



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO



VIVIAN CRISTINE CORREIA VIEIRA

**EFEITO DOS PREBIÓTICOS OLIGOFRUTOSE, GALACTO-
OLIGOSSACARÍDEOS E DE SUA COMBINAÇÃO NO METABOLISMO ÓSSEO
DE RATAS WISTAR NA MEIA-IDADE**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Engenharia de
Alimentos da Universidade Estadual
de Campinas, para obtenção do título
de mestre em Alimentos e Nutrição –
Área de Nutrição Experimental e
aplicada à Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Mário Roberto
Maróstica Júnior

CAMPINAS, 2012

VIVIAN CRISTINE CORREIA VIEIRA

Nutricionista

**EFEITO DOS PREBIÓTICOS OLIGOFRUTOSE, GALACTO-
OLIGOSSACARÍDEOS E DE SUA COMBINAÇÃO NO METABOLISMO ÓSSEO
DE RATAS WISTAR NA MEIA-IDADE**

CAMPINAS, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE
DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

V673e Vieira, Vivian Cristine Correia
Efeito dos prebióticos oligofrutose, galacto-
oligossacarídeos e de sua combinação no metabolismo
ósseo de ratas Wistar na meia-idade / Vivian Cristine
Correia Vieira. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Mário Roberto Maróstica Júnior.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Prebióticos. 2. Oligofrutose. 3. Galacto-
oligossacarídeos. 4. Metabolismo ósseo. 5.
Osteoporose. I. Maróstica Júnior, Mário Roberto. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Effect of oligofructose and galactooligosaccharides on bone
metabolism in aging female Wistar rats

Palavras-chave em inglês:

Prebiotic

Oligofructose

Galactooligosaccharides

Bone metabolism

Osteoporosis

Área de concentração: Nutrição Experimental e Aplicada à Tecnologia de
Alimentos

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora:

Mário Roberto Maróstica Júnior [Orientador]

Claudia Cardoso Netto

Rosângela dos Santos

Data da defesa: 30/03/2012

Programa de Pós Graduação: Alimentos e Nutrição

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida em 30/03/2012 por Vivian Cristine Correia Vieira aprovado pela comissão julgadora em 30/03/2012

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Mario Roberto Marostica Junior
(Orientador)

Profa. Dra. Claudia Cardoso Netto
(Membro)

Dra. Rosângela dos Santos
(Membro)

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
(Membro)

Profa. Dra. Lilia Ferreira Santos Zago
(Membro)

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela conclusão de mais essa etapa.

Aos meus pais, Lourdes e Evaldo, exemplos de vida e profissão, pela compreensão, motivação e apoio em todos os momentos.

À minha irmã Taís, pelo apoio e amizade sempre.

Ao Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Júnior, pela oportunidade, orientação e confiança em meu trabalho.

Aos membros da banca examinadora pelas contribuições a redação final desta dissertação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Fapesp, pelo auxílio financeiro cedido para execução deste projeto.

À Prof^a Dr^a Cláudia Cardoso Netto, pela disponibilidade e inúmeras contribuições durante o desenvolvimento deste projeto.

Aos professores doutoures: Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes, Flávia Fioruci Bezerra e Rubens Caram, pela concessão dos equipamentos para realização das análises sorológicas, densitometria e ensaio mecânico deste projeto, respectivamente.

À Prof^a Dr^a Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes e alunos do laboratório de Nutrição e Câncer, pelas instruções no desenvolvimento das análises sorológicas.

Ao técnico José Luis Lisboa, pelo auxílio na execução do ensaio mecânico.

Às técnicas Maria Susana e Soely, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

À Rosângela, pela produção do GOS utilizado neste estudo e sugestões neste trabalho,

À Orafti, pela doação da oligofrutose utilizada neste estudo,

À Anne e à Cinthia, pela amizade, ajuda, risadas e pelo apoio nos momentos mais difíceis.

Às colegas de laboratório Gláucia, Ângela, Cibele, Juliana, Rafaela e Sabrina, pela ajuda ou pelos momentos de descontração que fazem toda a diferença no nosso dia a dia.

Aos amigos: Danielle, Fernanda, Júlia, Leandro, Marcela, Marta, Paula e Priscilla,
por todos os momentos de risadas e companheirismo; pela compreensão,
incentivo e apoio imprescindível nos últimos meses.

RESUMO

Prebióticos são componentes alimentares não-digeríveis que conferem benefícios à saúde do hospedeiro por meio da modulação de sua microbiota gastrintestinal, tais como a oligofrutose e os galacto-oligossacarídeos (GOS). Diversos estudos têm sugerido que estes dois prebióticos podem estar associados à melhora da saúde óssea. Nas mulheres, a perda óssea associada ao envelhecimento tem início na terceira década de vida, e é bastante acentuada pela deficiência de estrógenos na menopausa, tendo-se um maior risco de desenvolvimento de osteoporose, doença esquelética sistêmica caracterizada por baixa massa e deterioração da microarquitetura do osso, com aumento do risco de fraturas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do consumo de oligofrutose, GOS e de sua combinação no metabolismo ósseo de ratas Wistar de meia-idade, nas quais ter-se-ia perda óssea associada ao envelhecimento e o estrógeno seria deficiente. Foi desenvolvido ensaio biológico com 32 ratas, divididas em 4 grupos: G1= dieta AIN-93M padrão (controle), G2=dieta AIN-93M com 5% de oligofrutose, G3=dieta AIN-93M com 5% de GOS, e G4=dieta AIN-93M com 5% de uma mistura deste prebióticos (1:1). A suplementação foi realizada por 16 semanas. Foram determinadas as concentrações séricas de paratormônio (PTH), ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa β (RANK-L), osteoprotegerina (OPG) e interleucina 6 (IL-6) por meio de reações do tipo antígeno-anticorpo; a área óssea, conteúdo mineral ósseo e densidade mineral óssea da coluna lombar por meio de absorciometria por dupla emissão de raio-X (DXA), além de propriedades biomecânicas do fêmur dos animais em ensaio de flexão em três pontos. Na

análise estatística dos resultados, utilizou-se o teste de Tukey para os dados paramétricos, e teste de Kruskal-Wallis para os dados não paramétricos, considerando $p < 0,05$ como probabilidade mínima aceitável para diferença entre as médias. Não foram constatadas diferenças significantes entre os 4 grupos para todas as variáveis relacionadas ao metabolismo ósseo analisadas. Pode-se concluir que o consumo destes prebióticos nas concentrações do presente estudo por 16 semanas não contribuiu para melhorar a saúde óssea nesse grupo populacional.

Palavras-chave: prebióticos, oligofrutose, galacto-oligossacarídeos; metabolismo ósseo, osteoporose, deficiência de estrógenos

SUMMARY

Prebiotics are non-digestible food components that provide health benefits to the host through the modulation of the gastrointestinal microbiota, such as oligofructose and galactooligosaccharides (GOS). Several studies have demonstrated that consumption of these prebiotics might be associated with improved bone health. In women, age-related bone loss begins at the third decade of life, and it is markedly accentuated with estrogen deficiency at menopause, predisposing women at this stage to a higher risk of developing osteoporosis. This last is defined as a systemic skeletal disease characterized by low bone mass and microarchitectural deterioration of bone tissue, with a consequent increase in bone susceptibility to fracture. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of oligofructose, GOS and their combination on bone metabolism in aging female rats, in which age-related bone loss occurs and estrogen is deficient. Thirty-two female Wistar rats were divided in 4 groups: G1= AIN-93M standard diet (control), G2=AIN-93-M diet with 5% of oligofructose, G3=AIN-93-M diet with 5% of GOS, G4=AIN-93-M diet with 5% of a mixture of oligofructose and GOS (1:1). The dietary intervention was carried out for 16 weeks. Serum concentrations of parathyroid hormone (PTH), receptor activator of NF- κ B ligand (RANK-L), osteoprotegerin (OPG) and interleukin-6 (IL-6) were determined through antigen-antibody reactions. Lumbar vertebrae bone area, bone mineral content and bone mineral density were measured using dual X-ray absorptiometry, and femur specimens were submitted to a three-point bending test in order to obtain its biomechanical properties. Statistics was performed using Tukey test for parametric data and

Kruskal-Wallis test for non-parametric data. Results were considered statistically different at $p < 0.05$. There were no significant differences between the groups for all variables related to bone metabolism. In conclusion, consumption of these prebiotic ingredients for 16 weeks in the concentrations of the present study did not improve bone health in aging female rats.

Key Words: prebiotic, oligofrutose, galactooligosaccharides, bone metabolism, osteoporosis, estrogen deficiency

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ocorrência de oligofrutose em alguns alimentos.....	29
Tabela 2. Composição da dieta AIN-93M (Reeves et al, 1993) modificada de acordo com os tratamentos propostos.....	69
Tabela 3. Consumo diário de dieta (g/dia), pesos inicial, final e ganho de peso total (g) durante o período de intervenção.....	74
Tabela 4. Propriedades biomecânicas dos fêmures (média \pm EPM).....	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Exemplo de estrutura química dos frutanos tipo inulina (glucopiranosil- $[\beta$ -D-frutofuranosil] _{n-1} - β -D-frutofuranosídeo).....	26
Figura 2.	Exemplo de estrutura química dos galactooligossacarídeos (β -D-galactopiranosil- $[(1\rightarrow6)\text{-}\beta$ -D galactopiranosil] _{n-1} -($1\rightarrow4$)- α -D glicopiranoose)	27
Figura 3.	Processo de produção industrial de inulina, oligofrutose e seus derivados.....	31
Figura 4.	Produção industrial de galacto-oligossacarídeos.....	33
Figura 5.	Concentração de RANK-L no soro dos animais, determinada por meio de reação do tipo antígeno/anticorpo com kits do tipo Luminex.....	74
Figura 6.	Concentração de OPG no soro dos animais, determinada por meio de reação do tipo antígeno/anticorpo com kits do tipo Luminex.....	75
Figura 7.	Concentração de IL-6 no soro dos animais, determinada por meio de reação do tipo antígeno/anticorpo com kits do tipo Luminex.....	75
Figura 8.	Concentração de PTH no soro dos animais, determinada com kit do tipo Elisa de competição.....	76

Figura 9.	Área óssea da coluna lombar dos animais (vértebras L1-L4) determinada por meio da tecnologia de absorciometria por dupla emissão de raios-X (DXA).....	81
Figura 10.	Conteúdo mineral ósseo da coluna lombar dos animais (vértebras L1-L4) determinado por meio da tecnologia de absorciometria por dupla emissão de raios-X (DXA).....	82
Figura 11.	Densidade mineral óssea areal da coluna lombar (vértebras L1-L4) dos animais.....	82
Figura 12.	Exemplo de gráfico de carga <i>versus</i> deformação.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC	=	Ácidos graxos de cadeia curta
AO	=	Área óssea
BMU	=	Unidades Multicelulares Básicas de Remodelação Óssea (“Basic Multicellular Unit”)
CAISM	=	Ambulatório de Menopausa do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
CaR	=	Receptores sensíveis ao cálcio
CFU-GM	=	Unidades formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos
CMO	=	Conteúdo mineral ósseo
CO	=	Controle
DGGE	=	Eletroforese em gel de gradiente de temperatura
DMO	=	Densidade mineral óssea
DP	=	Desvios-padrão
EPM	=	Erro padrão da média
FAO	=	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FGF	=	Fator de crescimento fibroblástico
FISH	=	Hibridação <i>in situ</i> por fluorescência
FOS	=	Fruto-oligossacarídeos
FTases	=	Frutossiltransferases
GF ₂	=	1-kestose
GF ₃	=	1-nistose
GF ₄	=	1-frutofuranosil nistose
GOS	=	Galacto-oligossacarídeos
IGF	=	Fator de crescimento semelhante a insulina
IL-6	=	Interleucina-6
ONDs	=	Oligossacarídeos não-digeríveis
OPG	=	Osteoprotegerina
OLF	=	Oligofrutose
PCR	=	Reação em cadeia da polimerase
PDGF	=	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PTH	=	Paratôrmônio
RANK	=	Receptor ativador do fator nuclear Kappa β

RANK-L	=	Ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa β
TGF-beta	=	fator de crescimento transformante-beta
TGGE	=	Eletroforese em gel de gradiente desnaturante
TNF	=	Fator de necrose tumoral
TOS	=	Transgalactooligossacarídeos
TRPV-6	=	Receptores de potencial transitório tipo vanilóide 6
VDR	=	Receptor de vitamina D

SUMÁRIO

Resumo.....	vi
Summary.....	viii
1) Introdução.....	01
2) Revisão Bibliográfica.....	04
2.1) Prebióticos.....	04
2.1.1) Definição e caracterização química de prebióticos	04
2.1.2) Ocorrência em alimentos e processos de obtenção de oligofrutose e GOS.....	09
2.1.3) Utilização de oligofrutose e GOS na indústria de alimentos..	14
2.1.4) Efeitos benéficos à saúde associados ao consumo de oligofrutose e GOS.....	16
2.2) Tecido ósseo.....	17
2.2.1 Caracterização do tecido ósseo.....	17
2.2.2) Fisiologia do tecido ósseo na idade adulta: processo de remodelação óssea.....	20
2.2.3) Efeitos de intervenções dietéticas em propriedades ósseas	24
2.3) Osteoporose e perda óssea após a menopausa.....	25
2.4) Ação da oligofrutose e GOS durante a perda óssea no gênero feminino.....	43
3) Objetivos	45
3.1) Objetivo geral.....	45

3.2) Objetivos específicos.....	45
4) Material e métodos.....	46
4.1) Delineamento experimental.....	46
4.2) Prebióticos.....	47
4.3) Dieta.....	48
4.4) Densitometria óssea.....	49
4.5) Ensaio mecânico.....	50
4.6) Análises bioquímicas.....	51
4.7) Tratamento estatístico.....	52
5) Resultados e discussão.....	53
6) Conclusão.....	72
7) Referências.....	74
ANEXO 1. Certificado de aprovação do ensaio biológico pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Unicamp.....	91

1. INTRODUÇÃO

A osteoporose pode ser definida como uma doença esquelética sistêmica caracterizada por baixa massa e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, com conseqüente aumento da fragilidade do osso e da ocorrência de fraturas (KANIS et al, 2008).

As fraturas causadas pela doença estão associadas à dor de grande intensidade, altos custos para seu tratamento, além de poderem causar incapacitação, com prejuízos na capacidade de locomoção e na habilidade de cuidar de si mesmo, e de aumentarem a mortalidade. Conseqüentemente, a osteoporose gera um enorme impacto econômico para a sociedade e na qualidade de vida e saúde dos indivíduos acometidos por essa enfermidade (SAHAP, GUNAL, KORKUSUZ, 2006).

Nas mulheres, a perda óssea associada ao envelhecimento tem início na terceira década de vida (RIGGS et al, 2008) e é bastante acentuada pela deficiência de estrógenos na menopausa (KHOSLA, MELTON, RIGGS, 2011), tendo-se um maior risco de desenvolvimento de osteoporose neste gênero (ALFVÉN et al, 2000). Atualmente, a prevalência dessa doença nos países desenvolvidos é estimada em cerca de 40% nas mulheres na sexta década de vida, e após os 80 anos a osteoporose chega a afetar aproximadamente 70% da população feminina (LEEMING et al, 2006). Assim, torna-se interessante investir na busca e desenvolvimento de compostos alimentares que teriam um efeito positivo para a prevenção ou manuseio desta doença (BROUNS, VERMEER, 2000).

Prebióticos podem ser definidos como ingredientes alimentares seletivamente fermentados pelo hospedeiro que conduzem a mudanças específicas na composição e/ou atividade de sua microbiota gastrointestinal, as quais estão associadas a benefícios para a saúde e bem-estar do mesmo. Exemplos de compostos com potencial prebiótico são a oligofrutose e os galacto-oligosacarídeos (GOS) (ROBERFROID, 2007a).

A oligofrutose pertence à classe dos frutanos tipo inulina, que constituem cadeias lineares de β -D-frutose em que as unidades deste monossacarídeo estão unidas por ligações β -(1 \rightarrow 2), podendo conter uma molécula inicial de α -D-glicose (ROBERFROID, 2007b). Este composto apresenta um GP de no máximo 10 unidades, com média de 4 unidades (ROBERFROID, 2005).

Os GOS são um grupo de oligossacarídeos compostos por moléculas de galactose ligadas à glicose por meio de ligações glicosídicas com configuração β , tendo-se principalmente de tri a hexassacarídeos com 2 a 5 unidades de galactose, respectivamente, embora seu GP possa variar entre 2 a 8 moléculas de galactose (SAKO, MATSUMOTO, TANAKA, 1999; LOO et al, 1999).

Tanto a oligofrutose quanto os GOS apresentam boa estabilidade, podendo ser adicionados a uma grande variedade de alimentos para proporcionar a melhoria de sua qualidade sensorial, composição nutricional mais balanceada e efeitos benéficos adicionais à saúde em função de suas propriedades prebióticas (SAKO, MATSUMOTO, TANAKA, 1999, FRANCK, 2002).

Dentre os diversos benefícios associados ao consumo destes dois compostos já descritos na literatura, têm-se evidenciado um potencial dos

mesmos para promover a melhoria da saúde óssea (CHONAN, MATSUMOTO, WATANUKI, 1995, WEAVER, 2005, SHOLZ-AHRENS et al, 2007a).

Assim, o objetivo deste estudo foi analisar o efeito da suplementação dietética dos prebióticos oligofrutose, GOS e de sua combinação por 16 semanas no metabolismo ósseo de ratas Wistar na meia-idade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PREBIÓTICOS

2.1.1 Definição e caracterização química de prebióticos

Atualmente, a definição amplamente empregada para prebióticos é que estes constituem ingredientes seletivamente fermentados que conduzem a mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, as quais conferem benefícios à saúde e bem-estar do hospedeiro (ROBERFROID, 2007a). Tal fermentação seletiva e conseqüentes alterações da microbiota caracterizam-se especialmente pelo aumento de bactérias potencialmente promotoras de saúde e pela redução das espécies com potencial nocivo (ROBERFROID, 2007b).

Segundo Gibson e colaboradores (2004), para um ingrediente ser classificado como prebiótico, deve ser demonstrado, por meio de estudos científicos *in vitro* e imprescindivelmente *in vivo*, que o mesmo atende a alguns critérios.

Primeiramente, os prebióticos devem resistir à acidez gástrica, à hidrólise por enzimas de mamíferos e à absorção no trato gastrointestinal (TGI). Tal resistência não necessariamente implica que o prebiótico seja completamente indigerível, mas deve garantir que uma proporção significativa do mesmo fique disponível como substrato para a fermentação intestinal, especialmente no cólon.

Em segundo lugar, estes devem sofrer fermentação pela microbiota intestinal, e em terceiro lugar, devem estimular seletivamente o crescimento e/ou a atividade de bactérias intestinais que contribuem para a saúde e o bem-estar, conforme já mencionado na própria definição, destacando-se em particular o aumento de bifidobactérias e de lactobacilos (bifidogênese). Para demonstração de tal critério é necessário o emprego análises microbiológicas quantitativas e confiáveis de uma grande variedade de gêneros de bactérias além de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, incluindo-se também aeróbios e anaeróbios totais, bacteróides, *Clostridium*, enterobactérias e *Eubacterium*. Tal necessidade decorre do fato de ser essencial levar-se em consideração as interações entre os mais diferentes constituintes da microbiota intestinal para confirmar se o ingrediente a ser testado promove crescimento de tais bactérias benéficas em meio da complexidade e diversidade que caracterizam a microbiota humana. Essas análises são possíveis com o emprego de metodologias moleculares, tais como hibridação *in situ* por fluorescência (FISH), reação em cadeia da polimerase (PCR), eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) e eletroforese em gel de gradiente de temperatura (TGGE) (GIBSON et al, 2004).

PINEIRO et al (2008), em artigo que resume alguns tópicos discutidos na última convenção da Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) sobre prebióticos, coloca mais alguns pontos importantes que futuramente devem gerar uma complementação da definição atual de prebióticos.

Os autores afirmam que, com o desenvolvimento das novas tecnologias mencionadas anteriormente, e conseqüente crescimento das técnicas para determinação da ecologia da microbiota gastrintestinal e entendimento das

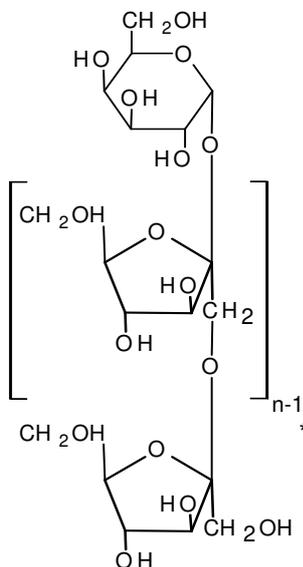
funções de cada espécie, deve-se reconhecer que a modulação benéfica da microbiota intestinal poderá ir muito além da bifidogênese.

Além disso, colocou-se em tal convenção que os ingredientes considerados na definição devem ser componentes alimentares caracterizados por constituírem substâncias que podem ser bem-definidas com relação a sua composição química, conforme também já proposto por Fedorak e Madsen (2004). Também foi definido que devem ser demonstradas evidências consistentes de uma correlação entre os efeitos fisiológicos benéficos à saúde do hospedeiro e a modulação da microbiota produzida pelo composto a ser considerado em relação ao potencial prebiótico, ou seja, os efeitos de aumento de bactérias benéficas não são suficientes para classificação como prebiótico se não forem demonstrados os benefícios à saúde e bem estar decorrentes do mesmo.

Embora ainda haja muita contradição na literatura científica a respeito das substâncias que podem ser consideradas prebióticas, existe um consenso de que os galactooligossacarídeos (GOS) e os frutanos tipo inulina podem ser inclusos na categoria (KOLIDA et al, 2002, GIBSON et al, 2004, MACFARLANE, MACFARLANE, CUMMINGS, 2006, SWEENEN et al, 2006, ROBERFROID, 2007a, SARKAR, 2007, PINEIRO et al, 2008).

Os frutanos tipo inulina são cadeias lineares de β -D-frutose em que as unidades deste monossacarídeo encontram-se unidas por ligações β -(1 \rightarrow 2), podendo conter uma molécula inicial de α -D-glicose. Logo, estes compostos são β -D-frutopiranosil- $[\beta$ -D frutofuranosil] $_{n-1}$ - β -D frutofuranosídeo; ou α -D-

glucopiranosil- $[\beta\text{-D-frutofuranosil}]_{n-1}\text{-}\beta\text{-D-frutofuranosídeo}$, caso contenham glicose em sua estrutura (ROBERFROID, 2005); conforme Figura 1.



* n = número de unidades de frutose

Figura 1. Exemplo de estrutura química dos frutanos tipo inulina (glucopiranosil- $[\beta\text{-D-frutofuranosil}]_{n-1}\text{-}\beta\text{-D-frutofuranosídeo}$)

Os frutanos tipo inulina incluem:

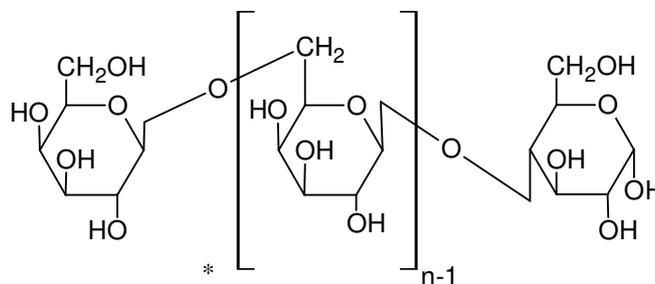
- a inulina nativa, a qual pode ser produzida utilizando-se como fonte a alcachofra de Jerusalém, porém o processo industrial mais comum é a extração deste frutano a partir das raízes de chicória (KAUR & GUPTA, 2002), a qual apresenta um grau de polimerização (GP), que corresponde ao número de moléculas de frutose ligadas entre si na cadeia de frutano (COUDRAY et al, 2003), de 2 a 60, com GP médio de 12;

- a inulina de alta performance (GP=10-60, GP médio=25), obtida por meio de emprego de tecnologias de separação específicas para a remoção de frutanos de baixo GP;

- os fruto-oligossacarídeos (FOS) ou oligofrutose, que são considerados termos sinônimos para a mistura de frutanos do tipo inulina com GP de no máximo 10 unidades, apresentando um GP médio de 4,

- O *Synergy 1*, que corresponde a uma combinação de oligofrutose e inulina de alta performance disponível comercialmente (ROBERFROID, 2007 b).

Os GOS são um grupo de oligossacarídeos compostos por moléculas de galactose ligada à glicose por meio de ligações glicosídicas com configuração β , tendo-se principalmente de tri a hexassacarídeos com 2 a 5 unidades de galactose, respectivamente, embora seu GP possa variar entre 2 a 8 moléculas de galactose (SAKO, MATSUMOTO, TANAKA, 1999; LOO et al, 1999) (Figura 2). Na literatura, o termo transgalactooligossacarídeos (TOS) é utilizado como sinônimo de GOS (NIITTYNEN, KAJANDER, KORPELA, 2007).



* n = número de unidades de galactose

Figura 2. Exemplo de estrutura química dos galactooligossacarídeos (β -D-galactopiranosil-[(1 \rightarrow 6)- β -D galactopiranosil]_{n-1}-(1 \rightarrow 4)- α -D glicopiranosose)

Tanto os GOS como os frutanos tipo inulina descritos anteriormente são resistentes à digestão pelo organismo humano porque no TGI não há enzimas para hidrolisar as ligações com configuração β presente entre seus monômeros de

galactose e frutose, respectivamente; sendo portanto reconhecidos como oligossacarídeos não-digeríveis (ONDs) (MUSSATO & MANCILHA, 2007).

Porém, algumas bactérias do intestino grosso expressam hidrolases específicas para romper aquele tipo de ligação, sendo capazes de converter esses compostos em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), tais como acetato, butirato, lactato e propionato, que podem ser utilizados pelo organismo hospedeiro para diversas finalidades e geralmente estão ligados aos benefícios à saúde que podem ser produzidos por estes prebióticos; além de gases (H_2 , CO_2 , CH_4), por meio do processo de fermentação (DELZENNE, 2003). A fermentação envolve uma variedade de reações e processos metabólicos para degradação microbiana anaeróbia de matéria orgânica, e por meio da mesma, além dos produtos finais já mencionados, também é produzida a energia metabolizável necessária para a manutenção e crescimento de tais bactérias (WONG et al, 2006).

2.2 Ocorrência em alimentos e processos de obtenção de oligofrutose e GOS

Os FOS (ou oligofrutose) são encontrados naturalmente em diversos alimentos de origem vegetal, tais como alho, chicória, alcachofra, aspargo, cebola, trigo (BORNET et al, 2002) banana, beterraba (PASSOS & PARK, 2003) e yacon (GOTO et al, 1995). Na tabela 1 pode-se verificar o teor deste oligossacarídeo em alguns destes alimentos.

Tabela 1. Ocorrência de oligofrutose em alguns alimentos (adaptado de Roberfroid, Gibson, Delzenne, 1993).

Fonte	Oligofrutose (%)
Banana	0,3 - 0,7
Centeio	0,5 - 1,0
Alho-poró	2,5 - 8,0
Trigo	1,0 - 4,0
Alho	3,5 - 6,5
Raízes de chicória	8,0 - 11,0
Aspargo	2,0 - 3,0
Alcachofra de Jerusalém	12,0 - 15,0
Cebola	1,1 - 7,5
Dente - de - leão	9,5 - 12,0

A oligofrutose também pode ser produzida em escala comercial por meio de duas técnicas, que resultam em produtos finais sutilmente diferentes (FRANCK, 2002).

A primeira delas consiste na hidrólise enzimática parcial da inulina usando uma endo-inulinase (EC 3.2.1.7), a qual resulta em uma mistura de cadeias lineares de β -D-frutose com e sem a molécula de α -D-glicose, na qual o GP geralmente varia de 2 a 7 com uma média de 4 unidades (ROBERFROID, 2005). Após a purificação e evaporação do produto, obtém-se o xarope de oligofrutose. Na produção de oligofrutose em pó, o produto passa pelo processo de *spray-drying* (FRANCK, 2002). A mistura resultante é comercializada em diversos graus de pureza pela Orafiti Ltda, da Bélgica, ou como Frutafit, produzida pela Imperial-Suikner Unie, da Holanda (PASSOS, PARK, 2003).

A segunda forma para obtenção de FOS (oligofrutose) envolve sua produção a partir da sacarose utilizando enzimas microbianas que apresentam

atividade de transfrutossilatação. Essas são tradicionalmente denominadas β -frutofuranosidases (EC 3.2.1.26), porém atualmente muitos pesquisadores se referem às mesmas enzimas quando aplicadas na produção de FOS como frutossiltransferases (FTases) (EC 2.4.1.9), visando enfatizar sua atividade de síntese e distinguí-las da nomenclatura de enzimas hidrolíticas (FERNÁNDEZ et al, 2004).

Nesta reação, a sacarose (GF) em altas concentrações serve como substrato no qual 1, 2 ou 3 moléculas adicionais de frutose são adicionadas, formando novas ligações β -(1 \rightarrow 2) (ROBERFROID, 2007b). Deste modo, inicialmente tem-se a produção de 1-kestose (GF₂), seguida de 1-nistose (GF₃) e por fim de 1-frutofuranosil nistose (GF₄), sendo estes três compostos considerados FOS (SANGEETHA, RAMESH, PRAPULLA, 2005). As diferenças no produto final quando comparado a oligofrutose obtida a partir da hidrólise da inulina são presença de molécula inicial de glicose (já que na síntese por transfrutossilatação, a sacarose é o substrato para a reação) e GP entre 2 e 4, com média de 3,6, (ROBERFROID, 2007b).

A maior parte das FTases são produzidas por fungos como *Fusarium* spp, *Aspergillus* spp e *Aureobasidium* spp, porém poucas delas apresentam potencial para aplicação na indústria em função de uma baixa atividade de transfrutossilatação (FERNÁNDEZ et al, 2004). No ramo industrial, tem-se principalmente a aplicação da FTase do fungo *Aspergillus Niger* (KAUR, GUPTA, 2002, ROBERFROID, 2005). O produto preparado por reação de transfrutossilatação em resíduos de sacarose é produzido pela Meiji Seika Ltda (Tóquio, Japão), e

comercializado como Neosugar, Profeed, Meioligo, ou Nutraflora. O Actilight também é produzido desta maneira, sendo comercializado na Europa pela Béghin Meiji Industries (PASSOS & PARK, 2003).

A figura abaixo mostra os processos de obtenção da oligofrutose e dos demais frutanos mencionados anteriormente.

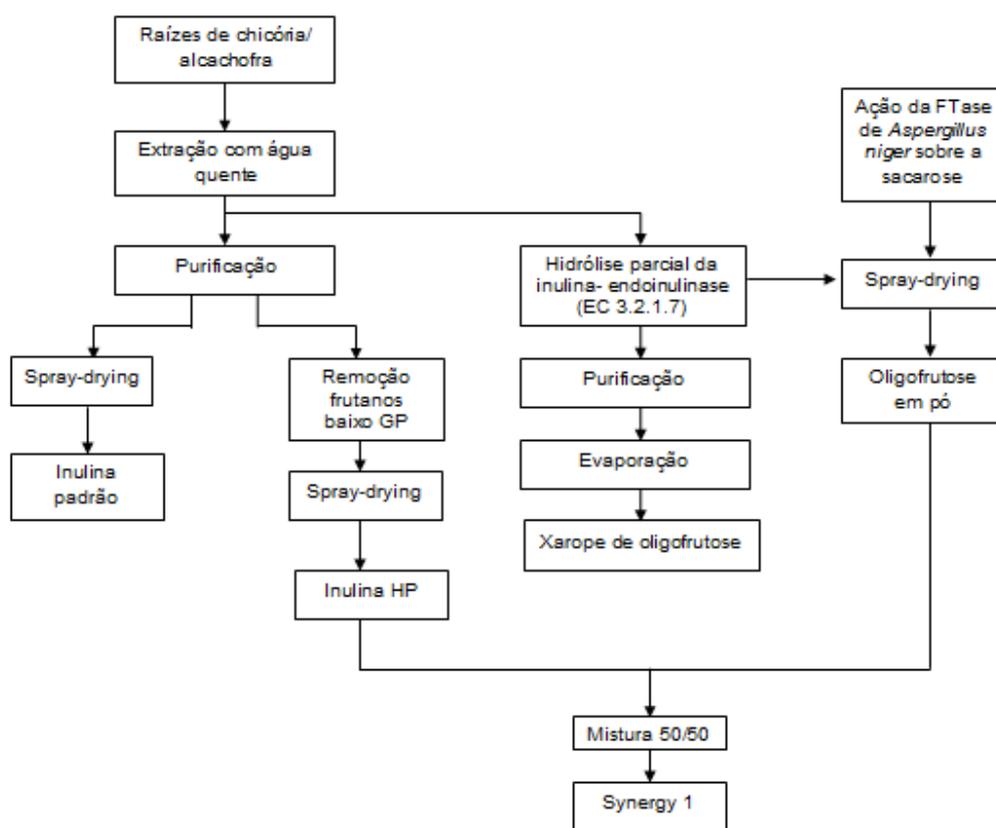


Figura 3. Processo de produção industrial de inulina, oligofrutose e seus derivados (Adaptado de Franck, 2002).

Os GOS são produzidos comercialmente a partir da lactose, utilizando a β -galactosidase (EC 3.2.1.23) isolada de diversos micro-organismos (CRITTENDEN, 1996).

Essa enzima já é utilizada na indústria de alimentos para catalisar a hidrólise de lactose em glicose e galactose na manufatura de produtos lácteos (MAHONEY, 1998). O desenvolvimento de novos produtos que não contenham lactose em sua composição é extremamente relevante, uma vez que a eliminação da lactose no leite é necessária para resolver o problema de intolerância a lactose, que atinge aproximadamente 70% da população mundial (PESSELA et al, 2003).

Todavia, o sítio ativo dessa enzima possui habilidade tanto para hidrolisar a lactose como para transgalactosilar a galactose (MARTINS, BURKERT, 2009), e é essa atividade de transgalactosilação que leva a produção dos GOS. O fator que mais afeta a ocorrência de uma atividade ou outra da enzima é a concentração inicial da galactose utilizada como substrato para reação, sendo que a reação de hidrólise predomina em baixas concentrações de lactose, enquanto a atividade de transgalactosilação com a formação de GOS prevalece em altas concentrações desse dissacarídeo. Isso ocorre porque os grupos β -galactosil irão apresentar uma maior probabilidade de se ligar a lactose ao invés de água como aceptor a medida que se aumenta as concentrações desse dissacarídeo (ALBAYRAK, YANG, 2002).

Deste modo, uma solução altamente concentrada de lactose, a qual é usualmente purificada do soro do leite de vaca, é utilizada como substrato na produção de GOS. O tipo de ligação entre as unidades de galactose depende das enzimas utilizadas. As ligações glicosídicas entre duas unidades de galactose são principalmente β 1-4 (4'-GOS) quando são utilizadas β -galactosidades de *Bacillus circulans* ou *Cryptococcus laurentii*, enquanto com o uso de enzimas derivadas de *Aspergillus oryzae* ou *Streptococcus thermophilus* predominam ligações β 1-6 (6'-

GOS). Na figura 4 está ilustrado o processo de produção industrial dos galactooligossacarídeos (SAKO, MATSUMOTO, TANAKA, 1999).

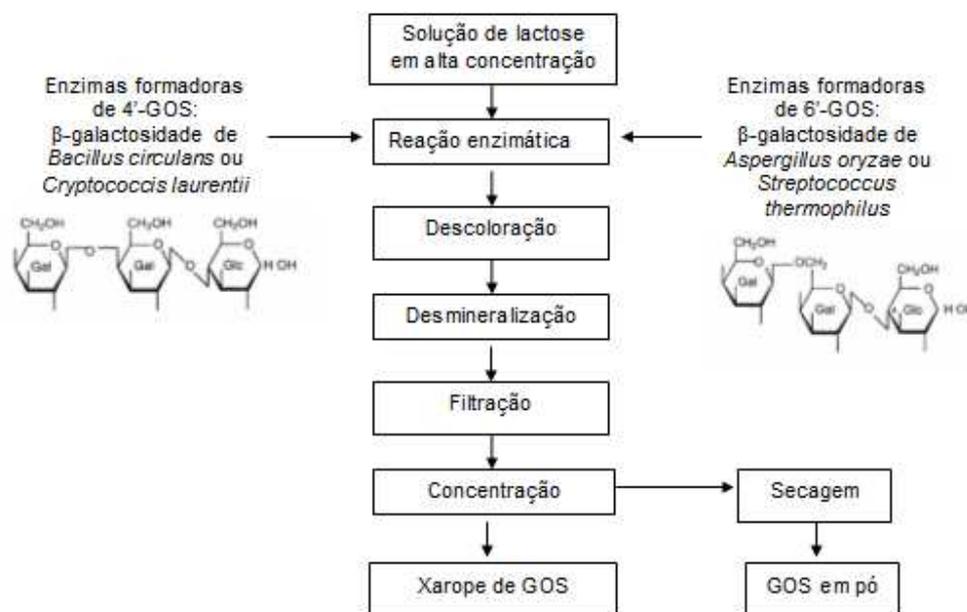


Figura 4. Produção industrial de galactooligossacarídeos (adaptado de Sako, Matsumoto, Tanaka, 1999).

2.1.3 Utilização de oligofrutose e GOS na indústria de alimentos

A oligofrutose apresenta uma boa estabilidade durante o processamento de alimentos. Sua incorporação aos mesmos proporciona tanto a melhoria da qualidade sensorial como uma composição nutricional mais balanceada, por esta constituir uma fibra dietética e conter poucas calorias (1,0-1,5 cal/g) (FRANCK, 2002).

A oligofrutose (ou FOS) possui propriedades funcionais tecnológicas similares às do açúcar ou xaropes de glicose, porém apresenta as vantagens de conferir os benefícios nutricionais mencionados acima. É mais solúvel do que o

açúcar e apresenta de 30 a 50% de seu poder adoçante. Ela é utilizada como agente de corpo e para redução da sinerese em produtos lácteos, como umectante em produtos de panificação macios, para diminuir o ponto de congelamento de sobremesas congeladas, conferir crocância a biscoitos com baixo teor de gordura e como ligante em barras de cereais. Frequentemente, os FOS também são empregados em combinação com edulcorantes de alto poder adoçante para substituir o açúcar, resultando em um perfil adoçante bem balanceado, e para mascarar o sabor residual do aspartame e acessulfame-K. Também é importante ressaltar que os frutanos não são cariogênicos, uma vez que não são utilizados pela bactéria *Streptococcus mutans*, responsável pelo aparecimento de cáries (KAUR, GUPTA, 2002).

Além dessas aplicações, a oligofrutose vem sendo cada vez mais utilizada como ingrediente prebiótico em alimentos industrializados com alegação de propriedades funcionais, principalmente em produtos lácteos (FRANCK, 2002).

Os GOS, em função de sua alta estabilidade em condições ácidas e altas temperaturas, podem ser aplicados sem se decompor em grande variedade de alimentos. Esses carboidratos são utilizados como adoçantes em produtos lácteos, pães, geléias, produtos de confeitaria e bebidas. Durante a fermentação de leveduras e na assadura de pães, os GOS não são hidrolisados, resultando em um pão de excelente textura e sabor. Nos produtos lácteos, sua utilização também é devido a suas propriedades prebióticas (SAKO, MATSUMOTO, TANAKA, 1999).

Atualmente, tanto os GOS como os frutanos tipo inulina com GP>10, também são utilizados em fórmulas infantis na proporção 9:1 (BOEHM et al, 2005), visando mimetizar a concentração, a distribuição de tamanho das moléculas e composição química de oligossacarídeos presentes no leite materno, assim como o efeito bifidogênico dos mesmos (MORO et al, 2002). Tal efeito seria de grande importância porque tem sido demonstrado que a presença de uma microbiota intestinal caracterizada pela predominância de bifidobactérias nos bebês que recebem leite materno está ligada à maior proteção contra micro-organismos que causam infecções gastrintestinais, à maior tolerância a alérgenos alimentares, e ao melhor desenvolvimento e maturação do sistema imune verificados nestes lactentes quando comparados àqueles que recebem fórmulas infantis sem prebióticos ou leite de vaca (HARMSEM et al, 2000). Esses últimos possuem uma microbiota intestinal caracterizada por quantidades levemente menores de bifidobactérias, porém números muito maiores de micro-organismos potencialmente nocivos, tais como algumas bactérias pertencentes ao gênero *Clostridium* e *Enterocci* (MACFARLANE, MACFARLANE, 2008), tendo-se também a existência de *Bacteroides* (HARMSEM et al, 2000).

Embora ainda não empregada na indústria alimentícia, a atividade de transgalactosilação da β -galactosidase de outros micro-organismos vem sendo explorada em instituições de pesquisa, tais como a da enzima produzida por *Scopulariopsis* sp (SANTOS, SIMIQUELI, PASTORE, 2009), cuja aplicação resultou na obtenção do GOS que será utilizado neste estudo, com 28% de pureza.

2.1.4 Efeitos benéficos à saúde associados ao consumo de oligofrutose e GOS

Os benefícios associados ao consumo de oligofrutose e GOS para os quais se têm evidências bem consistentes são a redução do risco de câncer de cólon, alívio da constipação, modulação positiva do sistema imune, prevenção da colonização do intestino por patógenos, aumento da absorção de minerais como cálcio e magnésio (GIBSON et al, 2004, SWEENEN, 2006, SHOTERMAN, 2001) e melhoria da saúde óssea (CHONAN, MATSUMOTO, WATANUKI, 1995, WEAVER, 2005, SHOLZ-AHRENS et al, 2007).

2.2. TECIDO ÓSSEO

2.2.1 Caracterização do tecido ósseo

O osso é composto de 20 a 40% de compostos orgânicos, 50 a 70% de inorgânicos, 5 a 10% de água e menos de 3% de lipídeos (CLARKE, 2008).

A parte orgânica ou matriz extracelular é constituída principalmente de fibras de colágeno do tipo I, as quais correspondem a 90% da mesma. Além disso, na parte orgânica estão presentes proteoglicanas e proteínas não colágenas como glicoproteínas, sialoproteínas, fosfoproteínas e osteocalcina, que juntamente com as anteriores constituem 98% dos compostos orgânicos do osso. Os outros 2% correspondem às células ósseas, fatores de crescimento e citocinas, que desempenham um papel essencial na homeostase óssea (POST et al, 2010).

Já a parte inorgânica contém 99% do cálcio presente em nosso organismo, o qual é encontrado predominantemente na forma de cristais de hidroxiapatita, os quais são sais insolúveis de cálcio e fósforo ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) que atuam como reservatório destes íons (MOE, CHEN, 2008), além de conferir rigidez aos ossos (CASHMAN, 2002). Os cristais de hidroxiapatita constituem o principal componente mineral ósseo. Também são encontrados carbonato, fluoreto, ácido fosfórico, magnésio e citrato em pequenas quantidades (SAFADI et al, 2009).

As células importantes na biologia óssea são os osteoclastos, osteoblastos e osteócitos (ROBLING, CASTILLO, TURNER, 2006).

Os osteoclastos são células gigantes contendo ao redor de 4 a 20 núcleos. Estes são derivados de células tronco hematopoiéticas presentes na medula óssea, as quais dão origem as primeiras células precursoras de osteoclastos, denominadas unidades formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM), que podem dar origem tanto as células osteoclásticas como a monócitos e granulócitos. Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção óssea, a qual ocorre por meio da secreção de íons de hidrogênio com acidificação do meio, que resulta na desmineralização da matriz extracelular; e secreção de enzimas proteolíticas como catepsinas e collagenases, que degradam a parte orgânica do osso (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003, DUQUE & TROEN, 2008).

Os osteoblastos se originam de células tronco mesenquimais locais, as quais se proliferam e se diferenciam em preosteoblastos e depois em osteoblastos maduros, além de dar origem a outros tipos celulares como os adipócitos e células

estromais da medula óssea. Os osteoblastos são as células formadoras do osso, sendo responsáveis pela síntese de nova matriz extracelular orgânica (osteóide), além de participarem do processo de mineralização da mesma (CLARKE, 2008). Essas células podem formar vesículas extracelulares, nas quais se concentram moléculas ligantes de cálcio e fosfatases, as quais causam uma elevação de Ca^{+2} e PO_4^{-3} no interior destas estruturas, respectivamente. Quando tal elevação excede a solubilidade destes íons, ocorre sua precipitação, com formação dos cristais de hidroxiapatita, que são liberados na matriz orgânica colágena circundante, na qual há concentrações suficientes de cálcio e fósforo para permitir a nucleação de novos cristais de hidroxiapatita a partir dos cristais iniciais, com propagação da mineralização óssea (ANDERSON, 2005). Estas células também podem formar vesículas intracelulares contendo fosfato de cálcio na forma amorfa (não cristalina), que seria liberado na matriz extracelular, onde ocorreria sua cristalização (MAHAMID et al, 2011).

Uma vez que os osteoblastos são circundados pela matriz óssea que eles mesmos sintetizaram, estes passam a denominar-se osteócitos, que correspondem de 90 a 95% das células ósseas, dando suporte à estrutura do osso. Essas células ocupam espaços denominados lacunas e estão envolvidas na sinalização celular, comunicando-se por meio de canalículos entre si e com os osteoblastos para auxiliar na homeostase óssea, especialmente na regulação da ativação local da formação óssea em resposta a cargas mecânicas (SAFADI et al, 2009).

Existem dois tipos de tecido ósseo: o osso cortical, que constitui 80% do esqueleto, é rígido e compacto e corresponde à diáfise dos ossos longos e à

parte mais externa de todas as estruturas ósseas; e o osso trabecular, de estrutura esponjosa e menos densa, presente no interior das extremidades (epífises) dos ossos longos, e em maiores quantidades nas vértebras, na pélvis e em outros ossos chatos (HADJIDAKIS & ANDROULAKIS, 2006).

2.2.2 Fisiologia do tecido ósseo na idade adulta: processo de remodelação óssea

O osso é um órgão dinâmico, sendo a sua remodelação um processo predominante e contínuo no esqueleto a partir da idade adulta. Por meio desta, os ossos cortical e trabecular são constantemente renovados pela remoção localizada do osso antigo (reabsorção) seguida pela síntese de nova matriz protéica e subsequente mineralização para formar novo osso no local onde a reabsorção ocorreu (CHAN, DUQUE, 2002, CLARKE, 2008). Esse processo ocorre em conjuntos microscópicos de células chamados de Unidades Multicelulares Básicas de Remodelação Óssea (“Basic Multicellular Unit” - BMU), sendo caracterizado pelo acoplamento das funções dos osteoclastos e osteoblastos (AMADEI et al, 2006).

O osso trabecular é metabolicamente mais ativo e remodelado em taxas mais elevadas do que o cortical (25% por ano *versus* 3%, respectivamente) (WATTS, 1999). Essa diferença nas taxas de remodelação entre o osso cortical e trabecular explica porque doenças metabólicas como a osteoporose são observadas principalmente em ossos com maior quantidade de osso trabecular, como coluna vertebral, quadril, e antebraço distal (LERNER, 2006).

A remodelação óssea está dividida em 4 etapas: ativação, reabsorção, reversão e formação óssea. A ativação envolve o recrutamento de células precursoras, sua diferenciação em osteoclastos e ativação destas células para darem início à fase de reabsorção (RAISZ, 2005, AMADEI et al, 2006).

Nesta primeira etapa, as CFU-GM geradas a partir das células tronco hematopoiéticas irão sofrer um processo de fusão para dar origem aos osteoclastos multinucleares maduros, o qual é induzido principalmente pela ativação do receptor ativador do fator nuclear Kappa β (RANK) presente na membrana destas células pela citocina ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa β (RANK-L) (ASAGIRI, TAKAYANAGI, 2007). Essa última pertence à família do fator de necrose tumoral (TNF), e é produzida principalmente pelos osteoblastos, linfócitos e células estromais presentes na medula óssea (POST, 2010), podendo apresentar-se em duas formas: como uma proteína transmembrana das células que a expressam ou em uma forma solúvel de menor peso molecular, originada a partir da clivagem da primeira (KHOSLA, 2001).

Os osteoclastos maduros também expressam RANK em sua membrana, e a interação do mesmo com a RANK-L leva a ativação destas células para iniciar a etapa de reabsorção, a qual acontece conforme descrito anteriormente na função dos osteoclastos. Além disso, a interação RANK-RANK-L nos osteoclastos maduros contribui para o aumento da sua sobrevivência. Assim, a RANKL pode aumentar a reabsorção óssea *in vivo*. A osteoprotegerina (OPG) é uma proteína solúvel que também é secretada pelas células osteoblásticas e estromais encontradas no tecido ósseo e possui afinidade para se ligar a RANK-L, impedindo deste modo sua ligação ao receptor RANK. Ao neutralizar a RANK-L, a

OPG regula negativamente a gênese de osteoclastos, a ativação de osteoclastos maduros, além de levar a uma sobrevivência reduzida deste tipo celular, bloqueando a reabsorção óssea *in vivo* (BOYLE, SIMONET, LACEY, 2003).

Evidências indicam que algumas citocinas, como a interleucina 6 (IL-6), também são importantes reguladores da reabsorção óssea (MCLEAN, 2009). Apesar de haver dois estudos *in vitro* que demonstram que esta citocina pode desempenhar um papel na diferenciação de osteoblastos e serem anti-apoptóticas para essas células (TAGUCHI et al, 1998), outras inúmeras pesquisas *in vitro* e *in vivo* indicam que o principal papel desta citocina no osso envolve seus efeitos na gênese de osteoclastos com aumento da reabsorção óssea (LÖWIK et al, 1989, ROODMANN, 1992, YONEDA, 1993, JILKA, 1992, O'BRIEN, 2000.)

A IL-6 é produzida pelos mais diversos tipos celulares, sendo os principais os macrófagos e monócitos (SILVA, 2006). No tecido ósseo, as principais fontes desta citocina são os osteoblastos e as células tronco mesenquimais. Além disso, estudos têm demonstrado que são os receptores nos osteoblastos aqueles necessários para que a IL-6 estimule a diferenciação dos osteoclastos (STEEVE et al, 2004). Pesquisas têm demonstrado que a IL-6 estimula a formação e função de osteoclastos por meio de sua ligação com seus receptores nas células estromais ou osteoblásticas, induzindo, deste modo, a expressão de RANK-L nestas células. Além disso, a IL-6 pode aumentar o número de osteoclastos por meio da estimulação da proliferação dos precursores hematopoiéticos deste tipo celular: as CFU-GM (O'BRIEN et al, 2000). Mais recentemente, ainda foi verificado que essa citocina é capaz de induzir a formação de osteoclastos em

cultura de células humanas precursoras deste tipo celular independentemente da presença de RANK-L (KUDO et al, 2003).

Outro fator importante que pode influenciar a remodelação óssea ainda na fase de reabsorção é o paratormônio (PTH). Este desempenha um papel central na homeostase de cálcio, sendo responsável pela manutenção de níveis normais (fisiológicos) da forma livre deste mineral no líquido extracelular. (KHANAL, NEMERE, 2008). As concentrações de cálcio extracelular são mantidas dentro de uma variação normal por meio de uma secreção contínua, porém levemente variável deste hormônio (TALMAGE, MOBLEY, 2008).

Baixas concentrações séricas de cálcio são detectadas por receptores sensível ao cálcio (CaR) nas glândulas paratireoidianas, tendo-se a indução da síntese e secreção do PTH, o qual é capaz de restaurar o cálcio extracelular ao normal por meio do desencadeamento de uma série de ações: estimulação da reabsorção renal deste mineral e da expressão da enzima CYP27B1 nestes órgãos, a qual resulta na produção da forma ativa da vitamina D (calcitriol ou 1,25 dihidroxivitamina D₃ [1,25(OH)₂D₃]); além da promoção da gênese de osteoclastos. Neste caso, o papel endócrino da forma ativa da vitamina D seria aumentar a absorção intestinal do cálcio dietético via transporte transcelular (ANDERSON, MAY, MORRIS; 2003). A indução da osteoclastogênese mediada por este hormônio se daria indiretamente, por meio de uma maior expressão de RANK-L e redução da OPG. Portanto, as consequências seriam aumento da formação de osteoclastos, maior ativação e sobrevivência destas células, com

consequente aumento da reabsorção óssea (MA et al, 2001; THEILL, BOYLE, PENNINGER,02).

Quando as concentrações séricas de cálcio são restauradas, tem-se a supressão da síntese e secreção do PTH, estando tanto o cálcio como o calcitriol envolvidos no desencadeamento deste sinal de *feed back* negativo nas glândulas paratireoidinas (ANDERSON, MAY, MORRIS; 2003).

Quando a reabsorção do osso pelos osteoclastos naquela BMU está completa, tendo esse processo duração de cerca de 3 a 5 semanas em humanos, eles sofrem apoptose (fase de reversão) e os osteoblastos são atraídos para a área de osso escavada para formar o novo osso, tendo-se a última fase do processo de remodelação (CANALIS et al, 2007).

Estes osteoblastos se proliferam por meio da ação dos fatores de crescimento liberados por eles mesmos ou encontrados na matriz óssea, sendo os mais importantes o fator de crescimento fibroblástico (FGF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF) I e II e o fator de crescimento transformante-beta (TGF-beta), o qual também media a atração destas células para a área de reabsorção (AMADEI et al, 2006).

As ações dos osteoblastos e a subsequente finalização de seqüência de remodelação por meio da mineralização da matriz levam de 3 a 5 meses no caso dos humanos, podendo estas células sofrerem apoptose ou então serem envolvidas pela matriz mineralizada para dar origem aos osteócitos (CANALIS et al, 2007).

2.2.3 Efeitos de intervenções dietéticas em propriedades ósseas

Ainda, é importante ressaltar neste capítulo que intervenções dietéticas podem ter efeitos em parâmetros ósseos, (tais como densitometria, histologia e força óssea), o que geralmente requer um período de ingestão crônica, uma vez que o ciclo completo de remodelação óssea leva ao redor de 4 meses em humanos, conforme exposto acima, e cerca de 1 mês no rato (WEAVER, 2005). Idealmente, intervenções dietéticas com alimentos funcionais devem compreender de 3 a 4 ciclos completos para poder-se constatar seu impacto na densidade mineral óssea (WEAVER, LIEBMAN, 2002).

2.3 OSTEOPOROSE E PERDA ÓSSEA APÓS A MENOPAUSA

A osteoporose é uma doença esquelética sistêmica caracterizada por baixa massa e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, com conseqüente aumento da fragilidade do osso e da sua susceptibilidade a fraturas (KANIS et al, 2008). Esta resulta de um balanço ósseo negativo, no qual a reabsorção é maior que a formação óssea (SUZUKI et al, 2008).

A doença é diagnosticada quando a densidade mineral óssea (DMO) observada é 2,5 desvios padrão (DP) menor que o valor médio esperado para o adulto jovem saudável de mesmo gênero (PIETSCHMANN, 2009), quando se tem como grupo populacional em questão homens com idade superior a 50 anos e mulheres menopausadas. O número de DP da média de adultos jovens é definido

como T-escore, o qual neste caso é igual ou inferior a (-2,5) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1994).

Ainda segundo a World Health Organization (1994), para o diagnóstico da osteoporose, tal valor de T-escore pode ser constatado em qualquer um dos seguintes sítios ósseos: quadril ou fêmur proximal (colo femoral e fêmur total), coluna lombar (L1-L4), ou na impossibilidade de aferição dos dois anteriores, no rádio distal. Quando os valores de T-score estão entre (-1,01) e (-2,49), tem-se o estágio inicial da perda óssea, denominado osteopenia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1994).

Uma baixa DMO areal é um importante componente do risco de fraturas ósseas, uma vez que é o maior determinante da força óssea intrínseca. Assim, o uso de medidas de DMO para o diagnóstico de osteoporose é ao mesmo tempo uma forma de avaliar o risco para ocorrência das mesmas (KANIS et al, 2000), sendo que é nas fraturas que reside a grande relevância desta doença (KANIS et al, 2008), conforme abordaremos mais adiante.

Também é importante colocar que vem sendo recomendado que o diagnóstico dessa doença seja feito preferencialmente no quadril, uma vez que a DMO neste sítio, além de prognosticar com grande confiabilidade o risco de ocorrência de fraturas neste local, também prediz o risco de outras fraturas osteoporóticas tão bem ou melhor que medidas de densitometria nos outros sítios (KANIS et al, 2000).

Alguns fatores são considerados de risco para a osteoporose, tais como um baixo pico de massa esquelética adquirida durante o crescimento até o início da vida adulta (SLEMENDA et al, 1997), menopausa precoce, idade avançada,

fatores genéticos como sexo feminino, etnia branca e história familiar da doença, algumas inadequações dietéticas como baixa ingestão de cálcio e consumo excessivo de cafeína, a qual aumenta a excreção deste mineral, além aspectos comportamentais relacionados a um estilo de vida inadequado como sedentarismo, consumo excessivo de bebida alcoólica e tabagismo (GUERRA, PRADO, 2010).

Atualmente, a prevalência de osteoporose nos países desenvolvidos é estimada em cerca de 40% nas mulheres na sexta década de vida, e após os 80 anos a doença chega a afetar aproximadamente 70% da população feminina (LEEMING et al, 2006).

No Brasil, embora essa seja a doença osteometabólica mais comum, o número de estudos sobre sua prevalência é pequeno (FRAZÃO, NAVEIRA, 2006). Costa-paiva et al (2003), em estudo de corte transversal em que foram avaliados prontuários de mulheres acompanhadas no Ambulatório de Menopausa do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas, constataram que a prevalência de osteoporose na coluna lombar da população em questão foi de 14,7%, e de osteopenia, 38%, ao passo que no colo do fêmur correspondeu a 3,8 e 32,7%, respectivamente. Camargo et al (2005), em estudo com homens e mulheres idosos acompanhados pelo Centro de Estudos do Envelhecimento da Universidade Federal de São Paulo, constatou uma prevalência de osteoporose e de osteopenia na população feminina de 33,2% e 36,6%, respectivamente, quando considerada a DMO da coluna lombar, e de 22,2% e 56,5%, quando analisada a DMO do colo do fêmur.

Apesar de o diagnóstico basear-se na determinação da DMO, a grande relevância da osteoporose está ligada às fraturas, conforme já adiantado (KANIS et al, 2008). Os locais mais comuns de fraturas causadas por esta doença são as vértebras, quadril e pulso (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003). As mesmas estão associadas com dor de grande intensidade, altos custos para seu tratamento, além de poderem causar incapacitação, com prejuízos na capacidade de locomoção, na habilidade de cuidar de si mesmo, e aumento da mortalidade. Conseqüentemente, tem-se um enorme impacto econômico para a sociedade e na qualidade de vida e saúde destes pacientes (SAHAP, GUNAL, KORKUSUZ, 2006).

Embora todas as fraturas resultem em algum grau de morbidade, aquelas que afetam o quadril têm sido associadas com o pior prognóstico (HARVEY, DENNISON, COOPER, 2010). Aproximadamente 50% dos idosos com fraturas no quadril não recupera sua total independência e mais de 20% falece dentro de 6 meses. Com o envelhecimento da população mundial, observa-se um aumento da prevalência da doença, e assim os impactos causados pela mesma vêm tomando dimensões ainda maiores, de modo que a osteoporose hoje constitui um importante problema de saúde e socioeconômico em todo o mundo (COXAM, 2005).

Dentre os fatores de risco para a osteoporose mencionados no início deste tópico, será focado e discutido com maior profundidade nesta dissertação o gênero feminino. Nas mulheres, novos achados indicam que a perda de osso trabecular se inicia na terceira década de vida (RIGGS et al, 2008), por mecanismos ainda pouco entendidos mas que parecem envolver o próprio

envelhecimento e o estresse oxidativo associado a este (MANOLAGAS, 2010). Todavia, tal perda é bastante acentuada pela queda de estrógenos na menopausa (hormônio esteróide produzido pelos folículos ovarianos durante o ciclo menstrual da mulher que se cessa nesta etapa), enquanto a perda de osso cortical somente terá início após esse período (KHOSLA, MELTON, RIGGS, 2011).

Em função do exposto no parágrafo anterior, as mulheres na menopausa apresentam o maior risco para o desenvolvimento da osteoporose (RAISZ, 2005), especialmente quando a perda óssea é acompanhada dos fatores genéticos, nutricionais e comportamentais anteriormente citados (DUQUE, TROEN, 2008; DELMAS, 2008).

A perda óssea é mais rápida e intensa na primeira década após a menopausa, quando a deficiência de estrógenos faz com que a reabsorção óssea aumente desproporcionalmente quando comparada ao processo de formação (RIGGS, KHOSLA, MELTON, 2002).

Tal deficiência hormonal conduz a elevação da frequência de ativação das BMUs, que corresponde ao número de novas BMUs ativadas em determinada unidade de tempo e é causado pelo aumento da formação de osteoclastos. Como resultado, tem-se uma aceleração da taxa de remodelação ou *turnover* ósseo nas mulheres na menopausa (WEITZMANN, PACIFI, 2006). Como a duração da fase de reabsorção óssea é curta e o período necessário para que os osteoblastos sintetizem novo tecido ósseo é longo, conforme já mencionado no capítulo anterior, esse aumento da taxa de remodelação conduz a perda óssea (RAISZ, 2005).

O aumento do *turnover* ósseo com predomínio do processo de reabsorção sobre a formação foi claramente demonstrado no estudo de Garnero et al (1996). Comparando-se os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo de mulheres na pré-menopausa e menopausadas, foi constatado que marcadores de reabsorção óssea (telopectídeo C terminal de colágeno do tipo I e telopectídeo N terminal de colágeno do tipo I) aumentaram em aproximadamente em 88% após a menopausa, enquanto os de formação (osteocalcina e fosfatase alcalina óssea) aumentaram apenas 45%.

Além do aumento das taxas de remodelação óssea, têm-se que a deficiência estrogênica aumenta a sobrevivência dos osteoclastos em cada BMU (EGHBALI-FATOURECHI et al, 2003). Com o aumento da sobrevivência destas células, tem um prolongamento da fase de reabsorção que obrigatoriamente antecede a formação nas BMUs, e ambos os eventos contribuem para um aumento da profundidade da erosão óssea em cada unidade (PACIFI, WEITZMAN, 2006). Tem-se, deste modo, um desequilíbrio na remodelação: geralmente o osso reabsorvido é repostado por quantidade equivalente de novo osso em cada BMU, porém a maior reabsorção em cada BMU faz com que a quantidade formada seja menor que a reabsorvida, causando um aumento da profundidade da erosão e perda óssea (COMPSTON, 2001).

Na literatura científica, já foram apontados alguns mediadores parácrinos da perda óssea induzida pela deficiência de estrógenos (EGHBALI-FATOURECHI et al, 2003). Um aumento da liberação de IL-6 foi constatado tanto após a menopausa como ovariectomia (HUGUES, BOYCE, 1998), sendo que essa citocina, conforme mencionado em capítulo anterior, contribui para aumentar o

pool de CFU-GM além de estimular a expressão de RANK-L em células estromais e osteoblásticas, e conseqüentemente a diferenciação e ativação de osteoclastos (O'BRIEN et al, 2000). A ovariectomia é a remoção dos ovários visando induzir a menopausa cirurgicamente (POLI et al, 1994, GENNARI et al, 1990); quando roedores são utilizados como modelo, se tem a mimetização da perda de osso trabecular após a menopausa, a qual é resultante do aumento do *turnover* ósseo em função da deficiência estrogênica produzida e é revertida com a reposição deste hormônio, podendo este modelo experimental ser utilizado para avaliar o potencial de agentes em prevenir a perda óssea associada à menopausa em sítios com grande quantidade deste tipo de tecido ósseo (tíbia proximal, fêmur distal e vértebras) (THOMPSON, et al, 1995), embora ainda haja controvérsias sobre a utilidade do mesmo em mimetizar a perda de osso cortical que ocorre após a menopausa (THOMPSON et al 1995, KALU, 1991).

A importância da IL-6 em mediar a perda óssea causada pela depleção de estrógenos parece ser de tal dimensão que no estudo de Jilka e colaboradores (1992), a infusão de um anticorpo para neutralizar os efeitos dessa citocina em camundongos ovariectomizados preveniu o aumento do número de CFU-GM e da formação de osteoclastos característicos da deficiência estrogênica, e posteriormente, no estudo de Poli et al (1994), foi verificado que camundongos *knockout* para IL-6 ovariectomizados não apresentaram aumento de CFU-GM, de *turnover* ósseo e nem perda de osso trabecular.

Com relação a RANK-L, Eghbali-Fatourehchi et al (2003), ao realizarem estudo para determinar se essa ligante desempenharia um papel como mediador do aumento da reabsorção óssea em mulheres na fase inicial após a menopausa,

constataram um aumento da expressão desta citocina em células da medula óssea deste grupo populacional, a qual apresentou uma correlação direta com o aumento de marcadores de reabsorção óssea e inversa com as concentrações séricas de estradiol.

Quanto a OPG, apesar de Khosla et al (2002) não terem encontrado uma correlação entre os níveis séricos desta citocina e os de estrogênio em mulheres antes e após a menopausa, Mesquita-Raya et al (2005) demonstraram que menores concentrações de OPG circulante estão significativamente e positivamente correlacionadas com uma menor densidade mineral óssea (DMO) e existência de fraturas nas vértebras de mulheres na menopausa, tendo-se atualmente que a OPG possui validade como marcador do metabolismo ósseo neste grupo populacional.

Apesar dos recentes avanços na prevenção farmacológica da osteoporose, mulheres na menopausa que optam por não utilizar terapia de reposição hormonal ou com outros fármacos permanecem em risco para o desenvolvimento dessa doença, havendo portanto a necessidade de encontrar outras estratégias para manter a saúde óssea nesta população (HOLLOWAY, 2007).

Além disso, é importante ressaltar que as terapias disponíveis podem estar associadas a vários efeitos adversos a saúde, tais como um maior risco de infartos, câncer de mama (GRADY, 2003), trombose venosa, câncer endometrial (RIGGS, HARTMANN, 2003) e ocorrência de dores musculoesqueléticas crônicas (RIZOLLI et al, 2011).

Em ratas, foi verificado que a perda significativa de osso trabecular relacionada ao envelhecimento tem início entre 8 a 12 meses de vida (WRONSKI et al, 1989, LI et al, 1991). Embora se considere que a menopausa não ocorra em roedores, uma vez que seu ciclo ovulatório não inclui menstruação (VOM SAAL, FINCH, NELSON, 1994), Sakamoto et al (2005) constataram uma redução significativa de 29% nos níveis séricos de estrógeno em ratas de 62 semanas quando comparadas à ratas de 11 semanas de idade. No estudo de Wynne et al (2004), a diminuição dos níveis de estrógenos atingiu 45% quando comparadas ratas de 16 meses com de 12 semanas.

2.4 AÇÃO DA OLIGOFRUTOSE E GOS DURANTE A PERDA ÓSSEA NO GÊNERO FEMININO

Tendo em vista a população de estudo da presente dissertação, esta revisão irá focar as evidências disponíveis na literatura científica sobre a possibilidade de um efeito da oligofrutose e GOS na perda óssea no gênero feminino.

Em 1995, Chonan, Matsumoto e Watanuki realizaram estudo para avaliar o efeito do consumo de GOS na absorção de cálcio e prevenção da perda óssea em ratas ovariectomizadas. Foram utilizados 4 grupos de animais (n=9): ratas de 4 semanas de idade ovariectomizadas que receberam dieta AIN-76 com formulação padrão (controle ovariectomizado), ratas de 4 semanas de idade ovariectomizadas que receberam dieta AIN-76 contendo 5% de GOS produzido com o emprego de β -galactosidase de *Bacillus circulans* e 99% de pureza em substituição de parte da

sacarose, ratas submetidas a cirurgia *sham* ou controle (sem remoção dos vários) que receberam dieta AIN-76 padrão (controle *sham*) e ratas submetidas a cirurgia *sham* que receberam dieta contendo 5% de GOS. O ensaio biológico teve duraao de 30 dias. A absorao aparente de cálcio foi determinada após 8 a 10 dias, 18 a 20 dias e 28 a 30 dias de experimento. O fêmur e a tíbia dos animais foram analisados quanto ao seu peso seco, peso de cinzas e conteúdo de cálcio. Foi constatado no estudo que as ratas com cirurgia *sham* que consumiram dieta com GOS apresentaram uma maior absorao aparente de cálcio após 8 a 10 dias e 18 a 20 dias quando comparadas ao respectivo grupo controle com cirurgia *sham*, não havendo diferença significativa nesta após 28 a 30 dias. Já nas ratas ovariectomizadas que receberam a raao com GOS foi verificado um aumento significativo da absorao desse mineral apenas após 8 a 10 dias quando comparadas ao seu controle.

A ovariectomia produziu uma reduao do peso seco, peso das cinzas e conteúdo de cálcio tanto na tíbia como no fêmur dos animais do estudo. Quando o GOS foi administrado às ratas ovariectomizadas, foi verificado um aumento significativo do peso das cinzas do fêmur e peso das cinzas e conteúdo de cálcio da tíbia, indicando que a ingestão deste oligossacarídeo contribuiu para prevenir a perda mineral óssea neste grupo. Nas ratas com cirurgia *sham* que receberam GOS tambem foram verificados benefícios nos parâmetros ósseos analisados, havendo um aumento significativo do conteúdo de cálcio no fêmur e no peso das cinzas da tíbia.

Outros achados interessantes deste estudo foram aumento do peso cecal total, peso da parede cecal e do conteúdo cecal das ratas OVT suplementadas

com GOS quando comparadas ao seu respectivo controle, além de uma redução do pH cecal e maior *pool* de ácidos graxos de cadeia curta neste segmento do intestino grosso. Todos esses resultados foram colocados como importantes fatores que poderiam ter contribuído para a maior absorção de cálcio nestes animais, uma vez que Younes et al (1993), estudando outros tipos de carboidratos fermentáveis, verificaram que a redução do pH provocada pela produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ácido lático durante a fermentação microbiana levou ao aumento da quantidade de cálcio na forma solúvel. Além disso, o maior tamanho do ceco estaria relacionado ao aumento da superfície de absorção intestinal disponível pra o cálcio. Estudos anteriores já haviam constatado que os ácidos graxos de cadeia curta, em especial o butirato, apresentam efeitos tróficos neste segmento intestinal, estimulando a proliferação das células epiteliais cecais (SCHEPPACH et al, 1992, KRIPKE et al, 1989). Ainda, foi constatado que os AGCC poderiam elevar a absorção de cálcio no intestino grosso via transporte transcelular uma vez que os mesmos são protonados no lumen intestinal para serem absorvidos, atravessando a membrana apical das células epiteliais intestinais por difusão. Uma vez dentro das células, ocorreria a dissociação dos AGCC em função do pH intracelular, com a liberação de prótons (H⁺) que são secretados da célula em troca de Ca²⁺ luminal por meio de carreadores Ca⁺/H⁺ da membrana apical (LUTZ, SCHARRER, 1991).

Na conclusão, os autores afirmam que o aumento da absorção de cálcio nos períodos de 8 a 10 dias e 18 a 20 dias de experimento provavelmente suportou um melhor desenvolvimento ósseo nos animais com cirurgia *sham*

suplementados com GOS, ou seja, a maior quantidade de cálcio absorvida teria sido retida no osso.

Ainda, os autores supuseram que o fato de o efeito dos galactooligossacarídeos na absorção de cálcio ter se tornado mais fraco ao longo do tempo tanto nas ratas com cirurgia controle como nas ovariectomizadas poderia ter ocorrido devido a um “status” de cálcio superior nos animais que receberam GOS, o qual provavelmente seria o responsável pelos efeitos benéficos verificados no metabolismo ósseo dos animais suplementados com este composto. Porém, como o balanço deste mineral não foi avaliado no presente estudo e no caso das ratas ovariectomizadas e com perda óssea foi constatado um aumento de absorção deste mineral somente após 8 a 10 dias, poderia-se também ter-se a suposição de que os GOS reduziram de alguma forma a reabsorção óssea, ou até mesmo a ocorrência das duas hipóteses concomitantemente.

Van den Helven, Margriet e Mujis, em 2000, realizaram um estudo para avaliar o efeito da ingestão de transgalactooligossacarídeos (TOS) na absorção verdadeira de cálcio de mulheres na menopausa, a partir do qual pode-se postular que estes compostos poderiam ter um efeito benéfico no metabolismo ósseo deste grupo populacional, embora não se tenha avaliado diretamente parâmetros ósseos e o período de consumo dos ONDs tenha sido pequeno.

No estudo, 14 mulheres na menopausa há pelo menos 5 anos foram orientadas a consumir 200 mL de um iogurte contendo GOS ou placebo (sacarose) durante 9 dias. O estudo foi do tipo duplo-cego, randomizado, e após os 9 dias de consumo do placebo ou GOS foi realizado um período de *washout* de 19 dias, com novo período de 9 dias de ingestão do prebiótico ou placebo (9

períodos de tratamento). A ingestão do OND foi aumentada gradualmente durante os 9 dias visando evitar sintomas de intolerância gastrointestinal, sendo fornecidos iogurtes com diferentes teores de GOS ao longo do estudo. Assim, no primeiro e no segundo dia foi fornecido iogurte formulado de modo a resultar no consumo de 10g de GOS por dia, do terceiro ao quarto dia na ingestão de 15g diárias de GOS e do quinto ao nono dia, foi oferecido iogurte formulado de modo a ter-se a ingestão 20g deste OND a partir dos 200mL diários. As mulheres foram orientadas a manter seu hábito alimentar normal, no qual estavam inclusos produtos lácteos, e não variar muito sua dieta no período, devendo-se todavia excluir o consumo de alimentos contendo prebióticos e probióticos.

Como principais achados do estudo, tem-se que a absorção de cálcio foi significativamente maior com o consumo de GOS, sendo a magnitude do aumento de aproximadamente 16% ($23,9 \pm 6,9\%$ com consumo do OND *versus* $20,6 \pm 7,0\%$ com o tratamento controle); mas que essa maior absorção de cálcio não foi acompanhada por um aumento na excreção urinária deste mineral. Para os autores, isso significou que os GOS também poderiam aumentar a retenção de cálcio no osso e/ou inibir a reabsorção óssea, tendo-se colocado a necessidade de mais estudos para esclarecer essas questões, a qual é respaldada inclusive pelos achados anteriores de Chonan et al (1995).

Posteriormente, Netto (2009) desenvolveu um estudo para avaliar o efeito da suplementação dietética de 5% de um composto contendo GOS por 3 meses no metabolismo ósseo de ratas Wistar de 10 meses de idade. O produto com GOS utilizado por Netto (2009) foi similar ao do presente estudo (produzido por *Scopulariopsis sp*, 28% de pureza). Dois grupos de 10 animais cada receberam ou

uma dieta AIN-93M padrão (controle) ou a dieta AIN-93M com substituição de 5% da sacarose por 5% do produto contendo GOS. Os parâmetros analisados incluíram a área óssea, conteúdo mineral ósseo e densidade mineral óssea da coluna lombar, da vértebra L3, da mandíbula e do eixo do quadril, diáfise e fêmur inteiro dos animais, a morfometria do fêmur, histomorfometria da tíbia e as concentrações séricas de diversos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. Esses corresponderam a osteocalcina, que é um marcador de formação óssea, o telopeptídeo C terminal de colágeno do tipo I, o qual constitui um marcador de reabsorção, o PTH, e citocinas envolvidas na regulação da reabsorção óssea, que foram a RANK-L e a OPG.

Como principais resultados, teve-se que o consumo deste OND foi capaz de aumentar significativamente o conteúdo mineral ósseo e a densidade mineral óssea da coluna lombar, a densidade mineral óssea da vértebra L3, a largura do colo do fêmur e o volume ósseo da tíbia dos animais. Todavia, não houve diferença significativa entre os grupos com relação as concentrações de todos os índices bioquímicos analisados. A autora concluiu que o consumo de GOS contribuiu para reduzir a perda de osso trabecular decorrente do envelhecimento nas ratas de 10 meses de vida. Porém, haveria a necessidade de mais estudos para estabelecer os possíveis mecanismos, os quais deveriam tomar o cuidado de não deixar as ratas em jejum antes da eutanásia, pois isso poderia interferir nas análises bioquímicas, como por exemplo no caso da determinação do PTH.

Já com relação aos dados de estudos com uso de oligofrutose em animais com perda óssea, tem-se que em 2002, Sholz-Ahrenz, Açil e Schrenzeimeir desenvolveram um ensaio biológico em que foram avaliados os efeitos a longo

prazo da suplementação de dietas com diferentes doses de oligofrutose (95% de pureza) e teor recomendado de cálcio (5g/kg) no tangente ao balanço deste mineral, a estrutura e arquitetura trabecular no terço proximal da tíbia analisadas por meio da histomorfometria baseada na técnica de microradiografia, e ao conteúdo de cálcio na coluna vertebral e no fêmur; utilizando como modelo ratas Fisher-344 ovariectomizadas de 5 meses.

Serão discutidos nesta dissertação os resultados referentes a 5 grupos de animais utilizados no estudo (n=13-14): G1= ratas com operação sham que receberam dieta semi-purificada sem suplementação de oligofrutose, G2 = ratas OVT que receberam dieta sem suplementação de oligofrutose, G3 = ratas OVT que receberam dieta com suplementação de 2,5% de oligofrutose, G4 = ratas OVT que receberam dieta com suplementação de 5% de oligofrutose, G5 = ratas OVT que receberam dieta com suplementação de 10% de oligofrutose. O ensaio biológico teve duração de 16 semanas, tendo-se hipotizado que a oligofrutose impediria a perda óssea mineral induzida pela ovariectomia e preservaria a arquitetura do osso trabecular por estimular a absorção de cálcio. Os balanço deste mineral foi realizado após 8, 12 e 14 semanas de experimento.

Comparando-se os grupos G1 e G2 para avaliação dos efeitos da ovariectomia, não foi constatada uma diferença significativa entre os mesmos com relação ao conteúdo de cálcio da coluna vertebral e do fêmur. Todavia, este procedimento cirúrgico levou a redução significativa da área óssea trabecular e perímetro trabecular da tíbia dos animais, demonstrando que a intervenção dietética neste experimento se deu em um modelo animal com perda de osso

trabecular induzida pela ovariectomia, a qual mimetiza aquela verificada na fase inicial após a menopausa.

Foi constatado que somente nos animais que receberam a maior dose de oligofrutose (10%) houve um aumento do conteúdo de cálcio no fêmur quando comparados ao grupo ovariectomizado que não recebeu oligofrutose (G2). Nesses animais também foi verificado um aumento significativo da absorção e retenção de cálcio na oitava semana de experimento, sendo que nos outros dois grupos a dose de OLF foi insuficiente para estimular significativamente a absorção e retenção deste mineral. Em nenhum dos grupos suplementados o conteúdo de cálcio na coluna vertebral foi alterado.

Ainda, no tangente a arquitetura do osso trabecular, a dose mais baixa (2,5% - G3) e a mais alta (10% - G5) de oligofrutose aumentaram de forma significativa a área trabecular com relação ao grupo controle G2, prevenindo a perda de área óssea induzida pela ovariectomia. O valor médio encontrado para este parâmetro no grupo de animais suplementados com a dose intermediária do prebiótico (5% - G4) foi similar aos dos grupos que receberam suplementação com baixa e alta dose de OLF. O efeito da dose de 5% de oligofrutose não foi estatisticamente significativo por ter ocorrido uma maior variação dentro do grupo. A maior área trabecular óssea com a menor dose de OLF se deu em função do aumento da espessura trabecular; enquanto para a suplementação com média e alta dose do OND, a maior área trabecular foi devido a um aumento significativo do perímetro trabecular, sendo que nestes grupos também foi prevenida a perda de perímetro trabecular induzida pela ovariectomia. É importante destacar que a ocorrência de tais efeitos benéficos no tecido ósseo trabecular com as menores

doses (2,5% e 5%) de OLF se deu mesmo na ausência de efeitos estatisticamente significativos das mesmas na absorção e retenção de cálcio, sendo que pelos achados do presente estudo, não foi possível detectar o mecanismo pelas quais esses benefícios foram obtidos.

Assim, as principais conclusões deste estudo foram:

- a prevenção da perda de osso trabecular induzida pela ovariectomia no terço proximal da tíbia dos animais por meio do consumo de OLF está associada com diferentes arquiteturas, dependendo da dose de OND utilizada,

- quando consumida uma dieta com a quantidade de cálcio recomendada, a incorporação de 2,5% de oligofrutose foi suficiente para prevenir a perda de osso trabecular na tíbia dos animais ovariectomizados, sendo verificado um efeito adicional no conteúdo de cálcio no fêmur quando consumida a maior dose, a qual foi a única a conduzir um aumento na absorção e retenção de cálcio. De modo geral, tem-se que o aumento na absorção de minerais como o cálcio, produzido pelos ONDs, está relacionado ao aumento da forma solúvel em função da redução do pH no intestino grosso, e ao aumento da superfície disponível para a absorção mineral como consequência do efeito trófico destes compostos na mucosa cecal e colônica (PEREZ-CONESA, LÓPEZ, ROS, 2007), além de provavelmente se ter um efeito direto dos AGCC em elevar a absorção de cálcio no intestino grosso via transporte transcelular (LUTZ, SCHARRER, 1991), conforme já mencionado anteriormente neste capítulo na descrição de estudos com GOS.

Para o FOS em específico, também foi demonstrado que este é capaz de induzir o aumento de calbindina-D9k - proteína que se liga ao cálcio para mediar a difusão deste mineral através do citoplasma da célula a partir da membrana apical

até a basolateral - por estimular a expressão de receptor de vitamina D (VDR) no intestino grosso de ratos (FUKUSHIMA et al, 2005), além de aumentar a expressão de receptores de potencial transitório tipo vanilóide 6 (TRPV6) – canais mediadores da entrada de cálcio na membrana apical da célula - neste mesmo segmento intestinal via a produção de butirato e propionato, tendo-se novamente um efeito independente de calcitriol na absorção via transporte transcelular de cálcio (FUKUSHIMA, AIZAKI, SAKUMA, 2009).

Embora doses maiores de OLF possam conduzir a um maior benefício no metabolismo ósseo, é importante ressaltar que os próprios autores reconhecem que 10% constitui uma quantidade muito alta a ser incorporada na dieta humana, tendo-se utilizado a mesma por ser um estudo pioneiro com relação aos efeitos da OLF no metabolismo ósseo em ratas ovariectomizadas.

Todavia, Tahiri et al, em 2003, desenvolveram um estudo para avaliação do efeito do consumo de oligofrutose na absorção de cálcio e parâmetros relacionados ao metabolismo ósseo em mulheres menopausadas no qual foram obtidos achados que contrapuseram os resultados anteriores encontrados por Sholz-Ahrens, Açil e Schrenzeimeir (2002), inclusive de que haveria a possibilidade de benefícios no tecido ósseo com o consumo de oligofrutose em fase de perda óssea decorrente da deficiência de estrógenos mesmo na ausência de um aumento significativo da absorção e status deste mineral.

Nesse último estudo, 12 mulheres na menopausa há pelo menos dois anos, sem receber terapia de reposição hormonal, consumiram por 5 semanas 10g/dia de FOS ou placebo (sacarose), tendo-se então um período de *washout* de 3 semanas, e novamente o consumo de um dos tratamentos por 5 semanas. O

estudo foi duplo-cego, e o FOS ou placebo foram fornecidos em sachês contendo 5g do produto em pó, devendo as participantes consumirem 5g no almoço e 5 g no jantar.

Foi solicitado aos sujeitos do estudo a manterem seu hábito alimentar normal, evitando-se consumir produtos contendo FOS ou suplementos minerais e vitamínicos. No meio de cada período experimental as mulheres realizaram diário alimentar de 4 dias, sendo verificado que durante os tratamentos a ingestão de cálcio foi de cerca de 900mg, a qual é próxima, porém, um tanto inferior ao valor de ingestão adequada para este mineral das atuais recomendações nutricionais para esta faixa etária e gênero, que corresponde a 1200mg/dia.

Dentre os parâmetros avaliados neste estudo, foram determinadas a absorção verdadeira e aparente de cálcio, cálcio plasmático, excreção urinária deste mineral, além dos níveis de paratormônio e de dois marcadores do metabolismo ósseo: um de formação, que foi a osteocalcina, e um de reabsorção, a deoxipiridinolina. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para todos os parâmetros mencionados acima. Deste modo, pode-se inferir que possivelmente este OND não possuiria um efeito benéfico no metabolismo ósseo quando considerada a população deste estudo.

Por outro lado, em modelo animal, foram obtidas novamente evidências de que a oligofrutose poderia ter efeitos benéficos para a atenuação de perda óssea. Netto (2009) desenvolveu experimento com ratas Wistar de 10 meses de idade em que foi analisado o efeito da suplementação de 5% de oligofrutose (fornecida pela empresa Orafiti) durante 2 meses nos seguintes parâmetros: área óssea, conteúdo mineral e densidade mineral óssea do fêmur e da mandíbula, propriedade

biomecânicas da diáfise do fêmur, morfometria do fêmur, histomorfometria do osso trabecular da metáfise da tíbia e concentrações séricas de PTH, osteocalcina, telopeptídeo C terminal de colágeno do tipo I, RANK-L, OPG e cálcio total. O grupo controle (n=10) recebeu uma dieta AIN93-M padrão, e o suplementado (n=10), uma dieta AIN-93M com 5% de oligofrutose em substituição de parte da sacarose. O consumo de oligofrutose aumentou significativamente a densidade mineral óssea do eixo do quadril, a largura do colo do fêmur e o volume ósseo da metáfise da tíbia. Além disso, foi verificado que a suplementação levou a uma redução significativa dos níveis de PTH e cálcio sérico total, o que poderia indicar a possibilidade de maior retenção deste mineral no osso, e também das concentrações de RANK-L e OPG. Não houve diferença significativa entre os grupos para os demais parâmetros analisados. Deste modo, tem-se que a suplementação de oligofrutose contribuiu para diminuir a perda óssea associada ao envelhecimento em ratas de 10 meses, porém mais estudos seriam necessários para elucidar os mecanismos envolvidos.

Considerando a grande importância de se encontrar compostos que possam atenuar a perda óssea em função do aumento da prevalência e das graves conseqüências que podem advir da osteoporose, a divergência de resultados encontrados na literatura com relação à possibilidade de um impacto da suplementação de oligofrutose para minimizar a perda óssea, a necessidade colocada acima de elucidação dos mecanismos envolvidos na promoção de efeitos benéficos destes ONDs na saúde óssea, e a escassez de trabalhos com modelos experimentais mimetizando uma perda óssea fisiológica em função da idade e da deficiência de estrógenos; o presente estudo terá como objetivo avaliar

o efeito do consumo de GOS, oligofrutose e de uma mistura na proporção 1:1 de compostos contendo esses oligossacarídeos por 16 semanas no metabolismo ósseo de ratas Wistar na meia-idade. Essa avaliação será realizada por meio da determinação das concentrações séricas de marcadores bioquímicos relacionados à regulação da reabsorção óssea, das propriedades biomecânicas do fêmur e da densitometria da coluna lombar de ratas na meia-idade.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito da oligofrutose, dos GOS e da combinação 1:1 desses produtos no metabolismo ósseo de ratas Wistar na meia-idade.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da oligofrutose, dos GOS e da combinação dos produtos contendo esses ONDs na proporção 1:1 no metabolismo ósseo de ratas Wistar na meia-idade por meio da determinação das concentrações séricas de PTH, OPG, RANK-L e IL-6, da análise da área óssea, conteúdo mineral ósseo e densidade mineral óssea da coluna lombar, e das propriedades biomecânicas do fêmur.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

No ensaio biológico, foram utilizadas ratas da linhagem Wistar na meia-idade, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB). O termo meio-idade faz referência a roedores de 10 a 20 meses de vida (VOM SAAL, FINCH, NELSON, 1994). As ratas (n=32) foram obtidas com 49 semanas de idade e criadas até completarem 57 semanas. Durante esse período de envelhecimento, as ratas foram alimentadas com dieta comercial padrão (Labina-Purina).

Posteriormente, os animais foram divididos em 4 grupos de modo que o peso corporal médio dos grupos ficasse semelhante. Esses corresponderam aos seguintes tratamentos: grupo 1 = dieta AIN-93M padrão; grupo 2 = dieta com oligofrutose; grupo 3 = dieta com GOS; grupo 4 = dieta com oligofrutose + GOS (1:1), tendo essa etapa do experimento duração de 16 semanas. O peso dos animais durante esta etapa foi monitorado uma vez por semana e o consumo de ração duas vezes, sendo a alimentação e água oferecidas *ad libitum*.

O tempo de ensaio foi escolhido de acordo com informações descritas nos estudos de Wronski et al, 1989, Li et al, 1991, Wynne, 2004 e Sakamoto, 2005, os quais constataram perda óssea significativa associada ao envelhecimento e deficiência de estrógenos nas mesmas condições descritas.

Ao final desse período, os animais foram mortos por decapitação. O sangue foi coletado em tubos de polipropileno e permaneceu 2 h à temperatura

ambiente para coagulação, sendo realizada centrifugação por 20 min a 1000xg para obtenção do soro, conforme estabelecido no protocolo dos kits para as análises séricas ou orientado por representantes das empresas. O soro obtido foi separado em diferentes alíquotas, visando evitar ciclos de descongelamento e recongelamento de amostras para a execução dos kits, as quais foram armazenadas a temperatura de -80 °C. O fêmur esquerdo e a coluna vertebral de cada um dos animais foram retirados, embalados ainda envoltos em tecido mole em papel alumínio, e congelados a -20°C.

Durante todo o experimento, as ratas foram mantidas em gaiolas individuais, à temperatura ambiente de $21 \pm 1^\circ\text{C}$ e o ciclo de 12h/dia e 12h/noite. Este ensaio biológico foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP (protocolo nº 2213-1), com emissão de certificado (Anexo 1).

4.2 Prebióticos

A oligofrutose utilizada neste estudo foi fornecida pela empresa ORAFTI (Active Food Ingredients, Bélgica). Foi usada a oligofrutose P95 Beneo Orafti, a qual é obtida a partir da hidrólise parcial da inulina, possuindo 50^º B e grau de polimerização de 2 a 8. O produto é composto por 95% de oligofrutose e 5% de glicose, frutose e sacarose.

Os GOS foram fornecidos pelo Laboratório de Bioaromas da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, sendo obtidos utilizando a atividade de transgalactosilação da β -galactosidase (EC 3.2.1.23) produzida por

Scopulariopsis sp. O produto final apresentava 55° B e composição de 28% de galactooligossacarídeos, 50% de lactose, 15% de galactose e 7% de glicose.

4.3 Dieta

Durante a fase experimental de 16 semanas, foi oferecida aos animais uma dieta formulada do tipo AIN-93M como padrão e modificada de acordo com os tratamentos propostos, com substituição de 50% da sacarose por GOS, FOS ou a combinação destes, conforme descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Composição da dieta AIN-93M (Reeves et al, 1993) modificada de acordo com os tratamentos propostos.

Ingredientes	Dieta padrão	Dieta c/ FOS	Dieta c/ GOS	Dieta c/
	AIN-93M (g/kg de dieta)	(g/kg de dieta)	(g/kg de dieta)	GOS + FOS (1:1) (g/kg de dieta)
Amido de milho	465,7	465,7	465,7	465,7
Caseína (≥85% proteína)	140,0	140,0	140,0	140,0
Amido de milho dextrinizado (90-94%)	155,0	155,0	155,0	155,0
Sacarose	100,0	50,0	50,0	50,0
OLF	-	50,0	-	25,0
GOS	-	-	50,0	25,0
Óleo de soja	40,0	40,0	40,0	40,0
Celulose	50,0	50,0	50,0	50,0
Mix mineral (AIN-93M-MX)	35,0	35,0	35,0	35,0
Mix vitamínico (AIN-93-VX)	10,0	10,0	10,0	10,0
L-Cistina	1,8	1,8	1,8	1,8
Bitartrato colina (41,1% colina)	2,5	2,5	2,5	2,5
Butilhidroquinona	0,008	0,008	0,008	0,008

4.4 Densitometria óssea

A área (AO), conteúdo mineral (CMO) e densidade mineral óssea (DMO) da coluna lombar dos animais foram mensurados utilizando-se equipamento de absorciometria por dupla emissão de raios-X - Lunar iDXA (General Electric

Company, Waukesha, WI, USA). Para tal, a coluna vertebral dos animais foi disposta em água deionizada, selecionando-se a área de interesse (vértebras L1-L4) para obtenção dos três parâmetros acima (LI et al, 2010).

4.5 Ensaio mecânico

Após limpos, os fêmures esquerdos foram envoltos em compressas embebidas em solução salina fisiológica e novamente congelados a -20°C . Os ossos mantidos nas compressas com salina foram descongelados por 12 horas a temperatura ambiente, sendo então realizado ensaio de flexão em três pontos na diáfise dos fêmures (CARVALHO, LOUZADA, RIZO, 2007), utilizando-se a Máquina Universal de Ensaio modelo DL2000 (EMIC, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil).

No ensaio, os fêmures foram apoiados em suas extremidades sobre dois suportes distanciados 18mm, com a parte anterior voltada para cima, respeitando-se o vão mínimo necessário para garantir a acurácia do teste, que corresponde a 15 mm para ratas adultas (TURNER, BURR, 1993). A carga foi aplicada no meio da diáfise a uma velocidade de 5mm/min até ocorrência da fratura (CARVALHO, LOUZADA, RIZO, 2007), tendo-se utilizado célula de carga de 500N (NEERUP et al, 2011). Durante todo o tempo de realização dos ensaios, os ossos permaneceram em gazes embebidas em solução fisiológica, sendo retirados apenas no momento em que seriam submetidos ao teste mecânico.

4.6 Análises bioquímicas

A interleucina-6 (IL-6), osteoprotegerina (OPG) e ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa β (RANKL) foram dosados no soro dos animais por meio de reações do tipo antígeno/anticorpo com kits do tipo Luminex (Millipore / RCYTO-80K/Rat Cytokine Panel; Millipore / RBN-31K-1OPG; Millipore / RBN-31K-1RANKL, respectivamente). Os resultados desta análise são baseados em sinais de fluorescência, obtendo-se a concentração desta citocina em cada amostra a partir da comparação com a intensidade de fluorescência de uma curva de padrões com concentrações conhecidas.

O PTH foi dosado no soro dos animais com kits do tipo ELISA (Uscn / E90866Ra). Os testes Elisa baseiam-se em reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas. No kit utilizado, tem-se uma reação de inibição competitiva entre o PTH e um anticorpo monoclonal específico dirigido contra o antígeno presente na placa. Após a adição de um conjugado contendo peroxidase ligada a um outro anti-corpo para detectar as ligações antígeno-anticorpo formadas, a quantidade de conjugado ligada é inversamente proporcional a concentração de PTH na amostra. Logo, depois da adição de uma solução com substrato para a enzima, a intensidade da coloração desenvolvida é inversamente proporcional a concentração de PTH. Os resultados da leitura são expressos em absorbância, obtendo-se a concentração desta citocina em cada amostra a partir da comparação com os valores de absorbância de uma curva de padrões com concentrações conhecidas.

4.7 Tratamento estatístico

Na análise estatística dos resultados, utilizou-se o teste de Tukey para os dados paramétricos, e teste de Kruskal-Wallis para os dados não paramétricos. Foi utilizado o programa STATISCA 7 – StatSoft[®], considerando $p < 0,05$ como probabilidade mínima aceitável para diferença entre as médias. Os resultados foram expressos em médias \pm erro padrão da média (EPM) quando constituíram dados paramétricos, e em média quando não paramétricos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo se destinou à avaliação do efeito da ingestão de ONDs na saúde óssea de ratas de meia-idade.

Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos com relação ao consumo diário de dieta, peso corporal inicial e final, e consequentemente ganho de peso total dos animais (Tabela 2). Diferentemente deste estudo, Netto (2009) encontrou que o consumo de oligofrutose levou a um aumento estatisticamente significativo do peso final de ratas Wistar de 10 meses de idade. No tangente ao consumo diário de dieta, não houve diferença significativa entre o grupo controle e o suplementado com este OND no mesmo estudo. Netto (2009) também constatou que animais do grupo que recebeu uma dieta controle e aqueles suplementados com GOS não diferiram significativamente com relação ao peso corporal final e consumo diário de ração, corroborando nossos resultados. Em outras pesquisas desenvolvidas com roedores mais jovens do que aqueles deste estudo também foi encontrado que o consumo de dieta, o peso final ou ganho de peso total de animais saudáveis não são afetados pelo consumo de oligofrutose (TAKAHARA et al, 2000, SHOLZ-AHRENZ, AÇIL, SCHREZENMEIR, 2002, NZEUSSEU et al, 2006, KRUGER et al, 2006) e GOS (CHONAN, WATANUKI, 1996, PÉREZ-CONESA et al, 2006, WEAVER et al, 2011). Com relação a este último OND, Chonan, Matsumoto e Watanuki (1995) foram os únicos a encontrar um menor consumo de dieta em ratas ovariectomizadas com suplementação de GOS por 30 dias quando comparadas

as ovariectomizadas controle, porém não houve diferença significativa entre esses grupos com relação ao peso final.

Tabela 3. Consumo diário de dieta (g/dia), peso corporal inicial, final e ganho de peso total (g) durante o período de intervenção

	Controle	OLF	GOS	OLF + GOS	p
Consumo de dieta (g/dia)	18,28 ± 0,67	17,29 ± 0,44	17,64 ± 0,56	16,70 ± 0,78	0,07
Peso inicial (g)	323,79 ± 7,31	324,40 ± 7,14	327,10 ± 7,67	333,23 ± 12,51	0,87
Peso final (g)	355,36	361,07	349,04	373,53	0,95
Ganho de peso total (g)	31,7 ± 10,35	36,67 ± 10,28	28,64 ± 5,35	40,30 ± 14,05	0,86

Nas figuras 5, 6, 7 e 8 estão demonstrados os resultados das análises séricas deste estudo.

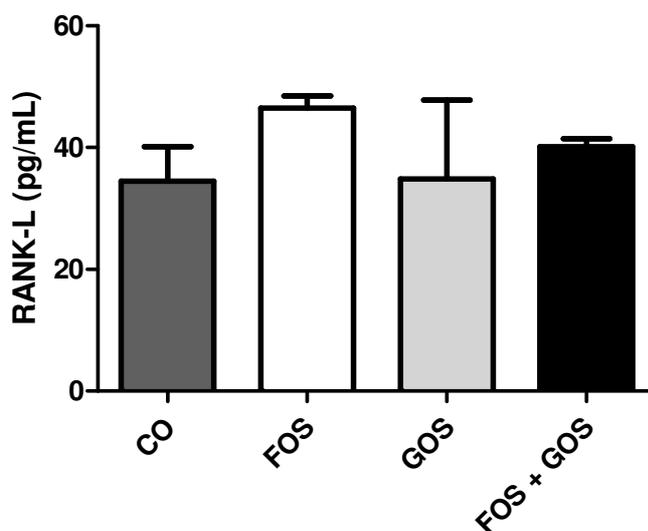


Figura 5. Concentração de RANK-L no soro dos animais, determinada por meio de reação do tipo antígeno/anticorpo com kits do tipo Luminex. Os resultados foram submetidos à análise de variância *one-way* seguida do teste de Tukey. Os valores acima estão expressos em concentração média (pg/mL) ± EPM.

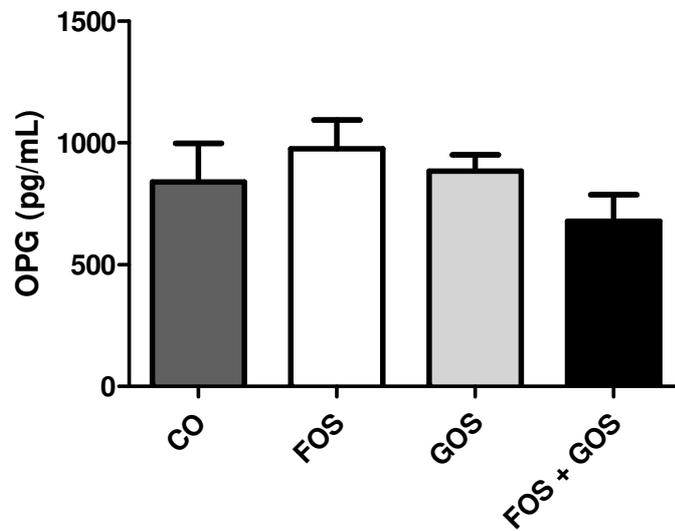


Figura 6. Concentração de OPG no soro dos animais, determinada por meio de reação do tipo antígeno/anticorpo com kits do tipo Luminex. Os resultados foram submetidos à análise de variância *one-way* seguida do teste de Tukey. Os valores acima estão expressos em concentração média (pg/mL) ± EPM.

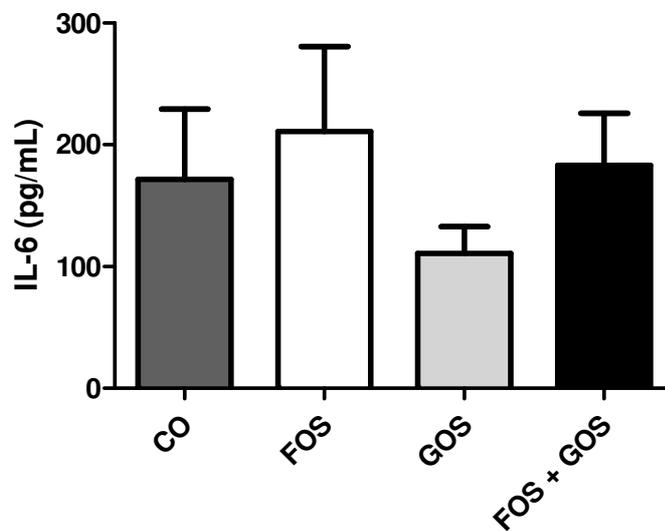


Figura 7. Concentração de IL-6 no soro dos animais, determinada por meio de reação do tipo antígeno/anticorpo com kits do tipo Luminex. Os resultados foram submetidos à análise de variância *one-way* seguida do teste de Tukey. Os valores acima estão expressos em concentração média (pg/mL) ± EPM.

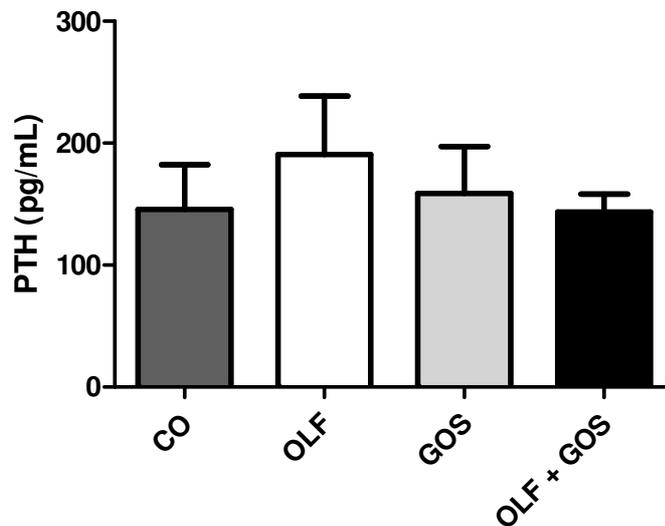


Figura 8. Concentração de PTH no soro dos animais, determinada com kit do tipo Elisa de competição. Os resultados foram submetidos à análise de variância *one-way* seguida do teste de Tukey. Os valores acima estão expressos em concentração média (pg/mL) \pm EPM.

Pode-se constatar que não houve diferença significativa entre os grupos com relação às concentrações de RANK-L (controle = $34,46 \pm 5,69$; oligofrutose = $46,50 \pm 1,96$; GOS = $34,86 \pm 14,46$; oligofrutose + GOS (mistura) = $40,14 \pm 1,34$ pg/mL; $p = 0,72$); OPG (controle = $837,04 \pm 174,63$; oligofrutose = $873,24 \pm 76,48$; GOS = $848,55 \pm 76,92$; mistura = $678,16 \pm 132,89$ pg/mL; $p = 0,47$), IL-6 (controle = $171,74 \pm 51,55$; oligofrutose = $210,90 \pm 58,96$; GOS = $110,81 \pm 18,71$; mistura = $183,01 \pm 32,33$ pg/mL; $p = 0,55$) e PTH (controle = $145,58 \pm 36,82$; oligofrutose = $190,84 \pm 40,35$; GOS = $158,79 \pm 32,62$; mistura = $143,60 \pm 12,48$ pg/mL; $p = 0,79$).

Em 2000, Van den Heuven, Margriet e Mujis realizaram um estudo para avaliar o efeito da ingestão de transgalactooligosacarídeos – termo sinônimo para GOS – na absorção verdadeira de cálcio de mulheres na menopausa, a partir do qual os autores postularam que estes compostos poderiam ter um efeito benéfico

no metabolismo ósseo. Foi constatado que a absorção de cálcio foi significativamente maior com o consumo de GOS por 9 dias, mas que esse aumento da absorção de cálcio não foi acompanhado por um aumento na excreção urinária deste mineral. Para os autores, uma das hipóteses para explicar tais achados seria que os GOS poderiam diminuir a reabsorção óssea. Em estudo anterior de 1995, Chonan, Matsumoto e Watanuki verificaram que a suplementação dietética com 5% de GOS de 99% de pureza por 30 dias preveniu a perda mineral óssea induzida pela ovariectomia. Os autores supuseram que o efeito benéfico no metabolismo ósseo seria conseqüente a um status superior de cálcio nos animais suplementados, uma vez que foi constatado um aumento da absorção deste mineral após 8 a 10 dias da intervenção com o OND. Porém, como o consumo de GOS não afetou a absorção de cálcio após 18 a 20 e 28 a 30 dias de experimento, poderia-se ter também a suposição feita por Van den Helven, Margriet e Mujis que os GOS reduziram de alguma forma a reabsorção óssea.

No presente estudo, foram dosadas três citocinas importantes para a regulação do processo de reabsorção óssea.

A RANK-L induz a fusão de CFU-GM para dar origem a osteoclastos multinucleares maduros (ASAGIRI, TAKAYANAGI, 2006), ativa essas células para darem início à reabsorção óssea e contribui para o aumento da sobrevivência das mesmas por meio da interação com o receptor RANK presente na membrana destes tipos celulares. A OPG possui afinidade para se ligar a RANK-L, impedindo deste modo sua ligação ao receptor RANK. Ao neutralizar a RANK-L, a OPG regula negativamente a gênese de osteoclastos, a ativação de osteoclastos

maduros, além de levar a uma sobrevivência reduzida deste tipo celular, bloqueando a reabsorção óssea *in vivo* (BOYLE, SIMONET, LACEY, 2007).

A IL-6 pode aumentar a formação, atividade e sobrevivência de osteoclastos por meio de sua ligação com seus receptores nas células estromais da medula óssea e osteoblastos com indução da expressão de RANK-L. Além disso, foi verificado que a IL-6 pode aumentar o número de osteoclastos por estimular a proliferação das CFU-GM (O'BRIEN, 2000), e que esta citocina é capaz de induzir a formação de osteoclastos em cultura de células humanas precursoras deste tipo celular independentemente da presença de RANK-L (KUDO et al, 2003).

A não existência de diferença estatística para as concentrações destas três citocinas fornece fortes evidências de que a gênese, atividade e sobrevivência dos osteoclastos, e provavelmente por consequência a reabsorção óssea, não foram afetadas pelo consumo de GOS no presente estudo. Deste modo, nossos resultados não respaldaram a suposição de Van den Helven, Margriet e Mujis (2000) de que os GOS poderiam diminuir a reabsorção óssea. Netto (2009), ao determinar as concentrações de RANK-L, OPG e de telopeptídeo C terminal de colágeno tipo I no soro de ratas de 10 meses de idade que receberam uma dieta padrão ou suplementada com 5% de GOS (28% de pureza), também não encontrou uma influência significativa do consumo deste OND nestes três parâmetros.

Além disso, o consumo de GOS não afetou as concentrações séricas de PTH. Este hormônio também pode influenciar a reabsorção óssea. A secreção de PTH é estimulada pela queda das concentrações de cálcio no fluido extracelular, e este hormônio leva ao desencadeamento de uma série de ações para restaurar

tais concentrações, dentre as quais está a promoção da gênese de osteoclastos (ANDERSON, MAY, MORRIS; 2003). A indução da osteoclastogênese mediada por este hormônio se daria indiretamente, por meio de uma maior expressão de RANK-L e redução da OPG. Portanto, as consequências seriam aumento da formação de osteoclastos, maior ativação e sobrevivência destas células, resultando no aumento da reabsorção óssea para liberar cálcio para a circulação (MA et al, 2001; THEILL, BOYLE, PENNINGER, 2002). Os resultados com relação as concentrações séricas deste hormônio permitem concluir que o consumo de GOS provavelmente não afetou o cálcio extracelular, e conseqüentemente não ocorreu alteração das concentrações de RANK-L, OPG e reabsorção óssea mediada pelo PTH. Da mesma forma, Netto (2009) não encontrou diferença significativa nas concentrações desse hormônio após a suplementação de 5% de GOS (28% de pureza) a ratas de 10 meses de idade.

Todavia, é importante ressaltar que uma menor pureza dos compostos utilizados em ambos os estudos pode ter contribuído para todos esses achados.

Com relação aos resultados obtidos com o consumo de oligofrutose, tem-se que os mesmos respaldam ao já exposto por alguns pesquisadores, ao mesmo tempo em que contrapõem alguns dos achados de outro. Tahiri et al (2003), ao estudar os efeitos da suplementação deste ONDs por 5 semanas em mulheres na menopausa, também não encontrou alteração significativa nos níveis séricos PTH. Além disso, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa para as concentrações urinárias de deoxipiridinolina, a qual constitui um marcador de reabsorção óssea, e de fato, no presente estudo, a suplementação de oligofrutose não alterou nenhuma das citocinas envolvidas com a regulação desse processo.

Todavia, Netto (2009) constatou que a suplementação de 5% de oligofrutose a ratas de 10 meses reduziu significativamente as concentrações séricas de RANK-L e PTH, marcadores que contribuem para aumentar a reabsorção óssea. Porém, as concentrações de OPG também diminuíram significativamente com o consumo deste OND, e os níveis de telopeptídeo C terminal de colágeno do tipo I (marcador de reabsorção) não foram afetados. Deste modo, ao fazer-se um balanço destas informações, possivelmente não teria ocorrido um impacto deste OND nas taxas de reabsorção óssea *in vivo*. Assim, apesar de os resultados para os marcadores bioquímicos terem diferido no estudo de Netto (2009) e no presente estudo, ambos foram indicativos de que as taxas de reabsorção óssea possivelmente não seriam afetadas pelo consumo de oligofrutose.

Também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no tangente a área óssea (AO - controle = $1,16 \pm 0,14$; oligofrutose = $1,19 \pm 0,14$; GOS = $0,97 \pm 0,03$; mistura = $1,12 \pm 0,07$ pg/mL; $p = 0,47$), conteúdo mineral (CMO - controle = $0,27 \pm 0,04$; oligofrutose = $0,27 \pm 0,04$; GOS = $0,20 \pm 0,01$; mistura = $0,26 \pm 0,03$ pg/mL; $p = 0,15$) e densidade mineral óssea (DMO - controle = $0,23 \pm 0,00$; oligofrutose = $0,23 \pm 0,01$; GOS = $0,21 \pm 0,00$; mistura = $0,22 \pm 0,01$ pg/mL; $p = 0,17$) (Figuras 9, 10 e 11). A AO pode ser definida como a área transversa da região óssea escaneada, expressa em centímetros quadrado (cm^2) (MØLGAARD et al, 1997). O CMO se refere a quantidade de mineral no sítio ósseo escaneado (KANIS et al, 2008) e é expresso como massa por região anatômica, tendo como unidade gramas (g). O CMO também pode ser referido como massa mineral óssea (MMO) (PRENTICE, PARSONS, COLE, 1994). O termo DMO corresponde a uma medida de densidade por área, expressa em

g/cm² e obtida pela divisão do CMO pela AO escaneada (PRENTICE, PARSONS, COLE, 1994, KANIS et al, 2008).

Idealmente, intervenções dietéticas com alimentos funcionais devem compreender de 3 a 4 ciclos completos de remodelação óssea para que se verifique o impacto das mesmas na densidade mineral óssea (WEAVER, LIEBMAN, 2002). O ciclo completo de remodelação óssea leva ao redor de 30 dias no rato (WEAVER, 2005), tendo-se, portanto, estabelecido a duração do presente estudo em 16 semanas (112 dias).

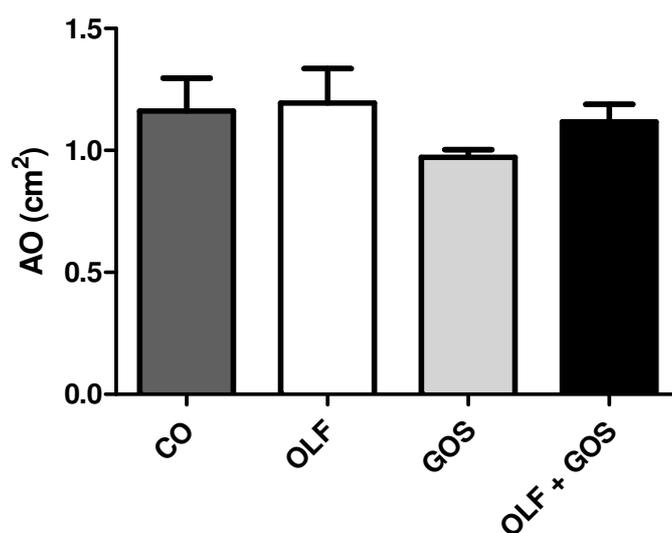


Figura 9. Área óssea da coluna lombar dos animais (vértebras L1-L4) determinada por meio da tecnologia de absorciometria por dupla emissão de raios-X (DXA). Os resultados estão expressos em média (cm²) ± EPM.

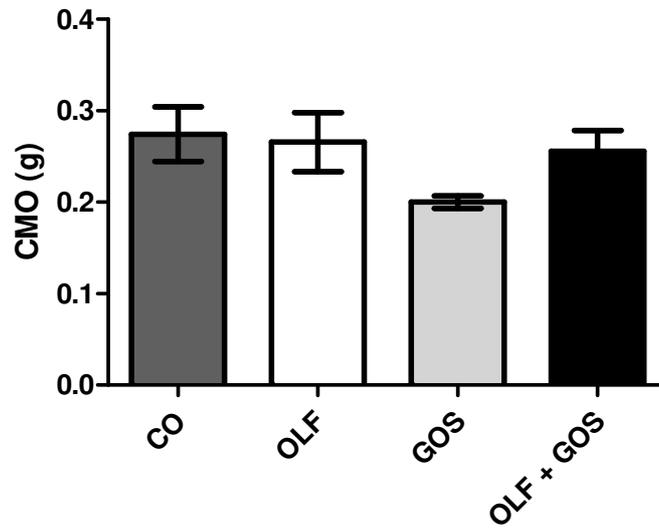


Figura 10. Conteúdo mineral ósseo da coluna lombar (vértebras L1-L4) dos animais (vértebras L1-L4), determinado por meio da tecnologia de absorciometria por dupla emissão de raios-X (DXA). Os resultados estão expressos em média (g) \pm EPM.

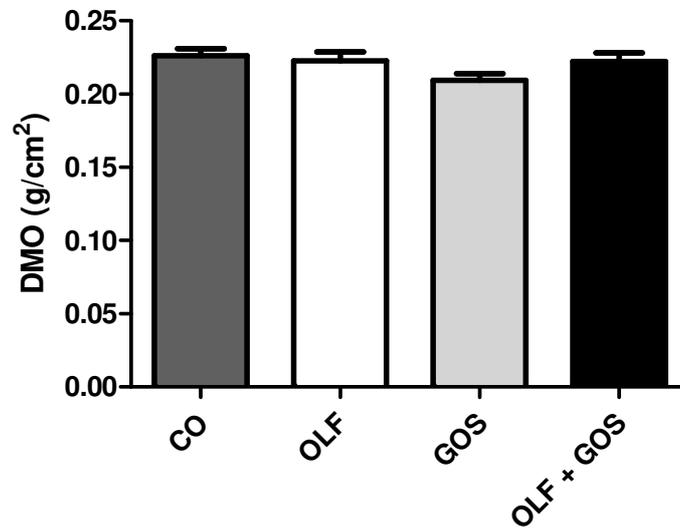


Figura 11. Densidade mineral óssea areal da coluna lombar (vértebras L1-L4) dos animais, obtida pela divisão do conteúdo mineral ósseo pela área óssea deste sítio, determinados por meio da tecnologia de absorciometria por dupla emissão de raios-X (DXA). Os resultados estão expressos em média (g/cm²) \pm EPM.

Conforme já mencionado, em 1995, Chonan, Matsumoto e Watanuki constataram que o consumo de dieta com 5% de GOS de 99% de pureza por 30 dias preveniu a perda mineral óssea em ratas ovariectomizadas. Esse procedimento cirúrgico produziu uma redução do peso seco, peso das cinzas e conteúdo de cálcio tanto na tíbia como no fêmur dos animais do estudo. Quando o GOS foi administrado às ratas ovariectomizadas, foi verificado um aumento significativo do peso das cinzas do fêmur e peso das cinzas e conteúdo de cálcio da tíbia, sendo colocado pelos autores que tais efeitos seriam conseqüentes a um status superior de cálcio nos animais suplementados, uma vez que o consumo deste OND levou a um aumento da absorção deste mineral após 8 a 10 dias de intervenção. Para Van den Helven, Margriet e Mujis (2000), o fato de uma maior absorção de cálcio com o consumo de GOS não ter sido acompanhada de aumento da excreção urinária deste mineral significou que este OND poderia diminuir a reabsorção óssea, conforme já exposto anteriormente, e/ou aumentar a retenção de cálcio no osso.

Schaafsma (1997), ao fazer uma avaliação das metodologias disponíveis para mensurar a biodisponibilidade de cálcio, destacou que o status deste mineral pode ser analisado por meio de mensurações da massa óssea em diferentes sítios do esqueleto, uma vez que 99% do cálcio em nosso organismo encontra-se no osso, e que o DXA seria o método de escolha para avaliá-la, considerando a sua acurácia, precisão e baixa exposição à radiação. O termo massa óssea pode fazer referência tanto ao conteúdo mineral como a densidade mineral óssea (MØLGAARD et al, 1997, AKKUS, ADAR, SCHAFFLER, 2004). Ainda, o autor colocou que o DXA pode ser utilizado para detectar mudanças na massa óssea ao

longo do tempo e assim acessar o efeito de intervenções destinadas a prevenir a perda óssea ou aumentar essa massa, ressaltando-se que a mensuração da massa óssea é o melhor meio de se avaliar efeitos a longo prazo no status de cálcio de fatores que influenciam o metabolismo deste mineral ou sua absorção, colocando em segundo plano outros métodos para avaliação da biodisponibilidade de cálcio, tais como técnicas de balanço e de utilização de isótopos estáveis de cálcio. Tais afirmações também foram destacadas em uma revisão sobre prebióticos e biodisponibilidade de cálcio realizada mais recentemente, em 2003, por Cashman.

Deste modo, por meio da constatação de que a ingesta de GOS não influenciou significativamente os parâmetros relacionados a densitometria óssea da coluna vertebral dos animais do presente estudo, pode-se inferir que este OND não contribuiu para prevenir a perda mineral óssea no sítio em questão, e tampouco deve ter afetado o status e a retenção de cálcio no osso das ratas de meia-idade suplementadas, não estando alinhados com os achados e suposições de Chonan, Matsumoto, Watanuki (1995) e Van den Helven, Margriet e Mujis. Ainda, Netto (2009) encontrou que a suplementação de 5% de GOS de 28% de pureza foi suficiente para aumentar significativamente tanto o CMO como a DMO da coluna lombar de ratas de 10 meses de idade, achados que também não foram corroborados por nosso estudo conforme já exposto. Essa divergência de resultados poderia estar relacionada a diferenças no lote do produto contendo GOS ou na idade das ratas, a qual era mais avançada neste estudo, porém não é possível estabelecer ao certo o motivo da mesma.

No tangente à oligofrutose, os dados disponíveis na literatura com relação ao efeito de sua suplementação na saúde óssea no contexto de perda óssea são controversos. No estudo de Sholz-Ahrenz, Açil e Schrenzeimeir (2002), embora o oferecimento de uma dieta com 5% deste OND por 16 semanas não tenha aumentado significativamente a absorção de cálcio e alterado o conteúdo deste mineral do fêmur e coluna lombar de ratas ovariectomizadas, foi constatado que a mesma preveniu a perda de osso trabecular na tíbia proximal destes animais, avaliada por meio da arquitetura deste tecido. Tahiri et al (2003), ao estudar os efeitos da suplementação de oligofrutose por 5 semanas em mulheres na menopausa, não encontrou alteração significativa nos níveis séricos de osteocalcina, que é um marcador de formação óssea, e urinários de deoxipiridinolina, a qual constitui um marcador de reabsorção óssea. O status de cálcio das mulheres suplementadas, inferido por meio da absorção verdadeira e aparente de cálcio, cálcio plasmático e excreção urinária deste mineral, também não foi afetado. Todos esses achados foram indicativos que o consumo deste OND a longo prazo não teria efeitos benéficos no metabolismo ósseo.

No presente estudo, conforme mencionado anteriormente, a suplementação dietética com 5% de oligofrutose não afetou a área, conteúdo mineral e densidade mineral óssea da coluna lombar de ratas de meia idade, e conseqüentemente pode-se inferir que a mesma não foi capaz prevenir a perda mineral óssea nesta região, e também não deve ter influenciado o status e a retenção de cálcio neste sítio em ratas de meia-idade. Deste modo, foi corroborado o resultado de Tahiri et al (2003) de que suplementação de oligofrutose não afetou o status de cálcio de mulheres na menopausa, inferido por meio da absorção aparente e verdadeira de

cálcio, cálcio plasmático e excreção urinária deste mineral. Esses achados também estão alinhados com a constatação feita por Sholz-Ahrenz, Açil e Schrenzeimeir (2002) de que o conteúdo de cálcio na coluna lombar dos animais não foi afetado com a suplementação de 5% de oligofrutose em ratas ovariectomizadas. Porém, diferentemente desses achados, no estudo de Netto et al (2009) foi constatado que a suplementação de 5% de oligofrutose aumentou significativamente a densidade mineral óssea do eixo do quadril de ratas de 10 meses de idade, muito embora a mesma não tenha influenciado a AO e o CMO neste mesmo local, e tampouco esses parâmetros e a DMO de outros sítios ósseos (diáfise do fêmur e mandíbula).

Com relação ao ensaio mecânico desenvolvido, após cada teste, foram gerados pelo software Tesc versão 3.04 instalado em um computador acoplado ao equipamento de ensaio uma planilha no programa Excel com os dados de tempo (s), deformação (mm) e carga (N) e um relatório de ensaio em formato pdf com a respectiva curva de carga *versus* deformação. Os valores de carga máxima, que corresponde à força máxima que o osso suporta antes da ocorrência de sua fratura (limite máximo); e a deformação máxima, que corresponde à distância percorrida pela carga aplicada até o limite máximo ser alcançado, foram calculados pelo próprio software e expressos no relatório, sendo ambos utilizados como critério de avaliação da resistência final do osso (BREITMAN et al, 2003).

Com os dados contidos na planilha foi possível gerar a curva de carga *versus* deformação no programa Excel, a partir da qual também foram determinadas outras propriedades biomecânicas do osso:

- carga no limite elástico, que corresponde ao valor de carga no qual a curva diverge de uma linha reta, se tornando não linear, e designa o ponto a partir do qual danos permanentes a estrutura do osso começam a ocorrer (TURNER, AKHTER, HEANEY, 1992, POWER et al, 2006);

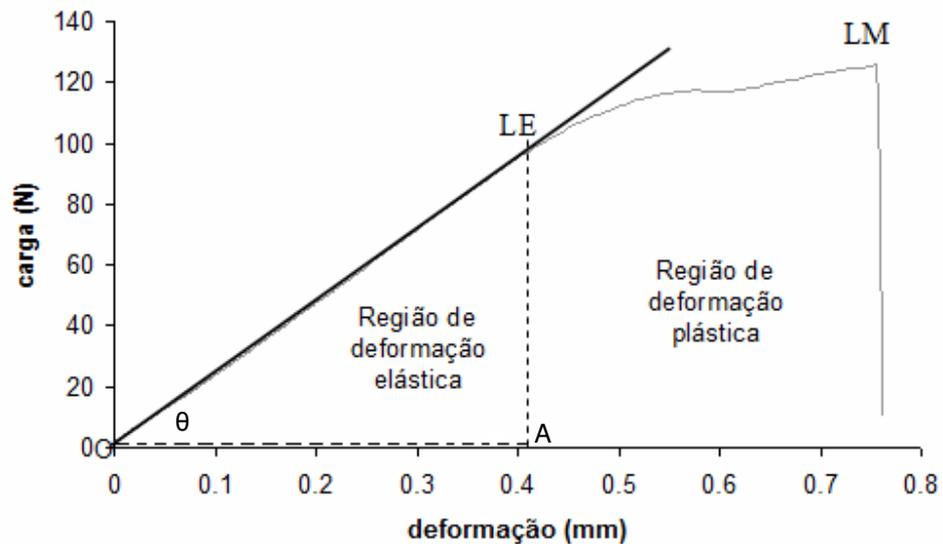
- deformação no limite elástico, que corresponde a distância percorrida pela carga aplicada até o limite elástico ser atingido (BREITMAN et al, 2003);

- resiliência, que corresponde à energia absorvida pelo osso até o limite elástico ser alcançado, a qual é recuperada quando o osso retorna a sua forma inicial após a remoção da carga, sendo dada pela área sob a curva na região elástica (BREITMAN et al, 2003, EINHORN, 1992).

- rigidez extrínseca do osso, dada pela inclinação da curva na região elástica (TURNER, BURR, 1993). A mesma pode ser calculada pela tangente do ângulo formado entre a reta obtida na região linear e o eixo de deflexão, por meio da seguinte fórmula (SILVA, 2002).

$$R = \operatorname{tg} \theta = \frac{LE - A}{A - O}$$

- tenacidade, que corresponde a energia absorvida pelo osso até a ocorrência da sua fratura (POWER et al, 2006), definida pela área sob a curva de carga *versus* deformação (TURNER, 2002).



Na região de deformação elástica, a deformação aumenta de forma linear com o aumento da carga aplicada, e após a carga ser removida, o osso retorna a sua forma original. Na região de deformação plástica, a carga aplicada causa um dano permanente à estrutura do osso (Turner, Burr, 2003). LM = limite máximo (ponto em que se tem o maior valor da carga com a correspondente deformação observada em cada ensaio), LE = limite elástico (ponto de término da relação linear entre a carga e deformação).

Figura 12. Exemplo de gráfico de carga *versus* deformação

Não houve diferença entre os grupos com relação a todas propriedades biomecânicas dos fêmures analisadas: rigidez extrínseca do osso, resiliência, carga no limite elástico, deformação no limite elástico, carga máxima, deformação máxima e tenacidade (Tabela 4).

Tabela 4. Propriedades biomecânicas dos fêmures (média ± EPM)

	Controle	OLF	GOS	OLF + GOS	p
Rigidez (N/mm)	210,85 ± 13,98	206,51 ± 14,83	228,97 ± 11,05	227,80 ± 8,59	0,56
Resiliência (x 10 ⁻³ J)	29,07 ± 1,90	28,97 ± 2,07	21,52 ± 2,53	20,69 ± 2,10	0,31
Carga no limite elástico (N)	115,29 ± 2,45	108,75 ± 5,64	98,26 ± 4,23	97,32 ± 4,17	0,18
Deformação no limite elástico (mm)	0,56 ± 0,04	0,53 ± 0,03	0,43 ± 0,03	0,42 ± 0,03	0,96
Carga máxima (N)	155,50 ± 2,39	142,94 ± 7,84	144,76 ± 10,32	158,40 ± 9,94	0,38
Deformação máxima (mm)	0,87 ± 0,05	0,85 ± 0,04	0,79 ± 0,02	0,85 ± 0,04	0,58
Tenacidade (x 10 ⁻³ J)	83,18 ± 5,88	68,25 ± 5,13	70,46 ± 3,03	90,14 ± 5,99	0,48

De modo geral, a fragilidade do osso pode ser definida como a susceptibilidade do mesmo à fratura. Ao aprofundar-se esse conceito dentro da perspectiva da biomecânica, têm-se diferentes definições para fragilidade. Uma das funções do osso é suportar cargas. Fraturas ocorrem quando as cargas excedem a força óssea intrínseca, de modo que ossos fracos são considerados frágeis. Como exemplo, vértebras com osteoporose podem fraturar durante o desenvolvimento de atividades diárias normais como abrir uma janela ou levantar de uma cadeira. Essas fraturas não traumáticas resultam de um osso enfraquecido. Por outro lado, fraturas de quadril resultam principalmente de trauma associado a queda ou impacto. Durante uma sobrecarga traumática, como, por exemplo, uma queda no chão, a fratura irá ocorrer se a energia da queda exceder a energia mecânica que o osso pode absorver. Conseqüentemente, com o trauma até mesmo ossos fortes podem ser considerados frágeis, tendo-se portanto que da perspectiva da biomecânica a fragilidade não é definida apenas pela força óssea (TURNER, 2002).

Um osso pode fraturar por diferentes razões, uma vez que sua fragilidade é influenciada por diversos fatores, tais como tamanho, forma, arquitetura e densidade mineral do mesmo. A fragilidade óssea também pode ser definida por

parâmetros biomecânicos, incluindo a força ou carga máxima, deformação máxima e tenacidade (TURNER, 2002).

Do ponto de vista da biomecânica, o tratamento ideal reduzir para a fragilidade óssea iria aumentar a força máxima necessária para quebrar o osso, assim como a deformação máxima (TURNER, 2002), sendo que nenhum dos parâmetros em questão foi afetado pelo consumo de ONDs. Ainda, já em 1969, Currey destacou a energia que o osso absorve até fraturar é importante na resistência a impactos, que são causas comuns de fraturas ósseas. Conforme já mencionado nesta dissertação, Turner (2002) também enfatizou a importância da absorção de energia na resistência a fraturas traumáticas, sendo importante colocar novamente que o consumo dos ONDs em questão não afetou a absorção de energia pelo osso, dada pela tenacidade. Na literatura já foi descrito o impacto da suplementação de oligofrutose em propriedades biomecânicas do fêmur durante o envelhecimento. Corroborando os resultados deste estudo, Netto (2009) não encontrou diferenças significantes entre o grupo controle e o suplementado com 5% deste OND no tangente a carga no limite elástico, rigidez, resiliência, carga máxima e tenacidade.

Também se deve destacar aqui que o envolvimento dos fêmures em compressas embebidas em solução salina foi realizado visando a evitar o ressecamento dos ossos após a remoção dos tecidos moles, o que, segundo Turner e Burr (1993), interfere em grande extensão nas propriedades mecânicas. Igualmente por esse motivo, os ossos foram mantidos nas gazes com salina durante toda a execução do ensaio. Os fêmures foram submetidos a 1 ciclo de congelamento-descongelamento, porém já foi demonstrado que ciclos de

congelamento-descongelamento não interferem nas propriedades mecânicas de ossos (LINDE, SØRENSEN, 1993).

Por fim, é importante ressaltar que no presente estudo não houve diferença significativa nos resultados entre combinação da oligofrutose e GOS na proporção 1:1 e os demais grupos, não se tendo portanto verificado a ocorrência de um efeito sinérgico entre esses dois ONDs no metabolismo ósseo.

6. CONCLUSÃO

O consumo de oligofrutose, GOS e da combinação destes dois ONDs por 16 semanas não alterou significativamente as concentrações séricas de marcadores bioquímicos relacionados à regulação da reabsorção óssea, a AO, CMO e DMO da coluna lombar e propriedades biomecânicas dos fêmures de ratas Wistar na meia-idade. Apesar de estes ONDs não terem contribuído para melhora da saúde óssea neste estudo, é importante ressaltar que seu consumo pode estar associado a outros efeitos benéficos à saúde, tais como redução do risco de câncer de cólon, alívio da constipação, modulação positiva do sistema imune e prevenção da colonização do intestino por patógenos. Em função dos achados controversos das pesquisas disponíveis, mais estudos são necessários para elucidar o impacto da suplementação destes prebióticos no metabolismo ósseo neste estágio de vida.

Sugestões de estudos futuros:

- Avaliar o efeito da suplementação dietética de GOS com alto grau de pureza na prevenção da perda óssea associada ao envelhecimento e/ou deficiência de estrógenos, verificando se existe associação com o aumento da produção de AGCC;
- Comparar no mesmo estudo o efeito deste ONDs com aquele obtido com a suplementação dietética de compostos com atividade antioxidante, tais como os fenólicos, tendo em vista as novas descobertas da importância do estresse

oxidativo em mediar a perda óssea; e ambos efeitos isolados com o da combinação de GOS de alta pureza e compostos com atividade antioxidante, para constatação de um possível efeito sinérgico.

7. REFERÊNCIAS

AIBAYRAK, N., YANG, S. Production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae* β -galactosidase immobilized on cotton cloth. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 77, n. 1, p. 8-19, 2002.

AKKUS, O., ADAR, F., SCHAFFLER, M. B. Age-related changes in physicochemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cortical bone. *Bone*, v. 34, n. 3, p. 443-453, 2004.

ALFVÉN, T. et al. Low-level cadmium exposure and osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 15, n. 8, p. 1579-1586, 2000.

AMADEI, S. U. et al. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v.42, n.1, p.5-12, 2006.

ANDERSON, C. H. Matrix vesicles and calcification. *Current Rheumatology Reports*, v. 5, n. 3, p. 222-226, 2005.

ANDERSON, P. H.; MAY, B. K. MORRIS, H. A. Vitamin D Metabolism: New Concepts and Clinical Implications. *The Clinical Biochemist Reviews*, v.24, n.1, p.13-26, 2003.

ASAGIRI, M., TAKAYANAGI, H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone*, v. 40, n.2, p.251-264, 2007.

BOEHM, G. et al. Prebiotic carbohydrates in human milk and formulas. *Acta Paediatrica*, v.94, suppl 449, p.18-21, 2005.

BORNET, F.R.J. et al. Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications. *Digestive and Liver Disease*, v. 34, suppl. 2, p. S111-S120, 2002.

BOYLE, W. J., SIMONET, W. S., LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, v.423, n. 6937, p. 337-342, 2003.

BREITMAN, P. L. Isoflavones with supplemental calcium provide greater protection against the loss of bone mass and strength after ovariectomy compared to isoflavones alone. *Bone*, v. 33, n. 4, p.597-605, 2003.

BROUNS, F.; VERMEER, C. Functional food ingredients for reducing the risks of osteoporosis. *Trends in Food Science and Technology*, v. 11, n.1, p.22-33, 2000.

CAMARGO, M. B. R. et al. Bone mineral density and osteoporosis among a predominantly Caucasian elderly population in the city of São Paulo. *Osteoporosis International*, v. 16, n.11, p. 1451-1460, 2005.

CANALIS, E. et al. Mechanisms of anabolic therapies for osteoporosis. *The New England Journal of Medicine*, v. 357, n. 9, p. 905-916, 2007.

CARVALHO, A. A. F., LOUZADA, M. J. Q., RISO, N. D. M. Hindlimb unloading producing effects on bone biomechanical properties in mature male rats. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, v.24, n.3, p.175-179, 2007.

CASHMAN, K. D. Calcium intake, calcium bioavailability and bone health. *British Journal of Nutrition*, v.87, suppl. 2, S169–S177, 2002.

CASHMAN, K. D. Prebiotics and calcium bioavailability. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, v. 4, p. 21-32, 2003.

CHAN, G. K., DUQUE, G. Age-Related Bone Loss: Old Bone, New Facts. *Gerontology*, v.48, n. 2, p.62–71, 2002.

CHONAN, O.; MATSUMOTO, K.; WATANUKI, M. Effect of galactooligosaccharides on calcium absorption and preventing bone loss in ovariectomized rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v.59, n.2, p.236-239, 1995.

CHONAN, O., WATANUKI, M. The effect of 6'-galactooligosaccharides on bone mineralization of rats adapted to different levels of dietary calcium. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, v.63, n.3, p. 244-249, 1996.

CLARKE, B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, v. 3, suppl. 3, S131–S139, 2008.

COMPSTON, J. S. Sex steroids and bone. *Physiological Reviews*, v. 81, n. 1, p. 419-433, 2001.

COUDRAY, C. et al. Effects of inulin-type fructans of different chain length and type of branching on intestinal absorption and balance of calcium and magnesium in rats. *European Journal of Nutrition*, v. 42, n.2, p. 91-98, 2003.

COSTA-PAIVA, L. et al. Prevalência de osteoporose em mulheres na pós-menopausa e associação com fatores clínicos e reprodutivos. *Revista Brasileira De Ginecologia e Obstetrícia*, v.25, n.7, p. 507-512, 2003.

COXAM, V. Inulin-type fructans and bone health: state of the art and perspectives in the management of osteoporosis. *British Journal of Nutrition*, v. 93, Suppl. 1, S111–S123, 2005.

CRITTENDEN, R. G., PLAYNE, M.J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food science and Technology*, v.7, n.11, p. 353-361, 1996.

CURREY, J. D. The mechanical consequences of variation in the mineral content of bone. *Journal of Biomechanics*, v. 2, n. 1, p. 1-11, 1969.

DELMAS, P. D. Clinical potential of RANK-L Inibition for the management of post-menopsausal osteoporosis and other metabolic bone diseases. *Journal of Clinical Denhsitometry: Asssesment of Skeletal Health*, v.11, n.2, p.325-338, 2008.

DELZENNE, N. M. Oligosaccharides: state of the art. *Proceedings of the Nutrition Society*, v.62, n.1, p.177-182, 2003.

DUQUE, G., TROEN, B. R. Understanding the Mechanisms of Senile Osteoporosis: New Facts for a Major Geriatric Syndrome. *The Journal of the American Geriatrics Society*, v.56, n.5, p.935-941, 2008.

EGHBALI-FATOURECHI, G. et al. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 111, n. 8, p. 1221-1230, 2003.

EINHORN, T. A. Bone strength: the bottom line. *Calcified Tissue international*, v. 51, n. 5, p. 333-339, 1992.

FEDORAK, R. N., MADSEN, K. L. Probiotics and prebiotics in gastrointestinal disorders. *Current Opinion in Gastroenterology*, v.20, n.2, p.146-155, 2004.

FERNÁNDEZ, R. C. et al. Production of fructooligosaccharides by β -fructofuranosidase from *Aspergillus* sp 27 H. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 79, n.3, p. 268-272, 2004.

FRANCK, A. Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, v.87, suppl. 2, p.S287-S291, 2002.

FRANK LINDE, F., SØRENSEN, H. C. F. The effect of different storage methods on the mechanical properties of trabecular bone. *Journal of Biomechanics*, v. 26, n.10, p.1249-1252, 1993.

FRAZÃO, P, NAVEIRA, M. Prevalência de osteoporose: uma revisão crítica. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v.9, n.2, p.206-214, 2006.

FUKUSHIMA, A. et al. Expression of calbindin-D9k, VDR and Cdx-2 messenger RNA in the process by which fructooligosaccharides increase calcium absorption in rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, v. 51, n.6, p.426-412, 2005.

FUKUSHIMA, A., AIZAKI, Y., SAKUMA, K. Short-chain fatty acids induce intestinal transient receptor potential vanilloid type 6 expression in rats and caco-2 cells. *The Journal of Nutrition*, v. 139, n. 1, 20-25, 2009.

GARNERO, P. et al. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, v.11, n.3, p. 337-349, 1996.

GENNARI, C. et al. Estrogen preserves a normal intestinal Responsiveness to 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in Oophorectomized Women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 71, n. 5, p. 1288-1293, 1990.

GIBSON G. R. et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, v.17, n.2, p. 259-275, 2004.

GOTO, K. et al. Isolation and structural analysis of oligosaccharides from yacon (*Polymnia sonchifolia*). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 59, p. 2346-2347, 1995.

GRADY, D. Postmenopausal Hormones - Therapy for Symptoms Only. *The New England Journal of Medicine*, v. 348, n.19, p. 1835-1837, 2003.

GUERRA, M. T. P., PRADO, G. L. M. Osteoporose em mulheres na pós-menopausa: perfil epidemiológico e fatores de risco. *Revista Brasileira de Clínica Médica*, v.8, n.5, p. 386-391, 2010.

HARVEY, N., DENNISON, E., COOPER, C. Osteoporosis: impact on health and economics. *Nature Reviews Rheumatology*, v.6, p.99-105, 2010.

HADJIDAKIS, D. J., ANDROULAKIS, I. I. Bone remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1092, p.385-396, 2006.

HARMSEM, H. J. M. et al. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, v.30, n.1, p.61-67, 2000.

HOLLOWAY, L. et al. Effects of oligofructose-enriched inulin on intestinal absorption of calcium and magnesium and bone turnover markers in postmenopausal women. *British Journal of Nutrition*, v. 97, n. 2, p. 365-372, 2007.

HUGUES, D. E., BOYCE, B. F. Estrogen-transforming growth factor-beta, and the regulation of bone metabolism in health and disease. *The Endocrinologist*, v.8, n.2, p. 55-61, 1998.

ISOMURA, H. et al. Bone metabolism and oxidative stress in postmenopausal rats with iron overload. *Toxicology*, v. 197, n.2, p.93-100, 2004.

JILKA, R. L. et al. Increases osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science*, v. 257, p. 88-91, 1992.

KALU, D. N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone and Mineral*, v.15, n.3, p. 175-191, 1991.

KANIS, J. A. et al. An update on the diagnosis and assessment of osteoporosis with densitometry. *Osteoporosis International*, v. 11, n. 3, p. 192-202, 2000.

KANIS, J. A. et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporosis International*, v. 19, n. 4, p. 399-428, 2008.

KAUR, N., GUPTA, A. K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Bioscience*, v.27, n.7, p.703-714, 2002.

KHANAL, R. C., NEMERE, I. Endocrine regulation of calcium transport in epithelia. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, v.35, n.11, p.1277-1287, 2008.

KHOSLA, S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*, v.142, n.12, p.5050-5055, 2001.

KHOSLA, S. et al. Correlates of osteoprotegerin levels in women and men. *Osteoporosis International*, v. 13, n.5, p. 394-399, 2002.

KHOSLA, S. MELTON, L. J., RIGGS, B. L. The Unitary model for estrogen deficiency and the pathogenesis of osteoporosis: is a revision needed? *Journal of Bone and Mineral Research*, v.26, n.3, p. 441-451, 2011.

KOLIDA, S. et al. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, v.87, suppl. 2, p. S193-S197, 2002.

KRIPKE, S. et al. Stimulation of intestinal mucosal growth with intracolonic infusion of short-chain fatty acids. *Journal of Parenteral & Enteral Nutrition*, v. 13, n. 2, p.109-116, 1989.

KRUGER, M. C. et al. The effect of fructooligosaccharides with various degrees of polymerization on calcium bioavailability in the growing rat. *Experimental Biology and Medicine*, v. 228, n. 6, p. 683-688, 2003.

KUDO, O. Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANK-L-independent mechanism. *Bone*, v. 32, n.1, p. 1-7, 2003.

LEEMING, D. J. et al. An update of biomarkers of bone turnover and their utility in biomedical research and clinical practice. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v. 62, n. 10, p.781-792, 2006.

LERNER, U. H. Bone-remodeling in post-menopausal osteoporosis. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, v.85, n. 7, p.584-595, 2006.

LI, X. J. et al. Age-related changes of cancellous and cortical bone histomorphometry in female Sprague-Dawley rats. *Cells and Materials Supplement*, v.1, p.25-35, 1991.

LI, Y. F. Systemic treatment with strontium ranelate promotes tibial fracture healing in ovariectomized rats. *Osteoporosis International*, v. 21, n. 11, p. 1889-1897, 2010.

LINDE, F., SØRENSEN, H. C. F. The effect of different storage methods on the mechanical properties of trabecular bone. *Journal of Biomechanics*, v. 26, n. 10, p. 1249-1252, 1993.

LOO, J. V. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). *British Journal of Nutrition*, v. 81, n. 2, p.121-132, 1999.

LÖWIG, C. W. G. M et al. Parathyroid hormone (PTH) and PTH-like protein (PLP) stimulate interleukin-6 production by osteogenic cells: a possible role of IL-6 in osteoclastogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.162, n.3, p. 1546-1552, 1989.

LUTZ, T., SCHARRER, E. Effect of short chain fatty acids on calcium absorption by the rat colon. *Experimental Physiology*, p. 76, n. 4, p. 615-618, 1991.

MA, Y. L. et al. Catabolic effects of continuous human PTH (1-38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. *Endocrinology*, v. 142, n.9, p.4047-4054, 2001.

MACFARLANE, S., MACFARLANE, G. T., CUMMINGS, J. H. Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v. 24, n. 5, p.701-714, 2006.

MACFARLANE, G. T., MACFARLANE, S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*, v. 104, n. 1, p. 305-344, 2008.

MAHAMID, J. et al. Bone mineralization proceeds through intracellular calcium phosphate loaded vesicles: A cryo-electron microscopy study. *Journal of Structural Biology*, v. 174, n. 3, p. 527-535, 2011.

MAHONEY, R. R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. *Food Chemistry*, v. 62, n. 2, p. 147-154, 1998.

MANOLAGAS, S. M. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocrine Reviews*, v.31, n. 3, p. 266-300, 2010.

MARTINS, A. R., BURKERT, C. A. V. Galactooligosaccharides (GOS) and their prebiotic and bifidogenic effects. *Brazilian Journal of Food technology*, v.12, n.3, p. 230-240, 2009.

MØLGAARD, C. Whole body bone mineral content in healthy children and adolescents. *Archives of Disease in Childhood*, v. 76, n. 1, p.9-15, 1997.

MCLEAN, R. R. Proinflammatory cytokines and osteoporosis. *Current Osteoporosis Reports*, v.7, p.134-139, 2009.

MEZQUITA-RAYA, P. et al. The contribution of serum osteoprotegerin to bone mass and vertebral fractures in postmenopausal women. *Osteoporosis International*, v.16, n.11, p. 1368-1374, 2005.

MOE, S. M., CHEN, N. X. Mechanisms of vascular calcification in chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 19, n. 2, p.213-216, 2008.

MORO, G. et al. Dosage-related bifidogenic effects of galacto- and fructooligosaccharides in formula-fed term infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, v. 34, n. 3, p. 291-295, 2002.

MUSSATO, S. I., MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: a review. *Carbohydrate Polymers*, v. 68, n.3, p.587-597, 2007.

NEERUP, T. S. R. ZP2307, a novel, cyclic PTH(1-17) analog that augments bone mass in ovariectomized rats. *Bone*, v.48, n. 6, p. 1319-1327, 2011.

NETTO, C. C. Avaliação das características morfológicas e dos marcadores bioquímicos relacionados à homeostase do tecido ósseo de ratas idosas suplementadas com diferentes tipos de prebióticos. Campinas, 2009. 179f. Tese (doutorado em Alimentos e Nutrição)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

NIITTYNEN, L.; KAJANDER, K.; KORPELA, R. Galacto-oligosaccharides and bowel function. *Scandinavian Journal of Food and Nutrition*, v. 51, n. 2, p. 62 -66, 2007.

NZEUSSEU, A. et al. Inulin and fructo-oligosaccharides differ in their ability to enhance the density of cancellous and cortical bone in the axial and peripheral skeleton of growing rats. *Bone*, v. 38, n. 3, p.394-399, 2006.

O'BRIEN, C. A. Expression levels of gp 130 in bone marrow stromal cells determine the magnitude of osteoclastogenic signals generated by IL-6 type cytokines. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 79, n. 4, p. 532-541, 2000.

PASSOS, L. M. L., PARK, Y. K. Fructooligosaccharídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. *Ciência Rural*, v.33, n.2, p.385-390, 2003.

PÉREZ-CONESA, D. et al. Bioavailability of calcium, magnesium, and phosphorus in rats fed probiotic, prebiotic and symbiotic powder follow-up infant formulas and

their effect on physiological and nutritional parameters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.86, n. 14, p. 2327-2336, 2006.

PEREZ-CONESA, D., LÓPEZ, G. ROS, G. Effects of probiotic, prebiotic and synbiotic follow-up infant formulas on large intestine morphology and bone mineralization in rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.87, n. 6, p. 1059-1068, 2007.

PESSELA, B. C. C. et al. The immobilization of a thermophilic β -galactosidase on Sepabeads supports decreases product inhibition complete hydrolysis of lactose in dairy products. *Enzyme and Microbial technology*, v.33, n.2-3, p.199-205, 2003.

PIETSCHMANN, P. et al. Osteoporosis: An Age-Related and Gender-Specific Disease – A Mini-Review. *Gerontology*, v. 55, n. 1, p. 3-12, 2009.

PINEIRO, M. et al. FAO technical meeting on prebiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology*, v.42, suppl. 3, S156-S159, 2008.

POLI, V et al. Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion. *The EMBO Journal*, v.13, n.5, p. 1189-1196, 1994.

POST, T. M. et al. Bone physiology, disease and treatment: towards disease system analysis in osteoporosis. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 49, n. 2, p. 89-118, 2010.

POWER, K. A. et al. Genistein alone and in combination with the mammalian lignans enterolactone and enterodiol induce estrogenic effects on bone and uterus in a postmenopausal breast cancer mouse model. *Bone*, v. 39, n. 1, p. 117-124, 2006.

PRENTICE, A., PARSONS, T. J., COLE, T. J. Uncritical use of bone mineral density in absorptiometry may lead to size-related artifacts in the identification of bone mineral determinants. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 60, n. 6, p.837-842, 1994.

PRINCE, R. L. Counterpoint: estrogen effects on calcitropic hormones and calcium homeostasis. *Endocrine Reviews*, v. 15, n. 3, p.301-309, 1994.

RAISZ, L. G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *The Journal of Clinical Investigation*, v.115, n. 12, p. 3318-3325, 2005.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C.JR. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. American Institute of Nutrition, v.123, n.11, p.1939–1951, 1993.

RIGGS, L. B., HARTMANN, M. D. Selective estrogen-receptor modulators - mechanisms of action and application to clinical practice. *The New England Journal of Medicine*, v. 348, n. 12, p. 618-629, 2003.

RIGGS, L. B., KHOSLA, S., MELTON, J. Sex steroids and the construction and conservation of adult skeleton. *Endocrine Reviews*, v. 23, n. 3, p.279-302, 2002.

RIGGS, B. L. et al. A Population-based assesment of rates of bone loss at multiple Skeletal sites: evidence for substantial trabecular bone loss in young adult women and men. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 23, n. 2, p. 205-214, 2008.

RIZOLLI, R. et al. Adverse reactions and drug-drug interactions in the management of women with postmenopausal osteoporosis. *Calcified Tissue International*, v. 89, n. 2, p.91-104, 2011.

ROBERFROID, M., GIBSON, G. R., DELZENNE, N. The biochemistry of oligofructose, a nondigestible fiber: an approach to calculate its caloric value. *Nutrition Reviews*, v.51, n.5, p.137-146, 1993.

ROBERFROID, M. B. Introducing inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition*, v.93, suppl 1, S14-S25, 2005.

ROBERFROID, M. B. Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of Nutrition*, v. 137, n.3, p.830S-837S, 2007a.

ROBERFROID, M. B. Inulin-type fructans: functional food ingredients. *The Journal of Nutrition*, v. 137, n.11, p.2493S-2502S, 2007b.

ROBLING, A. G., CASTILLO, A. B., TURNER, A. H. Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodelling. *Annual Review of Biomedical Engineering*, v. 8, p. 455-468, 2006.

ROODMAN, G. D. Interleukin-6: an osteotropic factor? *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 7, n.5, p. 475-478, 1992.

SAFADI, F. F. et al. Bone Structure, Development and Bone Biology. In: KHURANA, J. S. *Bone Pathology*. Humana Press, 2009. Cap. 1, p.1-50.

SAHAP, A. O., GUNAL, I., KORKUSUZ, F. Burden of Osteoporosis. *Clinical Orthopaedics & Related Research*, v. 443, p.19-24, 2006.

SAKAMOTO, W. et al. The effect of vitamin K2 on bone metabolism in aged female rats. *Osteoporosis International*, v. 16, n. 12, p. 1604-1610, 2005.

SAKO, T., MATSUMOTO, K., TANAKA, R. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *International Dairy journal*, v. 9, n. 1, p. 69-80, 1999.

SANGEETHA, P. T., RAMESH, M. N., PRAPULLA, S. G. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology*, v.16, n.10, p.442-457, 2005.

SANTOS, R, SIMIQUELI, A. P. R, PASTORE, G. M. Produção de galactooligosacarídeo por *Scopulariopsis* sp. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.29, n.3, p.682-689, 2009.

SARKAR, S. Potential of prebiotics as functional foods – a review. *Nutrition & Food Science*, v. 37, n.3, p. 168-177, 2007.

SCHAAFSMA, G. Bioavailability of calcium and magnesium. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 51, suppl. 1, S13-S16, 1997.

SCHEPPACH, W. et al. Effect of short-chain fatty acids on the human colonic mucosa in vitro. *Journal of Parenteral & Enteral Nutrition*, v.16, n.1, p. 43-48, 1992.

SCHOTERMAN, M. H. C. Galacto-oligosaccharides: properties and health aspects. In: MCCLEARY, B. V., PROSKY, L. *Advanced Dietary Fiber Technology*. Blackwell Science, 2001. Cap. 42, p. 494-502.

SHOLZ-AHRENS, K. E., AÇIL, Y., SCHREZENMEIR, J. Effects of oligofructose or dietary calcium on repeated calcium and phosphorus balances, bone mineralization and trabecular structure in ovariectomized rats. *British Journal of Nutrition*, v. 88, n. 4, p.365-377, 2002.

SHOLZ-AHRENS, K. E. et al. Prebiotics, Probiotics, and Synbiotics Affect Mineral Absorption, Bone Mineral Content, and Bone Structure. *The Journal of Nutrition*, v. 137, n. 3, p. 838S–846S, 2007.

SILVA, A. V. Modelo de suspensão pela cauda e seu efeito em algumas propriedades mecânicas do osso do rato. Ribeirão Preto, 2002. 71f. Dissertação (mestre em Bioengenharia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

SILVA, M. P. N. Síndrome da anorexia-caquexia em portadores de câncer. *Revista Brasileira de Cancerologia*, Rio de Janeiro, Brasil, v.52, n.1, p59-77, 2006.

SLEMENDA, C. W. et al. Reduced rates of skeletal remodeling are associated with increased bone mineral density during the development of peak skeletal mass. *Journal of bone and Mineral Research*, v.12, n. 4, p. 676-682, 1997.

STEEVE, K. T. et al. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine & Growth Factors Reviews*, v.15, n.1, p. 49-60, 2006.

SUZUKI, A. et al. Pharmacological topics of bone metabolism: recent advances in pharmacological management of osteoporosis. *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 106, n. 4, p. 530-535, 2008.

SWENNEN, K, COURTIN, C. M., DELCOUR, J. A. Non-digestible Oligosaccharides with Prebiotic Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 46, n. 6, p.459-471, 2006.

TAGUCHI, Y. et al. Interleukin-type-cytokines stimulates mesenchymal progenitor differentiation toward the osteoblastic lineage. *Proceedings of the Association of American Physicians*, v. 110, p.559-574, 1998.

TAHIRI, M. et al. Effect of short-chain fructooligosaccharides on intestinal calcium absorption and calcium status in postmenopausal women: a stable-isotope study. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 77, n. 2, p. 449-457, 2003.

TAKAHARA, S. et al. Fructooligosaccharide consumption enhances femoral bone volume and mineral concentrations in rats. *The Journal of Nutrition*, v. 130, n. 7, p. 1792-1795, 2000.

TALMAGE, R. V., MOBLEY, H. T. Calcium homeostasis: Reassessment of the actions of parathyroid hormone. *General and Comparative Endocrinology*, v. 156, n.1, p.1-8, 2008.

THEILL, L. E., BOYLE, W. J., PENNINGER, J. M. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annual Review of Immunology*, v. 20, p.795-823, 2002.

THOMPSON, D. D. et al. FDA guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone*, v.17, n.4, S125-S133, 1995.

TURNER, C. H., AKHTER, M. P., HEANEY, R. P. The effects of fluoridated water on bone strength. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 10, n. 4, p.581-587, 1992.

TURNER, C. H. Biomechanics of bone: determinants of skeletal fragility and bone quality. *Osteoporosis International*, v. 13, n. 2, p. 97-104, 2002.

TURNER, C. H., BURR, D. B. Basic biomechanical Measurements of bone: a tutorial. *Bone*, v. 14, n. 4, p. 595-608, 1993.

VAN DEN HEUVEL, E. G. H. M., SCHOTERMAN, M. H. C., MUJIS, T. Transgalactooligosaccharides stimulate calcium absorption in postmenopausal women. *Journal of Nutrition*, v. 130, n. 12, p. 2938-2942, 2000.

VOM SAAL, F. S., FINCH, C. E., NELSON, J. F. Natural history and mechanisms of reproductive aging in humans, laboratory rodents, and other selected vertebrates. In: KNOBIL E., NEILL J. D. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, 1994. Cap. 61, p. 1213-1314.

WATTS, N. B. Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. *Clinical Chemistry*, v.48, n. 8, p. 1359-1368, 1999.

WEAVER, C. M., LIEBMAN, M. Biomarkers of bone health appropriate for evaluating functional foods designed to reduce risk of osteoporosis. *British Journal of Nutrition*, v.88, suppl. 2, S225-S232, 2002.

WEAVER, 2005. Inulin, oligofructose and bone health: experimental approaches and mechanisms. *The British Journal of Nutrition*, v.93, suppl. 1, p.S99-S103, 2005.

WEAVER, C. M. et al. Galactooligosaccharides improve mineral absorption and bone properties in growing rats through gut fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, n. 12, p.6501-6510, 2011.

WEITZMANN, M. L., PACIFI, R. P. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *The Journal of Clinical Investigation*, v.116, n.5, p. 1186-1194, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Assessment of fracture risk and application to screening for postmenopausal osteoporosis: report of a WHO study group. *World Health Organization Technical Report Series*, v. 843, p.1-129, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Prevention and management of osteoporosis prevention*. Technical Report Series n°921. Geneva, 2003.

WONG, J. M. W. et al. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *Journal of Clinical Gastroenterology*, v.40, n.3, 2006.

WRONSKI, T. J. Long-term effects of ovariectomy and aging, on the rat skeleton. *Calcified Tissue International*, v. 45, n. 6, p. 360-366, 1989.

WYNNE, F. L. Age-related reduction in estrogen-receptor mediated mechanisms of vascular relaxation in female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, v. 43, n. 2, p. 405-412, 2004.

YONEDA, T. et al. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature*, v.345, p.442-444, 1900.

YOUNES, H. et al. Relationship between fermentation and calcium in the caecum of rats fed digestible or resistant starch. *Annals of Nutrition & Metabolism*, v. 37, n.6, p. 311-319, 1993.

ANEXO 1. Certificado de aprovação do ensaio biológico pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Unicamp.



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

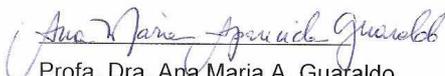
CERTIFICADO

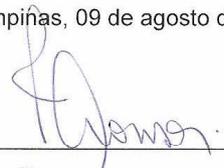
Certificamos que o Protocolo nº 2213-1, sobre "Efeito dos oligossacarídeos não digeríveis no metabolismo ósseo de ratas Wistar adultas esquelicamente maduras", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Mario Roberto Maróstica Junior / Vivian Cristine Correia Vieira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 09 de agosto de 2010.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2213-1, entitled " _____ ", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on August 9, 2010.

Campinas, 09 de agosto de 2010.


Prof.ª. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

