O aumento do consumo de Fe pelos grupos com SBC na dieta resultou em aumento na excreção fecal destes minerais, em todos os grupos quando comparados ao controle ($p=0,000$) (Tabela 2). Houve significativo aumento na excreção fecal de Ca do grupo SBC quando comparado ao controle ($p=0,000$). Quando houve a interação entre SBC+FIT, a excreção fecal deste mineral retornou aos níveis do observado no grupo controle. Por outro lado, na interação entre a moderada sobrecarga de Fe e a farinha de yacon rica em FOS (grupos SBC+FY e SBC+FY+FIT) houve significativa diminuição da excreção fecal de Ca quando comparada ao grupo controle ($p<0,05$) (Tabela 2).

O aumento na excreção fecal de Fe observado nos grupos SBC não se refletiu na diminuição da absorção aparente do mineral. Ao contrário, todos os grupos com moderada SBC tiveram aumento na absorção aparente do mineral quando comparados ao grupo controle ($p<0,05$). Em relação ao Ca, a moderada sobrecarga de Fe, mesmo na presença do fitato (grupos SBC e SBC+FIT), não alterou significativamente a absorção aparente deste mineral, quando comparada ao grupo controle. Entretanto, na presença da farinha de yacon rica em FOS (grupos SBC+FY e SBC+FY+FIT) houve significativo aumento na absorção aparente do Ca, quando comparada ao grupo controle ($p<0,05$) (Tabela 2).

Parâmetros bioquímicos ósseos

A ingestão de dietas com moderada sobrecarga de Fe, farinha de yacon rica em FOS e/ou fitato não influenciou ($p>0,05$) a concentração sérica da osteocalcina, quando comparada ao grupo controle (7711±24,3ng/ml no grupo

controle). Não houve diferença significativa na excreção urinária da creatinina entre todos os grupos (22,8±8,3mmol/L no grupo controle). Não houve diferença significativa na excreção urinária da DPD entre todos os grupos (5,2±1,0 nmol DPD/mmol creatinina no grupo controle).

Concentração de minerais e teste biomecânico nos ossos

O aumento na ingestão de Fe não resultou em aumento na concentração óssea desse mineral para todos os grupos (51,2±13,8µgFe/g no grupo controle). Também não foram encontradas diferenças, entre todos os grupos, na concentração óssea de Ca (367,7±74,2mgCa/g no grupo controle), a despeito da maior ingestão de Ca observada nos grupos SBC+FY e SBC+FY+FIT e da maior absorção aparente proporcionada pela presença da farinha de yacon rica em FOS nas dietas (Tabela 2). Não houve correlação entre o consumo de Fe e Ca e a concentração destes minerais nos ossos. A sobrecarga de Fe e a sua interação com FOS da farinha de yacon e/ou fitato não resultou em diferenças significativas no peso, tamanho e comprimento das tíbias (0,52±0,05g, 42,7±1,0mm de comprimento e 3,3±0,2mm de diâmetro, no grupo controle). Não ocorreram diferenças significativas ($p>0,05$) nos parâmetros de força óssea entre todos os grupos avaliados (resiliência de 66,8±13,6N.mm, limite elástico de 114,5±14,1N, rigidez de 99,3±13,4N/mm e carga máxima de 144,0±48,5N no grupo controle).

DISCUSSÃO

Os efeitos do excesso de Fe no tecido ósseo têm sido relacionados com processos que prejudicam o balanço entre a formação e a reabsorção ósseas. Este excesso pode afetar os osteoblastos, inibindo ou diminuindo a síntese de colágeno da matriz óssea, ou alterar receptores de PTH nos osteoblastos, inibindo os efeitos deste hormônio. Neste sentido, Isomura e colaboradores (2004) demonstraram que, em ratas na pós-menopausa, o estresse oxidativo

gerado pelo excesso de Fe induziu a aumento na excreção de osteocalcina, um marcador de formação óssea. Por outro lado, em crianças e adolescentes talassêmicos, Di Stefano e colaboradores (2004) encontraram aumento da excreção urinária de deoxipiridonilina, um marcador de reabsorção óssea.

No presente trabalho, a moderada sobrecarga de Fe e a sua associação com farinha de yacon rica em FOS e/ou fitato não resultou em aumento na concentração de Fe e Ca nos ossos dos animais, na concentração plasmática da osteocalcina e na excreção urinária da DPD. Também não foram encontradas diferenças nos parâmetros relacionados à força óssea (resiliência, limite elástico, rigidez e carga máxima), demonstrando que o osso não é um tecido susceptível a alterações quando o organismo é exposto à moderada sobrecarga de Fe por um período de 92 dias.

Por outro lado, nós observamos que o consumo da farinha de yacon contendo 3,6% de FOS levou a aumento na absorção aparente de Ca (+109% e +116%, grupos SBC+FY e SBC+FY+FIT, respectivamente) (Tabela 2). Os efeitos da farinha de yacon na absorção de Ca já haviam sido previamente demonstrados por Lobo e colaboradores (2007). Nesse trabalho, ratos em crescimento, que consumiram farinha de yacon com 7,5% de FOS durante 27 dias, tiveram aumento de aproximadamente 50% na absorção de Ca e, como conseqüência, aumento na carga máxima e na resiliência, parâmetros relacionados à força óssea. Entretanto, no presente trabalho, se, por um lado, a absorção aparente de Ca foi ainda maior que a observada por esses autores, apesar da menor concentração dos FOS da farinha de yacon na dieta (3,6%), por outro, esta não se refletiu em maior depósito de Ca nos ossos nem tampouco em alterações nos parâmetros de força óssea. O aumento na absorção aparente, provavelmente, reflete o maior tempo de exposição dos animais à dieta (92 dias), mas, provavelmente, não foi suficiente para resultar em maior concentração do mineral nos ossos dos animais. Sabe-se que, em modelos de HH, a sobrecarga de Fe diminui a secreção do PTH e, como conseqüência, suprime a reabsorção de Ca e promove a reabsorção de Mg da urina, levando à hipofosfatemia e à hipercalcemia (MATSUSHIMA *et al.*, 2003). Todavia, no modelo que utilizamos, nós não podemos explicar se este fator contribuiu para a não deposição de Ca nos ossos, a despeito da maior

absorção relativa deste mineral pelos grupos alimentados com farinha de yacon rica em FOS.

Os efeitos dos frutanos tipo inulina (oligofrutose e FOS) na absorção de Ca e na retenção mineral óssea têm sido largamente relatados na literatura e estão relacionadas a vários fatores, como concentração destes compostos na dieta, concentração de Ca e protocolo experimental. Neste aspecto, Scholz-Ahrens e colaboradores (2002), trabalhando com ratas adultas ovariectomizadas, consumindo durante 4 semanas dietas semipurificadas com concentração recomendada de Ca (5mg/kg) e diferentes concentrações de oligofrutose (25, 50 ou 100mg/kg), não observaram qualquer efeito estimulatório na absorção de Ca quando comparados ao grupo controle. Após 8 semanas, apenas a concentração de 100mg/kg demonstrou efeito significativamente positivo, com relação ao controle, na absorção deste mineral. Entretanto, quando as ratas foram alimentadas com 50g de oligofrutose/kg de dieta, na presença de elevado conteúdo de Ca (10g/kg), a absorção de Ca tendeu a ser maior já nas primeiras 4 semanas e foi significativamente maior após 8 semanas. A retenção de Ca no osso, nas dietas com 5gCa/kg, só foi maior quando os animais consumiram 100mg oligofrutose/kg, enquanto que 50mg oligofrutose/kg de dieta só tiveram efeito na retenção mineral óssea na presença de alto conteúdo de Ca na dieta (10g/kg). Por outro lado, Lopez e colaboradores (2000), trabalhando com ratos adultos alimentados durante 21 dias com dietas com 5gCa/kg e com 10% de inulina (100g/kg de dieta), observaram aumento de 27% na absorção aparente de Ca com relação ao grupo controle. Entretanto, nenhuma diferença foi encontrada no conteúdo de Ca nas tíbias dos animais. Em ratos deficientes em Fe recebendo dietas com 5,2gCa/kg, 50mgFOS/kg de ração foram suficientes para aumentar em 13% a absorção relativa de Ca. Entretanto, nesse trabalho a concentração mineral nos ossos não foi investigada (OHTA *et al.*, 1995).

Dentre os mecanismos propostos para os efeitos dos frutanos tipo inulina na absorção do Ca, principalmente em dietas com elevado teor deste mineral, como na nossa dieta, está o aumento da solubilidade do mineral na presença destes carboidratos. Em elevadas concentrações na dieta, alta proporção de Ca insolúvel pode alcançar o cólon. Entretanto, a presença de

FOS na dieta favorece o crescimento de bactérias bifidogênicas que, ao utilizarem os FOS como substrato, geram ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), tais como acetato, propionato e butirato, com consenqüente acidificação luminal (ROBERFROID *et al.*, 1998) e diminuição do pH. Em menor pH, o Ca é mais solúvel e, portanto, mais biodisponível. Por outro lado, os AGCC, principalmente o butirato, aumentam a profundidade das criptas e o número de células mucosas e, desta forma, aumentam a superfície de absorção. Neste aspecto, Lobo e colaboradores (2007) demonstraram que farinha de yacon rica em FOS proporcionou aumento no tamanho do ceco, que foi conseqüência do aumento do número e da profundidade das criptas. Como resultado, houve aumento na absorção aparente de Ca e Mg, levando à maior retenção mineral óssea e ao aumento da força mecânica (carga máxima e resiliência).

Um efeito direto dos ácidos graxos de cadeia curta na absorção de Ca foi observado por Trinidad e colaboradores (1999). Nesse estudo, realizado em indivíduos saudáveis, os autores investigaram o efeito do acetato e do propionato na cinética do Ca. Como resultado, observaram que a absorção do Ca foi aumentada pela presença dos dois AGCC. Ainda, segundo Ohta e colaboradores (1998), como efeito sistêmico dos AGCC, pode ocorrer aumento na expressão da proteína de ligação do Ca (calbindina-D9k) na mucosa do intestino grosso, aumentando a absorção desse mineral. Em conclusão, nosso trabalho observou que a moderada sobrecarga de Fe ou a sua interação com FOS da farinha de yacon e/ou fitato, por um período de 92 dias, não alterou a concentração de Fe e Ca nos ossos, nem os parâmetros relacionados à formação e reabsorção óssea e nem os parâmetros de força óssea. Todavia, os FOS da farinha de yacon demonstraram efeito positivo na absorção aparente de Ca, corroborando os resultados obtidos por Lobo e colaboradores (2007), mas que não se refletiu na maior concentração deste mineral nos ossos. Desta forma, mais estudos devem ser conduzidos para se avaliar os mecanismos envolvidos neste processo.

REFERÊNCIAS

ADA REPORTS. Position of the American Dietetic Association: Food fortification and dietary supplements. *J. Am. Diet. Assoc.*, v.101, p.115-125, 2001.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação específica por área de assunto. Regulamento técnico por assunto: F. *Farinha de trigo e/ou milho fortificados com ferro. Resolução RDC n.344,* de 13 de Dezembro de 2002. Disponível em: http://e-legis.bvacas.br/leisref/public/showAct.php?id=1679. Acesso em 12 de setembro de 2007.

ANGELOPOULOS, N.G.; GOULA, A.K.; PAPANIKOLAOU, G.; TOLIS, G. Osteoporosis in HFE2 juvenile hemochromatosis. A case report and review of the literature. *Osteop. Int.*, v.17, p.150-155, 2006.

ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis.* 13.ed. Arlington: AOAC, 1985.

BUSSAB, W.O.; MORETTIN, P.A. *Estatística Básica.* 5 ed. Ed. Saraiva. 526p, 2003.

CARVALHO, M.A.M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, C.L. Frutanos: ocorrência, estrutura e utilização, com ênfase em plantas do cerrado brasileiro In: LAJOLO, F.M.; SAURA-CALIXTO, F.; PENNA, E.W.; MENEZES, E.W. Fibra dietética em Iberoamérica: Tecnología y Salud – Obtención, Caracterización, Efecto Fisiológico y Aplicación em Alimentos. Projeto CYTED XI.6, São Paulo:Varela, 2001, p.77-89.

COCATO, M.L.; RÉ, M.I.; TRINDADE-NETO, M.A.; COLLI, C. Avaliação por métodos *in vitro* e *in vivo* da biodisponibilidade de sulfato ferroso microencapsulado. *Braz. J. Nutr.*, v.20 (3), p.239-247, 2007.

CONOVER, W.J. *Practical Nonparametric Statistics.* 3 ed. New York: John Wiley. 597p, 1999.

FRANCESCHI, R.T. The role of ascorbic acid in mesenchymal differentiation. *Nutr. Rev.*, v.50, p.65-70, 1992.

HALLBERG, L.; ROSSANDER, L.; SKANBERG, L. Phytates and inhibitory effects of bran on iron absorption in man. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.45, p.988-996, 1987.

HURREL, R.F.; JUILLERAT, M.A.; REDDY, M.B.; LYNCH, S.R.; DASSENKO, S.A.; COOK, J.D. Soy protein, phytate, and iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.56, p.573-578, 1992.

INSTITUTE ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3. ed. São Paulo, 1985. v.1, p.533.

ITAYA, N.M.; CARVALHO, M.A.M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, C.L. Fructosyl transferase and hydrolase activities in rizophores and tuberous roots upon growth of Polymnia sonchifolia (Asteraceae). Phys. Plant., v.16, p.451-459, 2002.

JENAB, M.; THOMPSON, L.U. Phytic acid in wheat bran affects colon morphology cell differentiation and a&poptosis. *Carcinogenesis*, v.21(8), p.1547-1552, 2000.

LEEMING, D.J.; ALEXANDERSEN, P.; KARSDAL, M.A.; QVIST, P.; SCHALLER, S.; TANKÓ, L.B. An unpdate by biomarkers of bone turnorver and their utility in biomedical research and clinical practice. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, v., p., 2006.

LIU, G.; MEN, P.; KENNER, G.H.; MILLER, S.C. Age-associated iron accumulation in bone: Implications for postmenopausal osteoporosis and a new target for prevention and treatment by chelation. *Biometals*, v.19, p.245-251, 2006.

LOBO, A.R.; COLLI, C.; FILISETTI, T.M.C.C. Fructooligosaccharides improve bone mass and biochemichal properties in rats. *Nutr. Res.*, v.26, p.413-420, 2006.

LOBO, A.R.; COLLI, C.; ALVARES, E.P.; FILISETTI, T.M.C.C. Effects of fructans-containing yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp e Endl.) flour on caecum mucosal morphometry, calcium and magnesium balance and bone calcium retention in growing rats. *Brit. J. Nutr.,* v.97, p.766-785, 2007.

LOPEZ, H.W.; COUDRAY, C.; LEVRAT-VERNY, M.A.; FEILET-COUDRAY, C.; DEMIGNÉ, C.; RÉMÉSY, C. Fructooligosaccharides enhance mineral apparent absorption and counteract the deleterius effects of phytic acid on mineral homeostatic in rats. *J. Nutr. Biochem.*, v.11, p.500-508, 2000.

MANDALUNIS, P.M.; UBIOS, A.M. Experimental renal failure and iron overload: A histomorphometric study in rat tibia. *Toxicol. Pathol..*, v.33, p. 398-403, 2005.

MATSUSHIMA, S.; MIKINORI, T.; OZAKI, K.; NARAMA, I. Iron lactate-induced osteomalacia in association with osteoblast dynamics. *Toxicol. Pathol.*, v.31, p.646-654, 2003.

MONTGOMERY, D.C. *Design and Analysis of Experiments*, 5ª ed. New York John Wiley. 684p, 2001.

OHTA, A.; OHTSUKI, M.; BABA, S.; TAKIZAWA, T.; ADACHI, T.; KIMURA, S. Effects os fructooligosaccharides on the absorption of iron, calcium and magnesium in iron-deficient anemic rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol..*, v.41, p.281-291, 1995.

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

RÉMÉSY, C.; LEVRAT, M.A.; GAMET, L.; DEMIGNÉ, C. Cecal fermentations in rats fed oligosaccharides (inulin) are modulated by dietary calcium level. *Am. J. Phys.*, v.264, p.G855-G862, 1993.

ROBERFROID,M.B.; VAN LOO, J.A.E.; GIBSON, G.R. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *J. Nutr.*, v.128, p.11-19, 1998.

SCHOLZ-AHRENS, K.E.; AÇIL, Y.; SCHREZENMEIR, J. Effect of oligofructose or dietary calcium on repeated calcium and phosphorus balances, bone mineralization and trabecular structure in ovariectomized rats*. *Br. J. Nutr.*, v.88 (4), p.365-377, 2002.

SCHOLZ-AHRENS, K.E.; ADE, P.; MASTEN, B.; WEBER, P.; TIMM, W.; ASIL, T.; GLUER, C.C; SCHREZENMEIR, J. Prebiotics, probiotics, and synbiotics

affect mineral absorption, bone content, and bone structure. *J. Nutr.*, v.137, p.838S-846S, 2007.

SEDLIN ED, HIRSCH C. Factors affecting the determination of the physical properties of femoral cortical bone. *Acta Orthop Scandinav.*, v., p.29-48, 1966.

TRINIDAD, T.P.; WOLEVER, T.M.; THOMPSON, L.U. Effects of calcium concentration, acetate, and propionate on calcium absorption in the human distal colon. *Nutr.*, v.15, p.529-533, 1999.

YANG, S.; MADYASTHA, P.; BINGEL, S.; RIES, W.; KEY, L. A new superoxide-generating oxidase in murine osteoclasts. *J. Biol. Chem.,* v.276, p.5452-5458, 2001.

Tabela 1. Formulação das dietas experimentais[1]

Ingredientes (%)	Grupos Experimentais[2]				
	Controle	SBC	SBC+FY	SBC+FIT	SBC+FY+FIT
Caseína (78% proteina) [3]	21.79	21.79	21.79	21.79	21.79
Fibras	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Óleo de soja[4]	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
L-cistina	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Bitartarato de colina	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Mistura vitamínica[1]	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Mistura salina modificada[1]	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Sacarose	10.0	10.0	-	10.0	-
Amido	51.15	51.15	45.15	51.15	45.15
Farinha de yacon(18% FOS)[5]	-	-	20.0	-	20.0
Ácido fítico[6]	-			0.6	0.6

[1] De acordo com as recomendações do *American Institute of Nutrition* (Reeves *et al.*, 1993) com modificações: $FeSO_4$ foi substituído por $FeSO_4$ microencapsulado em todas as dietas; Grupo Controle: 35 mg Fe/kg dieta; Grupos com moderada sobrecarga de Fe: 500 mg Fe/kg dieta; Sacarose e parte do amido foram substituídos por farinha de yacon (*Smallanthus sonchiflolius*) na formulação das dietas contendo frutanos;

[2] SBC: Moderada sobrecarga de Fe; SBC+FY: Moderada sobrecarga de Fe+ farinha de yacon; SBC+FIT: Moderada sobrecarga de Fe+ fitato; SBC+FY+FIT: Moderada sobrecarga de Fe+ Farinha de yacon + fitato;

[3] O conteúdo de protein na casein foi determinado pelo método de micro-Kjeldahl usando fator de correção de 6.25 (AOAC. 1985);

[4] Cargill Agrícola S/A (Mairinque, São Paulo, Brazil);

[5] 18% de frutanos totais; 28.3% sacarose; 15.7% frutose;

[6] Hexafosfato de mioinositol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)

Tabela 2. Consumo de ração, ganho de peso, consumo de minerais e excreção fecal de minerais de ratos alimentados com ração controle ou rações com moderada sobrecarga de Fe suplementadas ou não com farinha de yacon e/ou fitato por 92 dias

Parâmetros	Grupos Experimentais[1]					
	Controle	SBC	SBC+FY	SBC+FIT	SBC+FY+FIT	p*
Consumo total de ração (g)	1372,1 ± 150,3	1421,0 ± 93,9	1336,3 ± 155,4	1437,8 ± 136,1	1443,6 ± 119,5	ns**
Ganho de peso (g)	293,9 ± 33,0	288,9 ± 23,4	270,3 ± 37,0	290,1 ± 12,0	289,7 ± 31,8	Ns
Eficiência Alimentar	0,21 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,01	ns
Consumo de Fe (mg/dia)	0,8 ± 0,1[a]	10,5 ± 1,4[b]	9,0 ± 1,0[b,c]	8,6 ± 0,5[c]	10,0 ± 1,4[b,c]	0,000
Consumo de Ca (g/dia)	100,0 ± 9,2[a]	108,4 ± 5,3[a,d]	129,7 ± 13,6[b,c]	122,0 ± 9,7[b,d]	139,8 ± 8,6[c]	0,000
Umidade das fezes (%)	28,3 ± 3,9[a]	33,1 ± 2,3[a]	39,7 ± 4,7[b]	32,2 ± 4,0[a]	46,5 ± 1,7[c]	0,000
Excreção de Fe (mg/dia)	0,7 ± 0,3[a]	4,3 ± 0,3[b]	3,3 ± 0,2[c]	4,1 ± 0,2[b]	3,3 ± 0,3[c]	0,000
Excreção de Ca (g/dia)	74,2 ± 4,1[a]	83,0 ± 6,4[b]	61,0 ± 4,7[c]	74,9 ± 3,0[a]	63,6 ± 4,0[c]	0,000
Absorção aparente (%)						
Fe	13,4 ± 1,2[a]	58,87 ± 4,9[b,c]	62,7 ± 5,5[b]	52,3 ± 2,0[c]	66,0 ± 4,8[b]	0,050
Ca	25,2 ± 9,3[a]	35,6 ± 7,6[a]	52,7 ± 5,3[b]	38,4 ± 4,0[a]	54,5 ± 2,9[b]	0,050

Média ± D.P. (n = 7: Controle, SBC, SBC+FY+FIT; n = 6: SBC+FIT),

[1] SBC: Moderada sobrecarga de Fe; SBC+FY: Moderada sobrecarga de Fe + farinha de yacon; SBC+FIT: Moderada sobrecarga de Fe + fitato; SBC+FY+FIT: Moderada sobrecarga de Fe + Farinha de yacon + fitato;

Sobrescritos diferentes na mesma linha indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$); * *versus* grupo Controle; **diferença não significativa

5. CONCLUSÕES DA TESE DE DOUTORADO

A moderada sobrecarga de Fe:

- ✓ não alterou os índices séricos do estado nutricional em ferro
- ✓ aumentou a atividade sérica da enzima AST
- ✓ diminuiu a concentração sérica de colesterol
- ✓ aumentou a concentração hepática de Fe e a excreção de Fe nas fezes
- ✓ aumentou a absorção aparente de Fe
- ✓ não influenciou a absorção aparente de Ca
- ✓ não alterou as concentrações hepáticas de Cu e Zn
- ✓ não alterou a concentração hepática da vitamina E
- ✓ não resultou em alterações no perfil dos ácidos graxos hepáticos
- ✓ não alterou a atividade hepática das enzimas CAT, MnSOD e CuZnSOD
- ✓ resultou em aumento na atividade hepática da GPx
- ✓ aumentou o número de corpúsculos apoptóticos no tecido hepático
- ✓ aumentou a deposição de hemossiderina ao redor das células de Kupffer
- ✓ não influenciou a concentração de Fe e Ca nos ossos
- ✓ não alterou os parâmetros biomecânicos ósseos
- ✓ não influenciou a excreção urinária de DPD ou a concentração plasmática de osteocalcina

A interação da moderada sobrecarga de Fe com farinha de yacon e/ou fitato resultou em:

- ✓ diminuição na atividade sérica da enzima AST ao nível da atividade do grupo controle
- ✓ diminuição nas concentrações séricas da VLDL e do triacilglicerol

- ✓ diminuição na atividade hepática da enzima GPx com relação ao grupo com moderada sobrecarga de Fe
- ✓ diminuição na atividade da CAT
- ✓ aumento na absorção aparente de Ca

Desta forma, a interação entre a moderada sobrecarga de Fe com farinha de yacon rica em frutanos e/ou fitato reverteu parcial ou totalmente as alterações induzidas pela moderada sobrecarga de Fe, indicando a importância do consumo destes compostos para grupos expostos a dietas com moderada sobrecarga de Fe.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comissão de Ética em Experimentação Animal

Of.CEEA nº 52/2005

CERTIFICADO

*Certificamos que o Projeto "**Estudo da absorção e metabolismo de cálcio e ferro em ratos: Efeitos da interação entre componentes da dieta e conseqüências metabólicas de diferentes níveis de ingestão.** " (Protocolo CEEA nº88), sob a responsabilidade dos Srs). **Alexandre Rodrigues Lobo e Maria Lucia Cocato** e do orientador(a) Célia Colli, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 10/10/2005.*

São Paulo, 10 de outubro de 2005.

Profª. Drª. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da CEEA

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3677 / Fax: (11) 3813-5093 - e-mail: rtrigo@usp.br