

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

CLAUDIA CARDOSO NETTO

**AVALIAÇÃO DA BIOPOTÊNCIA DOS
FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS (FOS) E DA TERAPIA DE
REPOSIÇÃO HORMONAL (TRH) NO METABOLISMO DE
CÁLCIO DE RATAS OVARECTOMIZADAS**

Campinas

2005

CLAUDIA CARDOSO NETTO

Nutricionista

**AVALIAÇÃO DA BIOPOTÊNCIA DOS
FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS (FOS) E DA TERAPIA DE
REPOSIÇÃO HORMONAL (TRH) NO METABOLISMO DE
CÁLCIO DE RATAS OVARECTOMIZADAS**

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 Básica Experimental Aplicada à Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Celio Kenji Miyasaka

Campinas

2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

N389a Netto, Claudia Cardoso
Avaliação da biopotência dos frutooligossacarídeos (FOS) e da
terapia de reposição hormonal (TRH) no metabolismo de cálcio de
ratas ovariectomizadas / Claudia Cardoso Netto. – Campinas, SP:
[s.n.], 2005.

Orientador: Célio Kenji Miyasaka
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Frutooligossacarídeos. 2. Ovariectomia. 3. Osteoporose. 4.
Menopausa. I. Miyasaka, Célio Kenji. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(ckn/fea)

Titulo em ingles: Evaluation of the biopotency of fructooligosaccharides (FOS) and hormonal
replacement therapy (HRT) in the calcium metabolism of female rats castrated

Palavras-chave em inglês (Keywords): Fructooligosaccharides, Ovariectomy, Osteoporosis,
Menopause

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição

Área de concentração: Nutrição básica experimental aplicada à tecnologia de alimentos

Banca examinadora: Celio Kenji Miyasaka
Gláucia Maria Pastore
Valdemiro Carlos Sgarbieri
Edgair Fernandes Martins

CLAUDIA CARDOSO NETTO

AVALIAÇÃO DA BIOPOTÊNCIA DOS FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS (FOS) E DA
TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL (TRH) NO METABOLISMO DE CÁLCIO
DE RATAS OVARECTOMIZADAS

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 Básica
Experimental Aplicada à Tecnologia de Alimentos.

Aprovado em ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. Celio Kenji Miyasaka
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
Orientador

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
Membro

Prof. Dr. Valdemiro Sgarbieri
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP
Membro

Prof. Dr. Edgair Fernandes Martins
Instituto de Ciências Biológicas – USP
Membro

À minha mãe, meus irmãos e à memória de meu pai.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e pela conquista de mais essa etapa.

Ao meu pai, por estar sempre perto de mim, na minha alma e no meu coração.

À minha mãe Rita, pelo incentivo e confiança.

Aos meus irmãos Fabiano e Paula, pelo ombro amigo nos momentos mais difíceis.

Ao meu namorado Alcy, pelo seu amor, companhia, incentivo e principalmente paciência.

Ao amigo e orientador Prof. Dr. Celio Kenji Miyasaka, pelo apoio, orientação e confiança no meu trabalho.

Para toda minha família por acreditar em mim, especialmente aos tios Zé, Angela, Carmen, Magno e Neidinha, obrigado por tudo.

Aos meus amigos, por me apoiarem e entenderem minha ausência.

À minha estagiária Manoela Franco, que esteve ao meu lado durante toda a execução deste trabalho.

À amiga Maria Susana, pela ajuda física e emocional dentro do LEB.

Aos meus “irmãos” de laboratório: Cristina, Elisvânia, Laura, Luciano, Maria Inês e Pablo.

Às amigas Cibelem e Adriana, pelo apoio nos momentos mais difíceis.

Às minhas amigas da A5 (Hayda e Raquel) e da E6A (Arlete e Aninha), obrigado pela amizade e pelo carinho.

A todos os amigos que fiz durante esta caminhada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de mestrado e iniciação científica concedidas para realização deste trabalho.

Ao Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão (FAEPEX) pelo auxílio pesquisa, viabilizando a execução deste trabalho.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pela oportunidade de realizar este sonho e pela bolsa concedida na moradia estudantil por um ano.

Aos amigos e colegas de departamento, pelos momentos de descontração.

Aos membros da banca examinadora, que contribuíram para o aprimoramento do trabalho através de correções e sugestões.

A todos os técnicos do Departamento de Alimentos e Nutrição, pelo apoio nas análises realizadas.

À Universidade de São Paulo (USP), especialmente ao Laboratório de Dosagem Hormonal, pela realização das análises de estrogênio sérico.

À Empresa ORAFIT, pela doação da mistura de FOS utilizada neste trabalho.

RESUMO

O osso é um tipo de tecido conjuntivo metabolicamente ativo que sofre um processo contínuo de renovação e remodelação. A partir dos 50 anos de idade ou nas mulheres após a menopausa esse processo de remodelação se torna negativo, causando perda óssea e conseqüentemente osteoporose. Atualmente, os principais tipos de tratamentos para osteoporose são: terapia de reposição hormonal (TRH), moduladores seletivos de receptores de estrogênio (SERMs), calcitonina, compostos bifosfonados, agentes anabólicos (peptídeos da família do paratormônio), suplementação de cálcio e vitamina D ou mesmo prébióticos que favoreçam a absorção destes nutrientes. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo estudar a biopotência dos frutooligossacarídeos (FOS) bem como da TRH no metabolismo de cálcio em ratas ovariectomizadas. Ratas adultas foram submetidas a um procedimento cirúrgico de castração, sendo divididas em dois grupos: castradas e não castradas. Após esse procedimento transcorreram 30 dias e, após esse período, receberam ou não o FOS em associação ou não com estrogênio sintético por 20 dias (G1= Não castrado + gavagem com FOS; G2= Não castrado + gavagem com água; G3= Castração + gavagem com FOS + injeção de hormônio; G4= Castração + gavagem com FOS + injeção de solução salina; G5= Castração + gavagem com água + injeção de hormônio; G6= Castração + gavagem com água + injeção de solução salina). Resultados: os animais castrados (G3, G4, G5 e G6) tiveram um maior ganho de peso quando comparados com os grupos controle; o FOS favoreceu a absorção de cálcio; os níveis de cálcio sérico se mantiveram constantes em todos os grupos; a atividade da fosfatase alcalina aumentou nos grupos G1 e G6; a administração conjunta de FOS e da TRH foi mais eficaz na deposição de cálcio bem como na recuperação da estrutura óssea das ratas castradas quando comparados aos mesmos tratamentos administrados isoladamente.

Palavras-chaves: Frutooligossacarídeo; ovariectomia; osteoporose; terapia de reposição hormonal; menopausa.

ABSTRACT

The bone is a type of connective tissue in men active with a continuous process of renewal and remodeling. From 50 years old or in the women after the menopause this process of remodeling becomes negative, leading to bone loss and consequently osteoporosis. Currently, the main types of treatments for osteoporosis are: hormonal replacement therapy (HRT), selective estrogen receptor modulator (SERMs), calcitonin, biphosphonates compounds, anabolic agent, supplementation with calcium and vitamin D or even oligosaccharides that increased the absorption of these nutrients. In this study the biopotency of the fructooligosaccharides (FOS) as well as of the HRT in the calcium metabolism in castrated rats where investigated. Female adult rats were castrated (OVT). After 30 days of castration the animals received FOS by gavage and synthetic estrogen for over 20 days (G1= *Sham* castration + FOS; G2 = *Sham* castration + water; G3=castration + FOS + estrogen; G4 =castration + FOS + saline; G5 =castration + water + estrogen; G6 =castration + water + saline). Results: the OVT animals (G3, G4, G5 and G6) showed higher weight than the control group, the groups treated with FOS increased the calcium absorption; the levels of calcium in the serum were unchanged in all the groups; the activity of alkaline phosphatase was increased in the groups G1 and G6, however the mechanism involved seems to be different ; the association of FOS and TRH treatment improved the calcium deposition as well as the recovery of the bone structure in OVT rats as compared to the FOS or HRT treatment separately managed.

Word-keys: Fructooligosaccharides; ovariectomy; osteoporosis; hormonal replacement therapy; menopause.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cálcio como elemento químico.....	5
Figura 2: Modelo proposto para o metabolismo de cálcio.....	7
Figura 3. Comportamento dos oligossacarídeos não digeríveis no trato digestório humano.....	22
Figura 4. Processo de produção da oligofrutose.....	23
Figura 5. Estrutura molecular dos FOS.....	23
Figura 6. <i>Via Bifidus</i> para fermentação de hexose. (Enzimas específicas: frutose-6-fosfoacetolase – F6 Pkt e xilose-5-fosfoacetolase – X5 PKT).....	26
Figura 7. <i>Via Bifidus</i> de oxidação anaeróbica do metabolismo de hexose (GA 3 P: gliceraldeído-3-fosfato e PEP: fosfoenolpiruvato)	27
Figura 8. Vias microbiológicas do metabolismo anaeróbico de lactato/piruvato para formação de ácidos graxos de cadeia curta.....	29
Figura 9. Efeitos benéficos das fibras no organismo animal.....	30
Figura 10. Esquema experimental dos grupos de estudo.....	35
Figura 11. Ganho de peso dos animais durante a fase de maturação sexual.....	36
Figura 12. Esfregaço vaginal (1,25x; 12,5x / hematoxilina).....	37
Figura 13 (a, b, c, d). Fases do processo de castração.....	38-40
Figura 14. Ovário.....	40
Figura 15. Dosagem quantitativa de estrogênio sérico (p<0,05).....	41
Figura 16. Consumo médio de ração (g)/dia durante a fase de depleção (p<0,05).....	48
Figura 17. Ganho de peso (g)/semana durante a fase de depleção (p<0,05).....	49
Figura 18. Consumo médio de ração (g)/dia durante a fase experimental (p<0,05).....	50
Figura 19. Ganho de peso durante a fase experimental (p<0,05).....	51
Figura 20. Determinação de cálcio fecal (p<0,05).....	53
Figura 21. Absorção aparente (mg Ca/dia).....	54
Figura 22. Determinação de cálcio sérico (p<0,05).....	56
Figura 23. Determinação cinética da atividade da fosfatase alcalina sérica (p<0,05).....	59
Figura 24. Determinação de cálcio ósseo no fêmur direito (p<0,05).....	62
Figura 25. Análise qualitativa da epífise proximal da tíbia direita de ratas.....	64-66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Referência de consumo dietético de cálcio por dia (<i>Dietary Reference Intake</i>).....	5
Tabela 2. mg de Cálcio em 100g de alimento.....	6
Tabela 3. Fatores de risco para osteoporose.....	15
Tabela 4. Ocorrência natural de inulina e oligofrutose em alimentos.....	24
Tabela 5. Composição centesimal da ração comercial.....	43

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO.....	1
2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1) Cálcio.....	4
2.1.1) Metabolismo de Cálcio.....	7
2.2) Sistema esquelético e sua constituição.....	12
2.3) Osteoporose.....	14
2.3.1) Tratamento.....	18
3) OBJETIVOS.....	32
3.1) Objetivo geral.....	32
3.2) Objetivos específicos.....	32
4) MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1) Ensaio biológico.....	33
4.1.1) Delineamento experimental.....	33
4.1.2) Monitoração do ganho de peso dos animais durante a fase de maturação sexual.....	35
4.1.3) Esfregaço vaginal.....	36
4.1.4) Castração.....	38
4.1.5) Dosagem de estrogênio.....	41
4.1.6) Frutooligossacarídeos (FOS).....	41
4.1.7) Hormônio.....	42
4.1.8) Dieta.....	42
4.1.9) Esquema de administração da dieta.....	43
4.2) Determinação de cálcio.....	44

4.2.1)Fecal.....	44
4.2.2)Fêmur.....	45
4.2.3)Dieta.....	45
4.2.4)Sérico.....	45
4.2.5)Lavagem do material utilizado nas análises.....	45
4.3)Determinação cinética da atividade da fosfatase alcalina sérica.....	46
4.4)Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	46
4.5)Tratamento Estatístico.....	47
5)RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	48
5.1)Ensaio biológico.....	48
5.2)Cálcio fecal.....	52
5.3)Cálcio sérico.....	55
5.4)Determinação cinética da atividade da fosfatase alcalina (ALP) sérica.....	57
5.5)Análise de cálcio ósseo (fêmur direito).....	60
5.6)Análise óssea por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	63
6)CONCLUSÕES.....	67
7)REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
8)ANEXOS.....	79

1)INTRODUÇÃO

O sistema esquelético é tão essencial à vida quanto qualquer outro sistema orgânico, pois desempenha um papel imprescindível na homeostase mineral, abriga os elementos hematopoiéticos, oferece sustentação mecânica aos movimentos, protege e determina os atributos do tamanho e forma corporais (Ranzi et al, 2000).

O osso é um tipo de tecido conjuntivo metabolicamente ativo que sofre um processo contínuo de renovação e remodelação. É singular porque é um dos poucos tecidos que normalmente se mineralizam e, bioquimicamente, é definido por uma mistura especial de matriz orgânica (35%) e elementos inorgânicos (65%). O componente inorgânico (hidroxiapatita de cálcio) é o mineral que confere força e resistência aos ossos, sendo o armazém de 99% do cálcio, 85% do fósforo e 65% do sódio e magnésio corporais. Já os componentes orgânicos, incluem-se as células ósseas e as proteínas da matriz (Ranzi et al, 2000).

Os adultos possuem dois tipos de tecido ósseo: o tecido ósseo cortical, que é o principal componente de ossos tubulares longos e caracteriza-se por ser compacto e rígido; e o tecido ósseo trabecular, que está presente particularmente nas vértebras (onde constitui aproximadamente 50% destas) e nas epífises dos ossos longos, caracterizando-se por ter uma estrutura mais esponjosa (Brouns e Vermeer, 2000).

Em indivíduos adultos a remodelação óssea é de aproximadamente 25% para o osso trabecular, e de 3% para o osso cortical, sendo que o osso trabecular apresenta uma maior relação superfície/volume e é metabolicamente mais ativo (Riggs e Melton, 1995).

Durante o crescimento e maturação esquelética, isto é, em torno de vinte anos, ocorre um acúmulo ósseo de cálcio na proporção de 150mg/dia, prevalecendo o processo de deposição deste mineral através da sobreposição da ação dos osteoblastos sobre os osteoclastos. Posteriormente, quando o indivíduo entra na idade adulta, ou seja, entre 20 e 50 anos ou até a mulher entrar na menopausa, ocorre um equilíbrio entre os processos de absorção e a reabsorção, estando o número e atividade dos osteoblastos e osteoclastos na mesma proporção. A partir dos 50 anos de idade ou nas mulheres após a menopausa, o processo de remodelação óssea se torna negativo, ou seja, a ação dos osteoclastos se sobrepõe aos osteoblastos, causando a perda óssea associada ao envelhecimento ocasionando o processo de osteoporose, que ocorre um aumento do risco de fraturas em ambos os sexos, porém, particularmente em mulheres (Cashman, 2002).

A osteoporose é definida como uma doença caracterizada por baixa massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, causando fragilidade óssea e aumento no risco de fraturas (WHO, 1994).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1999), a osteoporose tem sido reconhecida como um pandemia e segundo dados epidemiológicos para os Estados membros da União Européia, haverá mudanças na pirâmide etária com concentração mais acentuada no grupo de 80 anos ou mais e neste grupo haverá maior incidência de fraturas osteoporóticas. Esta faixa populacional passará de 8,9 milhões de mulheres e 4,5 milhões de homens em 1995 para 26,4 milhões de mulheres e 17,4 milhões de homens em 2050, representando um aumento de

50% da população idosa. O comportamento das fraturas de quadril, associadas à osteoporose, passará de 414,1 para 972 milhões, representando assim um aumento de 134% (Lanzillotti et al, 2003).

Os fatores mais importantes para a ocorrência deste desequilíbrio em mulheres são a idade e o hipoestrogenismo que ocorrem na pós-menopausa. O processo é controlado por uma complexa inter-relação de hormônios sistêmicos, força mecânica, citocinas, prostaglandinas e fatores locais de crescimento (Riggs e Melton, 1995).

De acordo com Boonen et al, 2005 e Reid, 2002, atualmente existem vários tipos de tratamento a curto e longo prazo para osteoporose, todos eles objetivando uma redução do risco de fraturas. Esses diferentes tipos de tratamento são divididos em terapias farmacológicas e não-farmacológicas, tais como: terapia de reposição hormonal (TRH), moduladores seletivos de receptores de estrogênio (SERMs), administração de calcitonina, compostos bifosfonados, agentes anabólicos (peptídeos da família do paratormônio) e suplementação de cálcio e vitamina D.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo verificar a biopotência do frutooligossacarídeo (FOS), sendo este um fator favorável para absorção de cálcio, e da terapia de reposição hormonal (TRH) no metabolismo de cálcio em ratas ovariectomizadas. Para tal, foram realizadas análises ósseas quantitativas e qualitativas, tais como: análise de cálcio e fosfatase alcalina séricos, cálcio fecal e absorção aparente bem como cálcio ósseo.

2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1) Cálcio

O cálcio é um elemento químico do grupo IIA da tabela periódica que possui dois elétrons de valência (Figura 1). Este metal em solução perde facilmente seus elétrons ficando na forma de íon positivo (Ca^{+2}). Esta propriedade eletrostática tem um efeito importante no comportamento deste íon em soluções aquosas e na participação nos processos biológicos (Wood, 2000).

O corpo humano adulto contém em torno de 1200g de cálcio, que representa 1-2% do peso corpóreo. Desse total, 99% encontram-se como tecido mineralizado na forma de fosfato de cálcio e carbonato de cálcio, promovendo rigidez e estrutura aos ossos e dentes. O restante 1% é encontrado no sangue, no fluido extracelular, músculos e outros tecidos, exercendo um papel de mediador da contração vascular e vasodilatação, contração muscular, transmissão nervosa, coagulação sanguínea e secreção glandular (Cashman, 2002; Institute of Medicine, 1997).

Dentre os macro e micronutrientes propostos como possíveis determinantes da saúde óssea e riscos de osteoporose, o cálcio é um dos que mostram uma maior inadequação no que se refere ao seu consumo na dieta (Guéguen, 2000). Guéguen (1996), por exemplo, mostrou que o percentual de consumo de cálcio da população francesa era menor do que dois terços da RDA (Tabela 1).

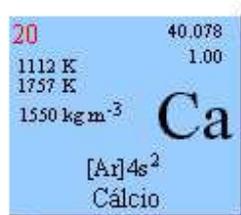


Figura 1. Cálcio como elemento químico.

Fonte: <http://nautilus.fis.uc.pt/st2.5/bitmaps/resumo-p/r020.jpg>

Tabela 1. Referência de consumo dietético de cálcio por dia de acordo com a faixa etária (*Dietary Reference Intake*) (Food and Nutrition Board, 1998)

Faixa etária	RDA ¹ /AI ² (mg/d)	UL ³ (mg/d)
0-6 meses	210	ND ⁴
7-12 meses	270	ND
1-3 anos	500	2500
4-8 anos	800	2500
Homens		
9-18 anos	1300	2500
19-50 anos	1000	2500
>51 anos	1200	2500
Mulheres		
9-18 anos	1300	2500
19-50 anos	1000	2500
>51 anos	1200	2500
Gestação		
≤18 anos	1300	2500
>19 anos	1000	2500
Lactação		
≤18 anos	1300	2500
>19 anos	1000	2500

¹RDA=Ingestão Dietética Recomendada (Recommended Dietary Allowances)

²AI=Ingestão Adequada (Adequate Intakes)

³UL=Limite Superior Tolerável de Ingestão (Tolerable Upper Intake Level)

Em média, 70% do cálcio da dieta humana é proveniente de leite e derivados, 16% de vegetais verdes e frutas secas e 6% da água (incluindo água mineral) (Guéguen e Pointillart, 2000). Alguns alimentos e seus percentuais de cálcio estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. mg de Cálcio em 100g de alimento (Franco, 1999).

<i>Alimentos</i>	<i>Cálcio (mg)</i>
Leite desidratado integral	909
Leite desidratado desengordurado	1500
Leite condensado	262
Queijo Cheddar	810
Queijo Minas Frescal	420
Queijo Prato	1026
Queijo Roquefort	315
Requeijão comum	80
Iogurte integral	120
Coalhada	490
Melaço	211
Melado de cana	591
Farinha Láctea	260
Farinha de peixe	4600
Farinha de soja	300
Brócolos, folha	513
Brócolos, flores	400
Couve-manteiga	330
Repolho verde cozido	47
Espinafre cru	95
Alface	38
Folha de beterraba	114
Agrião	168
Figo dessecado	223
Banana prata	15
Mamão maduro	21
Tangerina	41
Goiaba vermelha	17

2.1.1) Metabolismo de cálcio

O cálcio sanguíneo está em três formas diferentes: como íon livre (47%), complexado com citrato ou outros ácidos orgânicos (6,5%) ou ligado a proteínas, especialmente pré-albumina (Linder, 1991).

A manutenção da concentração sanguínea de cálcio ionizado (1,1 – 1,3mmol/L) (British Nutrition Foundation, 1989) é controlada através da absorção intestinal, excreção urinária, secreção endógena e remodelação óssea deste mineral (Cashman, 2002) (Figura 2).

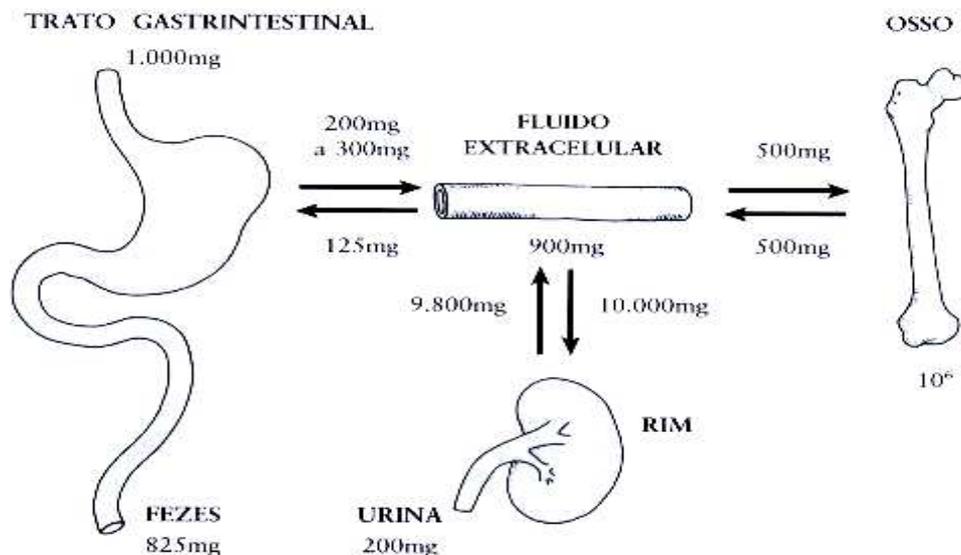


Figura 2: Modelo proposto para o metabolismo de cálcio (Heilberg, 2000).

Essa regulação envolve sistemas fisiológicos complexos, compreendendo a interação de hormônios calcitrópicos tais como paratormônio (PTH), 1,25 diidroxicolecalciferol (1,25 (OH)₂D₃, calcitonina e estrogênio (Guéguen e Pointillart, 2000; Cashman, 2002).

Somente em circunstâncias extremas, bem como desnutrição ou hiperparatireoidismo que a concentração de cálcio ionizado fica acima ou abaixo do normal (Cashman, 2002).

A secreção desses hormônios é controlada, totalmente ou parcialmente, pela concentração plasmática de cálcio ionizado, formando um sistema de feedback negativo. O PTH e a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ são secretados quando as concentrações de Ca^{+2} plasmático estão reduzidas, enquanto que a calcitonina é secretada quando as concentrações de Ca^{+2} plasmático estão elevadas (British Nutrition Foundation, 1989).

2.1.1.1) Absorção intestinal e excreção endógena

A absorção intestinal de cálcio é o resultado de dois processos, transporte ativo transcelular, principalmente no duodeno e porção superior do jejuno, e difusão passiva paracelular, que ocorre por todo intestino delgado, principalmente no íleo e muito pouco no intestino grosso (5%) (Pansu et al, 1981; Pansu e Bronner, 1999).

O sistema de transporte ativo pode se tornar saturado e é dependente da proteína calbindina. Esse sistema envolve três estágios: passagem através da borda em escova pelos enterócitos, difusão através do citoplasma e secreção através da membrana basolateral para o líquido extracelular (Weaver e Heaney, 1999).

O cálcio atravessa a membrana do enterócito por canais através de proteínas transportadoras ligadas à membrana (calmodulina e proteínas de membrana carreadoras de cálcio) (Bellaton et al, 1992).

Uma vez no interior do enterócito, o cálcio pode ser transitoriamente armazenado em organelas tais como complexo de Golgi, retículo endoplasmático e mitocôndrias ou, em seguida, atravessa o citoplasma ligado a proteínas transportadoras de cálcio (calbindina-D 9K), sendo estas um fator limitante no transporte ativo deste mineral (Bellaton et al, 1992).

O cálcio pode permanecer no citoplasma ligado à calbindina-D 9K ou este complexo pode ser incorporado aos lisossomos. Estes por sua vez, são retirados das células contra um gradiente eletroquímico por duas rotas: uma pequena fração pela troca de 3Na^+ por 2Ca^{+2} e o restante por uma bomba de cálcio, uma Ca-ATPase ativada pelo mineral, calbindina-D 9K e calmodulina (Bellaton et al, 1992).

O metabólito ativo da vitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) atua diretamente no controle do transporte ativo, já que este controla a expressão do gene da calbindina-D 9K, causando a síntese desta proteína e assim, regulando a migração do cálcio através das células intestinais. O calcitriol também tem ação liponômica, aumentando a permeabilidade da membrana e ativando a enzima Ca-ATPase (Bronner, 1992; Bellaton et al, 1992).

O transporte de cálcio por difusão passiva ocorre de forma intercelular através das junções, envolvendo movimentação de água e solutos como sódio e glicose. Este tipo de transporte não satura, portanto, aumenta conforme o consumo dietético, desde que o cálcio esteja no intestino na forma absorvível (Ca^{+2}). Este tipo de transporte é independente de vitamina D e da idade (Bronner, 1992; Bellaton et al, 1992).

Muitos componentes da dieta promovem a solubilização do cálcio, favorecendo assim sua absorção no íleo e intestino grosso por transporte passivo. Dentre esses componentes destacam-se: fosfopeptídeos derivados da caseína, L-lisina e L-arginina e a lactose bem como outros carboidratos. Todas as moléculas que aumentam a osmolaridade do líquido presente no íleo, estimulam a difusão passiva do cálcio (Pansu et al, 1979).

Outros fatores dietéticos tais como fosfatos, oxalatos, fitatos e sabões podem formar complexos insolúveis com o cálcio, reduzindo sua absorvibilidade em valores de pH próximo à neutralidade, diminuindo a absorção deste (Guéguen e Pointllart, 2000).

Devido a esses fatores nutricionais que interferem na absorção do cálcio, as taxas de absorção intestinal oscilam entre 30% e 50%. Sendo assim, é necessário haver um suprimento constante de cálcio dietético biodisponível para garantir a massa óssea máxima do programa genético individual (Lanzillotti et al, 2003).

Além da função primordial de absorção intestinal de cálcio, o intestino também excreta este mineral por meio de secreções como a bile e de maneira endógena pelas fezes (Guéguen e Pointllart, 2000).

2.1.1.2) Excreção urinária

A perda urinária de cálcio resulta do balanço entre a filtração glomerular (em torno de 10g/dia) e reabsorção tubular, que recupera em torno de 98% do total filtrado (Broadus, 1993).

O fluxo de cálcio renal também é regulado por hormônios, sendo a reabsorção tubular particularmente regulada pelo PTH (Guéguen e Pointillart, 2000).

Alguns fatores dietéticos podem influenciar na perda urinária de cálcio e dentre esses podemos citar: o consumo simultâneo de fósforo (já que todos os alimentos ricos em cálcio são também ricos em fósforo) e certos constituintes dietéticos que aumentam o pH (ex: bicarbonato e sais de potássio) (Guéguen e Pointillart, 2000).

A perda de cálcio urinário pode ser potencializada por dietas ocidentais que contenham fatores desfavoráveis tais como proteína de origem animal (especialmente proteínas que contêm altas concentrações de aminoácidos sulfurados), sulfatos, sódio, café, chá e álcool (Guéguen e Pointillart, 2000).

2.1.1.3) Remodelação óssea

O sistema esquelético também desempenha um papel imprescindível na homeostase de cálcio ionizado sanguíneo através da remodelação esquelética, mantendo sua concentração. Essa remodelação se faz através de hormônios sistêmicos, bem como por algumas citocinas. Dentre os hormônios podemos citar: o paratormônio (PTH) e a 1,25 diidroxivitamina D₃, que atuam

especificamente sobre a reabsorção óssea, influenciando na atividade dos osteoclastos; os esteróides sexuais (androgênio e estrogênio) que têm como principal atuação inibir a reabsorção óssea, apesar de apresentarem receptores específicos na membrana plasmática dos osteoblastos e; a calcitonina, um hormônio polipeptídico endógeno que também inibe a reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos, porém, seu efeito é apenas transitório. Alguns estudos mostram que tratamentos de longa duração com calcitonina diminuem os receptores deste hormônio nos osteoclastos e, conseqüentemente, sua atividade de diminuição da reabsorção óssea (Cashman, 2002; Guéguen e Pointillart, 2000; Takahashi et al, 1995; Reginster, 1991).

Dentre as citocinas que promovem a remodelação óssea, podemos citar: interleucina-1 α (IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), fator de transformação do crescimento- α (TGF- α) e o fator estimulador de colônia-1 (CSF-1), que atuam nos mecanismos de reabsorção óssea (Kobayashi et al, 2005; Teitelbaum, 2004); já a interleucina-18, o interferon- γ e fator de crescimento tumoral- β (TGF- β) são citocinas que impedem a reabsorção óssea, favorecendo a mineralização (Teitelbaum, 2004).

2.2) Sistema esquelético e sua constituição

O sistema esquelético é tão essencial à vida quanto qualquer outro sistema orgânico, pois desempenha um papel imprescindível na homeostase mineral, abriga os elementos hematopoiéticos, oferece sustentação mecânica aos movimentos, protege e determina os atributos do tamanho e forma corporais (Ranzi et al, 2000).

O osso é um tipo de tecido conjuntivo metabolicamente ativo que sofre um processo contínuo de renovação e remodelação. É singular porque é um dos poucos tecidos que normalmente se mineralizam e, bioquimicamente, é definido por uma mistura especial de matriz orgânica (35%) e elementos inorgânicos (65%). O componente inorgânico (hidroxiapatita de cálcio) é o mineral que confere força e resistência aos ossos, sendo o armazém de 99% do cálcio, 85% do fósforo e 65% do sódio e magnésio corporais. Já os componentes orgânicos, incluem-se as células ósseas e as proteínas da matriz (Ranzi et al, 2000).

A massa óssea máxima é atingida durante o início da idade adulta (25 anos) e sua magnitude é determinada principalmente por fatores hereditários, entretanto, a atividade física, força muscular, dieta e estado hormonal também contribuem (Ranzi et al, 2000).

Durante o crescimento e maturação esquelética, isto é, em torno de vinte anos, ocorre um acúmulo ósseo de cálcio na proporção de 150mg/dia, prevalecendo o processo de deposição deste mineral através da sobreposição da ação dos osteoblastos sobre os osteoclastos. Posteriormente, quando o indivíduo entra na idade adulta, ou seja, entre 20 e 50 anos ou até a mulher entrar na menopausa, ocorre um equilíbrio entre os processos de absorção e a reabsorção, estando o número e atividade dos osteoblastos e osteoclastos na mesma proporção. A partir dos 50 anos de idade ou nas mulheres após a menopausa, o processo de remodelação óssea se torna negativo, ou seja, a ação dos osteoclastos se sobrepõe aos osteoblastos, causando a perda óssea associada ao envelhecimento. Com isso, ocorre um aumento do risco de fraturas em ambos os sexos, porém, particularmente em mulheres (Cashman, 2002).

Sendo assim, o consumo adequado de cálcio é um fator crítico para se alcançar um ótimo pico de massa óssea e modificar a proporção de perda óssea fisiológica associada ao envelhecimento (NIH, 1994).

Os adultos possuem dois tipos de tecido ósseo: o tecido ósseo cortical, que é o principal componente de ossos tubulares longos e caracteriza-se por ser compacto e rígido; e o tecido ósseo trabecular, que está presente particularmente nas vértebras (onde constitui aproximadamente 50% destas) e nas epífises dos ossos longos, caracterizando-se por ter uma estrutura mais esponjosa (Brouns e Vermeer, 2000).

Em indivíduos adultos a remodelação óssea é de aproximadamente 25% para o osso trabecular, e de 3% para o osso cortical, sendo que o osso trabecular apresenta uma maior relação superfície/volume e é metabolicamente mais ativo (Riggs e Melton, 1995).

2.3) Osteoporose

A osteoporose é definida como uma doença caracterizada por baixa massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, causando fragilidade óssea e aumento no risco de fraturas (WHO, 1994).

Como já citado anteriormente, a massa esquelética máxima é formada ao redor de 20 a 25 anos quando então se estabiliza, passando a haver um equilíbrio que segue adiante até 50 anos ou em mulheres até a menopausa. A partir daí, um pequeno déficit na formação óssea se acumula a cada ciclo de reabsorção e formação das unidades multicelulares básicas. Isso se dá porque a

seqüência de remodelagem não é completamente eficaz, prevalecendo a ação dos osteoclastos, e assim, a perda óssea relacionada à idade se caracteriza como um fenômeno biológico normal e previsível (Ranzi, Vinay e Tucker, 2000; Cashman, 2002).

As influências mais importantes para a ocorrência deste desequilíbrio em mulheres são a idade e o hipostrogenismo que ocorre na pós-menopausa. O processo é controlado por uma complexa interrelação de hormônios sistêmicos, força mecânica, citocinas, prostaglandinas e fatores locais de crescimento (Riggs e Melton, 1995).

Tabela 3. Fatores de risco para osteoporose (Mahan e Escott-Stump, 1998).

História familiar de osteoporose
Sexo feminino
Branco ou asiáticos
Depleção de estrogênio
Idade (especialmente após os 60 anos)
Sedentarismo
Tabagismo
Etilismo
Consumo excessivo de cafeína
Uso prolongado de certos medicamentos (antiácidos, esteróides, tetraciclina, anticonvulsivantes, hormônio tireoidiano exógeno, etc)
Ingestão inadequada de cálcio ou vitamina D

A Organização Mundial da Saúde (WHO, 1994) propôs uma estratificação da osteoporose. De acordo com esta classificação, uma pessoa pode ser diagnosticada como portadora de osteoporose se apresentar densidade mineral óssea, em relação ao adulto jovem, menor que -2,5 desvios-padrões, independente da ocorrência de uma fratura e, quando a

densidade mineral óssea estiver entre -1 e -2,5 desvios padrões, diagnosticada como osteopenia, sendo as pessoas nesta condição consideradas de alto risco para fraturas.

Os dois tipos mais comuns de osteoporose são: a osteoporose pós-menopausa (associada à deficiência hormonal ovariana) e a senil (associada à idade). Ambos os tipos são desordens progressivas que causam a perda da integridade do esqueleto, principalmente nas vértebras, quadril, antebraço distal, úmero e pélvis. A osteoporose senil afeta o tecido ósseo cortical e trabecular e afeta indivíduos idosos de ambos os sexos (Brouns e Vermeer, 2000).

Já a osteoporose pós-menopausa afeta primariamente o tecido ósseo trabecular e caracteriza-se por uma aceleração da perda óssea que ocorre durante a década seguinte à menopausa. A deficiência de estrogênio desempenha um papel importante nesse fenômeno, e a reposição deste hormônio protege contra a perda óssea, sendo que este tipo de osteoporose possui grande significância na morbi-mortalidade de mulheres na menopausa (Brouns e Vermeer, 2000; Ranzi, Vinay e Tucker, 2000; Reddy e Lakshmana, 2003).

A diminuição nas concentrações de estrogênio circulante leva a ativação nos ciclos de remodelação óssea, com predomínio nas fases de reabsorção (osteoclastos) em relação às de formação (osteoblastos), devido ao aumento do número e da atividade dos osteoclastos na superfície dos ossos trabeculares. Também tem sido sugerido que os osteoclastos tornam-se mais ativos, possivelmente pela diminuição nas taxas de apoptose (induzidas pelo estrogênio) ao final de cada fase de reabsorção, resultando em grandes cavidades que são parcialmente reparadas pela atividade dos osteoblastos (Writing group for the women's health initiative investigators, 2002).

Dessa forma, a perda óssea decorrente da menopausa está associada à excessiva atividade e ao aumento no número de osteoclastos, enquanto a perda óssea associada ao envelhecimento está mais relacionada à diminuição da atividade e no número de osteoblastos (Writing group for the women's health initiative investigators, 2002).

Riggs (1981) e Ensrud (1995) demonstraram que a densidade mineral óssea em mulheres diminui linearmente a uma proporção de aproximadamente $9,2\text{mg}/\text{cm}^2$ por ano na faixa etária de 30 a 96 anos e $2,5\text{mg}/\text{cm}^2$ por ano na faixa etária de 67 a 69 anos e, $10,4\text{ mg}/\text{cm}^2$ por ano acima de 85 anos de idade, respectivamente. Ensrud (1995) também observou que o risco de fratura aumentou em 21% para cada cinco anos após os 85 anos de idade.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1999), a osteoporose tem sido reconhecida como uma pandemia e segundo dados epidemiológicos para os Estados membros da União Européia, haverá mudanças na pirâmide etária com concentração mais acentuada no grupo de 80 anos ou mais e neste grupo haverá maior incidência de fraturas osteoporóticas. Esta faixa populacional passará de 8,9 milhões de mulheres e 4,5 milhões de homens em 1995 para 26,4 milhões de mulheres e 17,4 milhões de homens em 2050, representando um aumento de 50% da população idosa. O comportamento das fraturas de quadril, associadas à osteoporose, passará de 414,1 para 972 milhões, representando assim um aumento de 134% (Lanzillotti et al, 2003).

2.3.1) Tratamento

De acordo com Boonen et al, 2005 e Reid, 2002, atualmente existem vários tipos de tratamento a curto e longo prazo para osteoporose, todos eles objetivando uma redução do risco de fraturas. Esses diferentes tipos de tratamento podem ser divididos em terapias farmacológicas e não-farmacológicas, tais como: terapia de reposição hormonal (TRH), moduladores seletivos de receptores de estrogênio (SERMs), administração de calcitonina, compostos bifosfonados, agentes anabólicos (peptídeos da família do paratormônio) e suplementação de cálcio e vitamina D.

Especialmente nos primeiros anos após a última menstruação, a TRH é recomendada para prevenção da osteoporose, pois possui a capacidade de aumentar a massa óssea sendo a melhor opção para prevenção de fraturas, além de propiciar benefícios adicionais às mulheres (Torgenton e Bell-Syer, 2001).

Outra vantagem é o fato desta terapia estar disponível sob várias formas, doses e vias de administração, ser relativamente de baixo custo e segura para a maioria das mulheres quando bem indicada e monitorada (Torgenton e Bell-Syer, 2001).

Porém, em pacientes com útero deve ser utilizada com cuidado, sendo necessária a adição de progesterona para proteção endometrial, pois em alguns casos pode acarretar aumento na incidência de câncer de mama e tromboembolismo (Writing group for the women's health initiative investigators, 2002).

Convencionalmente os estrogênios mais utilizados em terapia de reposição hormonal com efeitos benéficos sobre o osso são: estrogênios eqüinos conjugados (0,625mg/dia), 17 β -estradiol (1-2mg/dia) e valerato de estradiol (1-2mg/dia) via oral; 17 β -estradiol (50 μ g/dia) transdérmico; 17 β -estradiol (1,5mg/dia) percutâneo ou nasal e; 17 β -estradiol (25-50mg/semestral) subcutâneo (Writing group for the women's health initiative investigators, 2002).

Os SERMs são compostos não hormonais que possuem propriedades de se ligarem aos receptores de estrogênio em vários tecidos. Eles se comportam como agonistas em alguns tecidos alvos, como por exemplo ossos e fígado e, como antagonistas nas mamas e de acordo com a droga, em outros órgãos sexuais como o útero (Riggs e Hartmann, 2003).

A primeira geração de SERMs (ex: tamoxifeno) foi encontrada incidentalmente contra a perda óssea (Ryan et al, 1991) e tem sido usado largamente como fator de prevenção secundária do câncer de mama (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 1998).

Já o raloxifeno e benzotiofeno (classificados com a segunda geração de SERMs) possuem atividade mais seletiva que os primeiros e tem sido estudados na prevenção e tratamento da osteoporose, mulheres osteoporóticas tratadas por 3 anos com raloxifeno reduziram o risco de fraturas vertebrais (Ettinger et al, 1999; Boonen et al, 2005).

Em relação ao tratamento com o hormônio calcitonina, a maioria dos estudos clínicos utilizam este hormônio proveniente do salmão, que é 40 a 50 vezes mais potente do que a calcitonina humana, sendo esta administrada por injeção ou aplicação nasal (200UI de calcitonina

nasal é equivalente à 50UI injetável). Esses trabalhos demonstraram a prevenção da perda óssea trabecular em ratas na pós-menopausa (Plosker e McTavis, 1996; Silverman, 2001).

A calcitonina pode ter também um efeito analgésico em mulheres com fratura vertebral recente, porém este efeito é independente do efeito sobre a reabsorção óssea mediada por osteoclastos (Plosker e McTavis, 1996; Carstens, 1991).

Os compostos bifosfonados podem ser divididos em dois grupos de acordo com seus principais mecanismos de ação: bifosfonados contendo nitrogênio e bifosfonados não contendo nitrogênio, principalmente etidronato e clodronato. Os bifosfonados atuam preferencialmente nos sítios de atividade de remodelação óssea. Eles atuam diretamente na maturação dos osteoclastos, diminuindo sua atividade de reabsorção óssea através da redução de H^+ e perda de cálcio, modificando a atividade de várias enzimas (Zimolo et al, 1995).

Além disso, os compostos bifosfonados podem induzir a apoptose dos osteoclastos. O clodronato, mas não os aminobifosfonados, podem ser metabolizados a um análogo da adenosina trifosfato (ATP), no qual é tóxico aos macrófagos e osteoclastos (Frith et al, 1997).

Os agentes anabólicos são polipeptídeos sintéticos chamados de teriparatida obtidos por técnica de DNA recombinante, nos quais contém os aminoácidos 1 a 34 da região amino-terminal do hormônio das paratireóides (PTH) humano. Os primeiros 34 aminoácidos da molécula completa de 84 aminoácidos do PTH endógeno (PTH-1-84) são responsáveis pela sua ação biológica. Portanto, a teriparatida é idêntica à fração biologicamente ativa do PTH (1-84) endógeno e, administrada de forma intermitente, estimula a formação de tecido ósseo, melhora a

arquitetura óssea, o que aumenta a força óssea e leva a uma redução do risco de fraturas (Rosen e Bilezikian, 2001).

A eficácia da suplementação de cálcio e vitamina D na redução de fraturas não vertebrais foi demonstrada por Chapuy et al (1992, 1994 e 2002), já que a deficiência de cálcio relacionada ao consumo inadequado de alimentos ricos em cálcio aumenta a concentração de hormônio PTH sérico e conseqüentemente a perda óssea (NIH, 1994).

Alguns alimentos funcionais, principalmente determinados tipos de oligossacarídeos como frutooligossacarídeos (FOS) e galactooligossacarídeos (GOS), têm sido sugeridos como estimuladores da absorção de minerais como o cálcio, favorecendo assim o balanço positivo deste (Scholz-Ahrens e Schrezenmeir, 2002).

2.3.1.1) Frutooligossacarídeos (FOS)

Os sacarídeos (carboidratos) são açúcares encontrados naturalmente em muitos alimentos como frutas, vegetais, leite e mel. Alguns destes denominados de ingredientes funcionais também exibem atividade fisiológica além da função nutricional ou de adoçante (Nakano, 1998).

Eles melhoram a qualidade dos alimentos, promovendo uma modificação no sabor e nas características físico-químicas, e ainda apresentam propriedades benéficas para a saúde do consumidor (Crittenden e Playne, 1996).

Os carboidratos que participam da dieta são classificados pelo peso molecular e pelo grau de polimerização (GP) em monossacarídeos, oligossacarídeos ($2 < GP < 10$) e polissacarídeos ($GP > 10$) (Voragen, 1998).

Outro tipo de classificação, baseada nas propriedades fisiológicas, é quanto a ser digerível e não digerível. Nesse caso há três principais tipos de carboidratos não digeríveis: os polissacarídeos não amídicos, os amidos resistentes e os oligossacarídeos não digeríveis (NDOs). Os NDOs mais utilizados como ingredientes em alimentos são os frutooligossacarídeos (FOS) e os galactooligossacarídeos (GOS), sendo chamados de alimentos funcionais (Voragen, 1998).

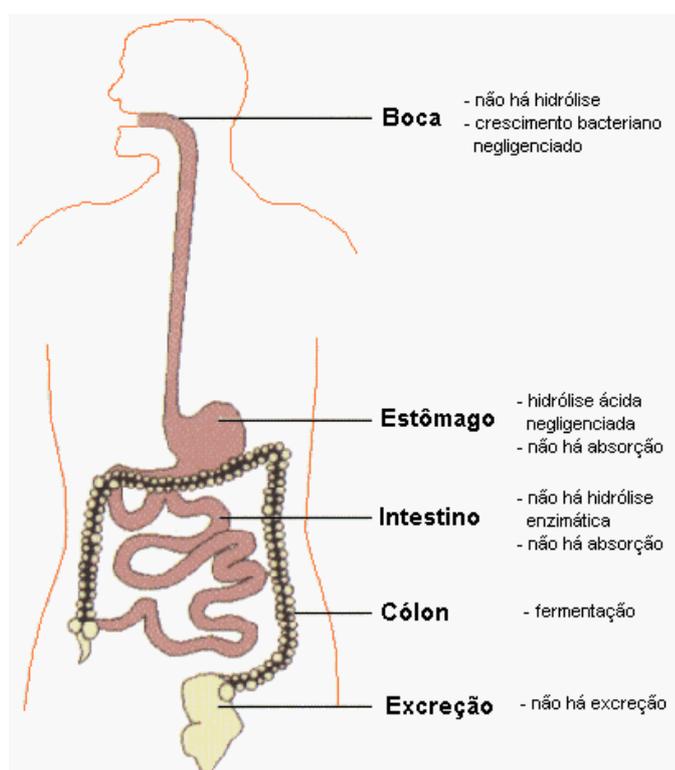


Figura 3. Comportamento dos NDOs no trato digestório humano.

Fonte: <http://geocities.yahoo.com.br/anutricao>

Os FOS constituem um grupo de oligossacarídeos derivados da sacarose e são isolados de vegetais (Kaur e Gupta, 2002). Neste grupo se incluem a inulina (cujo grau de polimerização está entre 2 e 60) e a oligofrutose, que é produzida pela hidrólise enzimática parcial da própria inulina (grau de polimerização sempre menor que 10, ficando em torno de 5) (Kruger et al, 2003).

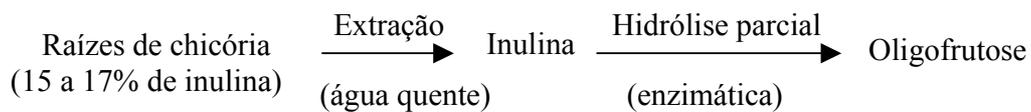


Figura 4. Processo de produção da oligofrutose.

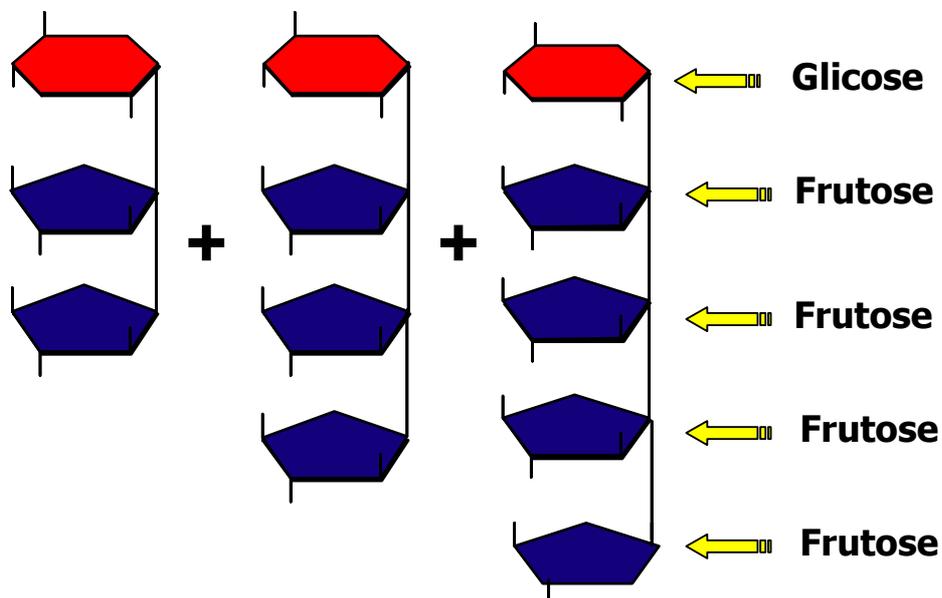


Figura 5. Estrutura molecular dos FOS.

O uso dos FOS na saúde e nutrição se dá em diversas áreas. Experimentos têm ressaltado seu uso como um agente bifidogênico, estimulador do sistema imunológico, reguladores do trato gastrointestinal, melhorador do metabolismo lipídico, redutor da incidência de câncer de cólon, redutor da síntese de triglicerídeos, dentre outros (Kaur e Gupta, 2002) (Figura 6).

Tabela 4. Ocorrência natural de inulina e oligofrutose em alimentos (Roberfroid et al, 1993).

<i>Fonte</i>	<i>Inulina (%)</i>	<i>Oligofrutose (%)</i>	<i>Nome científico</i>
Banana	0,3-0,7	0,3-0,7	<i>Musa sp.</i>
Centeio	0,5-1,0	0,5-1,0	<i>Secale cereale</i>
Alho-poró	3-10	2,5-8,0	<i>Allium ampeloprasum</i>
Trigo	1-4	1-4	<i>Triticum aestivum</i>
Alho	9-16	3,5-6,5	<i>Allium sativum</i>
Raiz da chicória	15-20	8-11	<i>Cichorium intybus</i>
Aspargo (broto)	2-3	2-3	<i>Asparagus officinalis</i>
Alcachofra Jerusalém	16-20	12-15	<i>Helianthus tuberosus</i>
Alcachofra (esfera)	3-10	0,3-1,0	<i>Cynara scolymus</i>
Cebola	1,1-7,5	1,1-7,5	<i>Allium cepa</i>
Dente-de-leão	12-15	9,5-12	<i>Taraxacum officinale</i>

Como agentes bifidogênicos, os FOS são facilmente fermentados pelas bactérias intestinais encontradas no ceco, aumentando o número e a atividade destas, principalmente as bifidobactérias (Tabela 5). Este processo é altamente seletivo para oligofrutoses com ligações osídicas β 1-2 (Roberfroid et al, 1993).

As reações ocorridas durante a fermentação são de tal intensidade que o valor do pH é reduzido facilmente a partir de 7,0-7,5 para 6,0-6,5, estando esse fator associado à melhora na absorção de íons positivos e, a temperatura pode aumentar em até 0,7°C (Márquez, 1999).

Uma vez liberada pela hidrólise das oligofrutoses, a β D-frutose atua como um substrato de vias metabólicas distintas pelas quais as bifidobactérias oxidam os carboidratos, sendo essas vias chamadas “*vias Bifidus*” (Roberfroid et al, 1993).

Nessas vias, a enzima fosfocetolase promove a fosforólise da frutose-6-fosfato e xilulose-5-fosfato, que produzem acetilfosfato mais eritrose 4-fosfato e gliceraldeído 3-fosfato, respectivamente (a enzima frutose-6-fosfato fosfocetolase é específica de bifidobactérias) (Figura 6 e 7) (Roberfroid et al, 1993).

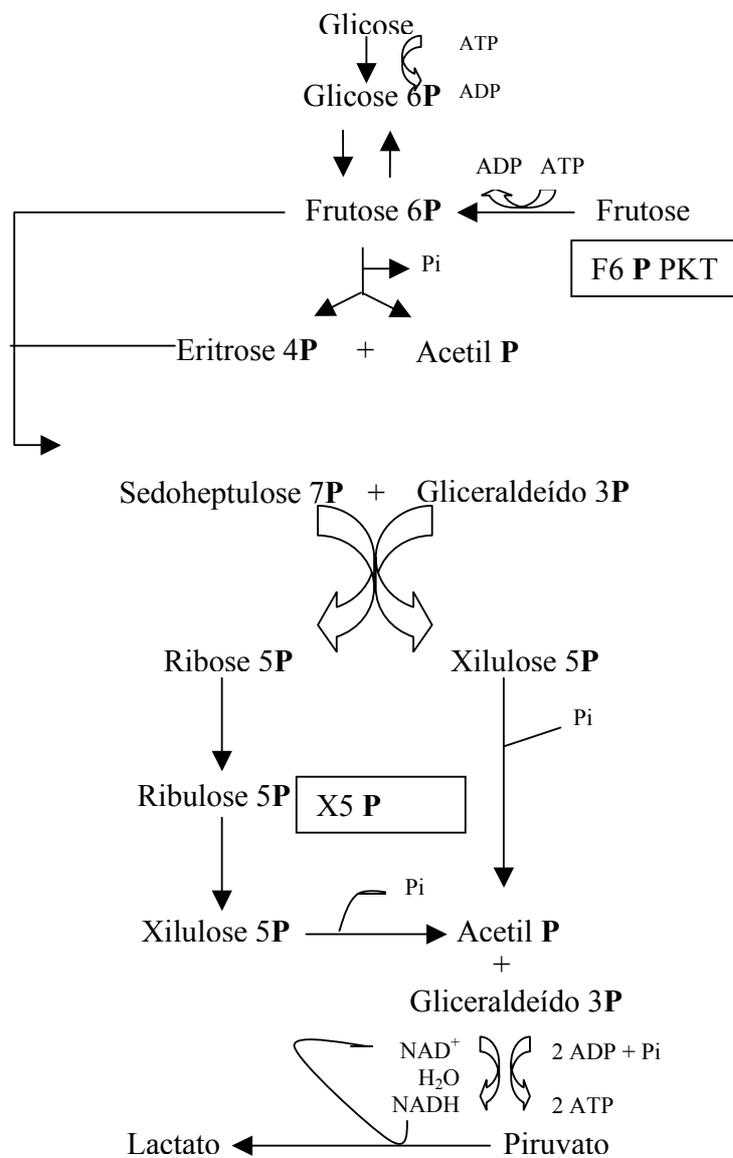


Figura 6. *Via Bifidus* para fermentação de hexose. (Enzimas específicas: frutose-6-fosfocetolase – F6 Pkt e xilose-5-fosfocetolase – X5 PKT) (Roberfroid et al, 1993).

De acordo com De Vries e Stouthamer (1968) citados por Roberfroid et al (1993), a equação estequiométrica da fermentação de hexoses pelas bifidobactérias é a seguinte:



O rendimento absoluto ou produtos parciais da fermentação (em particular, acetato:lactato) podem variar a quantidade de acordo com a espécie da *Bifidobacterium*. Esses parâmetros também podem ser influenciados pela natureza e concentração do substrato. Contudo, somente alguns produtos do metabolismo das bifidobactérias pode ser fermentado novamente no cólon (ex: piruvato e lactato) (Roberfroid et al, 1993).

A principal via do metabolismo do piruvato/lactato durante a fermentação bacteriana foi descrita por Krebs e Kornberg (1957) e Miller e Wolin (1979) citados por Roberfroid et al (1993) e mostrada na Figura 8.

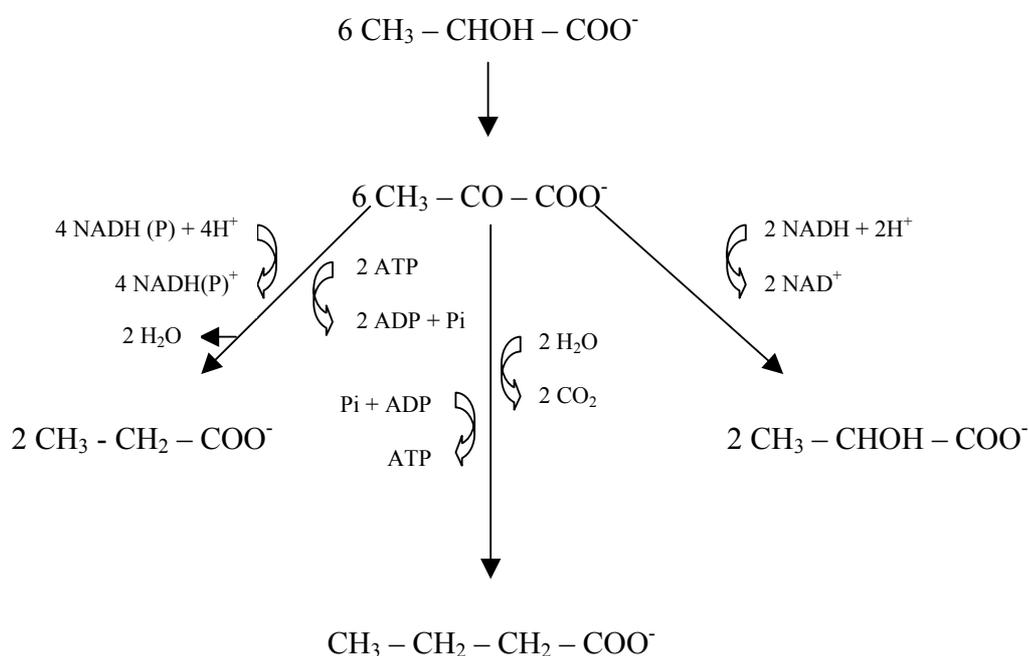
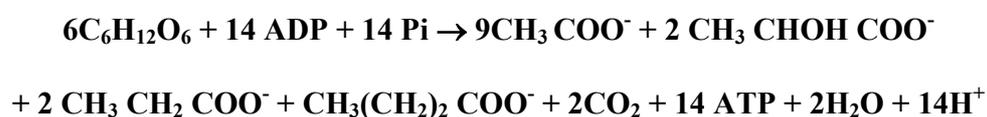


Figura 8. Vias microbiológicas do metabolismo anaeróbico de lactato/piruvato para formação de ácidos graxos de cadeia curta.

Fonte: (Roberfroid et al, 1993).

Dessa forma, a equação estequiométrica da fermentação do frutossil pelas bactérias intestinais pode ser representada da seguinte forma (Krebs e Kornberg, 1957; Miller e Wolin, 1979 citados por Roberfroid et al, 1993).



Baseado nesta equação pode-se observar que 78% dos átomos de carbono da hexosil fermentada são convertidos em ácidos graxos de cadeia curta (SCFA), tais como acetato, propionato e butirato, em uma proporção de 64:21:15% respectivamente. Além dos SCFA, são

produzidos lactato (17%), etanol (5%) e CO₂ (Roberfroid et al, 1993). Younes et al (2001) e Mineo et al (2001), demonstraram que os ácidos graxos de cadeia curta aumentam o transporte de cálcio e outros minerais no epitélio do ceco e cólon de ratos.

As propriedades de dispersibilidade e a capacidade de retenção de água dos NDOs determinam a habilidade das bactérias penetrarem no bolo alimentar e degradarem a fibra. Dessa forma, os NDOs com maior capacidade de reterem água (fibra alimentar solúvel e amido resistente) geralmente são mais facilmente fermentadas do que aqueles com menor capacidade de reter água (fibra alimentar insolúvel), estando os FOS classificados em substâncias semelhantes às fibras hidrossolúveis em sua maioria (Márquez, 1999).

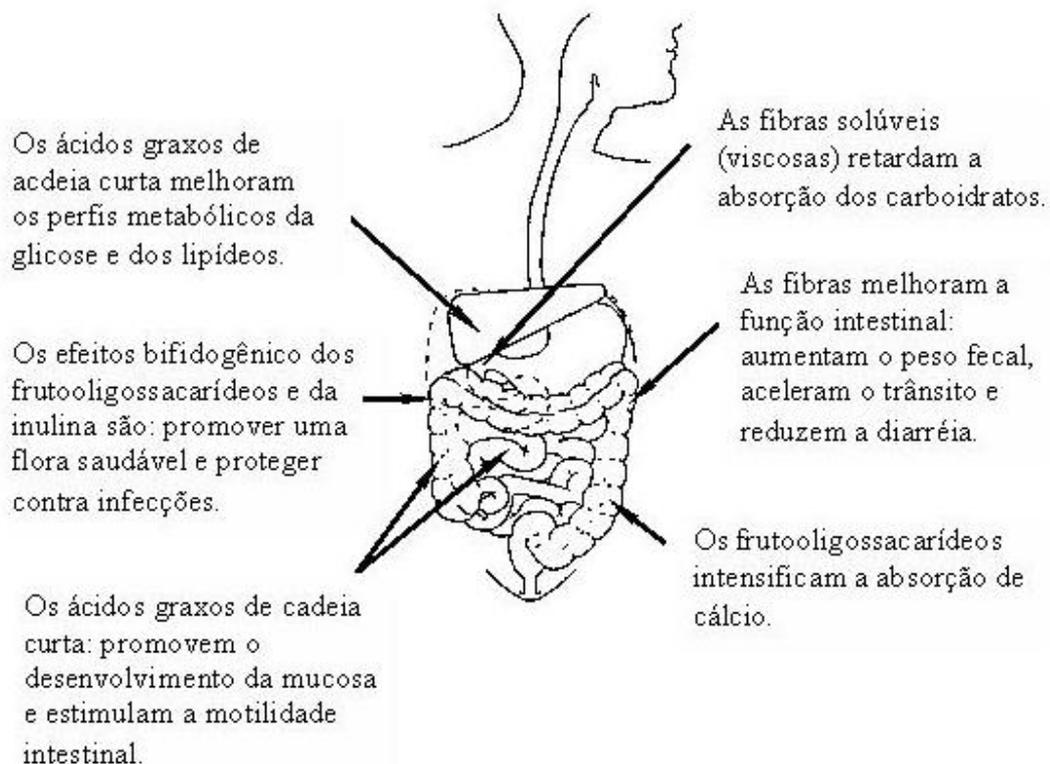


Figura 9. Efeitos benéficos das fibras no organismo animal (Gibson et al, 1995).

Taguchi et al, 1995 demonstraram que uma pequena adição de frutooligosacarídeo (cerca de 2,5 à 5%) na dieta de ratas ovariectomizadas, que são um modelo bem aceito de mulheres na fase pós-menopausa, impediram a perda óssea. Kruger et al, 2003, mostraram ainda que o FOS com diferentes graus de polimerização tem diferentes efeitos na absorção e retenção de cálcio, na densidade óssea e na excreção de colágeno.

Sendo assim, este trabalho tem como objetivo estudar a biopotência dos frutooligosacarídeos (FOS) e da terapia de reposição hormonal (TRH) no metabolismo de cálcio de ratas ovariectomizadas.

3) OBJETIVOS

3.1)Objetivo geral

- Verificar a biopotência do pré-biótico FOS obtido a partir da inulina (hidrólise enzimática) e da terapia de reposição hormonal (TRH) no metabolismo de cálcio em ratas ovariectomizadas.

3.2)Objetivos específicos

- Determinar o conteúdo de cálcio nas amostras de fezes (mg/g fezes).
- Determinar a absorção aparente de cálcio.
- Determinar o cálcio sérico.
- Determinar a atividade da fosfatase alcalina sérica.
- Determinar o conteúdo de cálcio no fêmur direito dos animais.
- Analisar qualitativamente a epífise proximal da tíbia direita através de microscopia eletrônica de varredura.

4) MATERIAIS E MÉTODOS

4.1)Ensaio biológico

Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar, recém-desmamadas (21 dias), provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB), SP.

4.1.1)Delineamento experimental

As ratas foram obtidas após o desmame (21 dias) e criadas até completarem três meses de vida (90 dias), quando foi dado início ao experimento. Nessa fase, tendo as ratas atingido a maturação sexual (sendo confirmado através da observação do esfregaço vaginal), as mesmas foram submetidas a um procedimento cirúrgico de castração, sendo divididas em dois grupos: castradas e não castradas (o grupo das ratas não castradas foi submetido ao mesmo estresse cirúrgico que o grupo das ratas castradas, simulando assim uma falsa castração).

Após esse procedimento cirúrgico, transcorreram 30 dias (fase de depleção) para que houvesse a potencialização na diminuição das concentrações de cálcio no organismo dos animais e, após esse período, as ratas castradas e não castradas, com 120 dias de idade, receberam ou não o FOS em associação ou não com hormônio sintético por 20 dias (fase experimental) (Figura 10).

As ratas foram mantidas em caixas plásticas (seis animais por caixa) até a castração, sendo posteriormente colocadas em gaiolas individuais. A temperatura ambiente foi de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e o ciclo de 12h/dia e 12h/noite.

O consumo de ração foi monitorado duas vezes por semana e o peso dos animais uma vez por semana. A água oferecida *ad libitum* durante todo experimento foi desionizada.

No final do experimento, o sacrifício dos animais foi realizado através de anestesia prévia com pentobarbital sódico (40mg/Kg) e exsanguinação retro-ocular e punção cardíaca (Reddy e Lakshmana,2003).

O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP (protocolo nº 641.7 - Anexo 1).

O experimento foi realizado dividindo-se os animais em seis grupos de dez animais cada, nos quais corresponderam aos seguintes tratamentos:

Grupo 1: Falsa castração + gavagem com FOS

Grupo 2: Falsa castração + gavagem com água

Grupo 3: Castração + gavagem com FOS + injeção de hormônio

Grupo 4: Castração + gavagem com FOS + injeção de solução salina

Grupo 5: Castração + gavagem com água + injeção de hormônio

Grupo 6: Castração + gavagem com água + injeção de solução salina

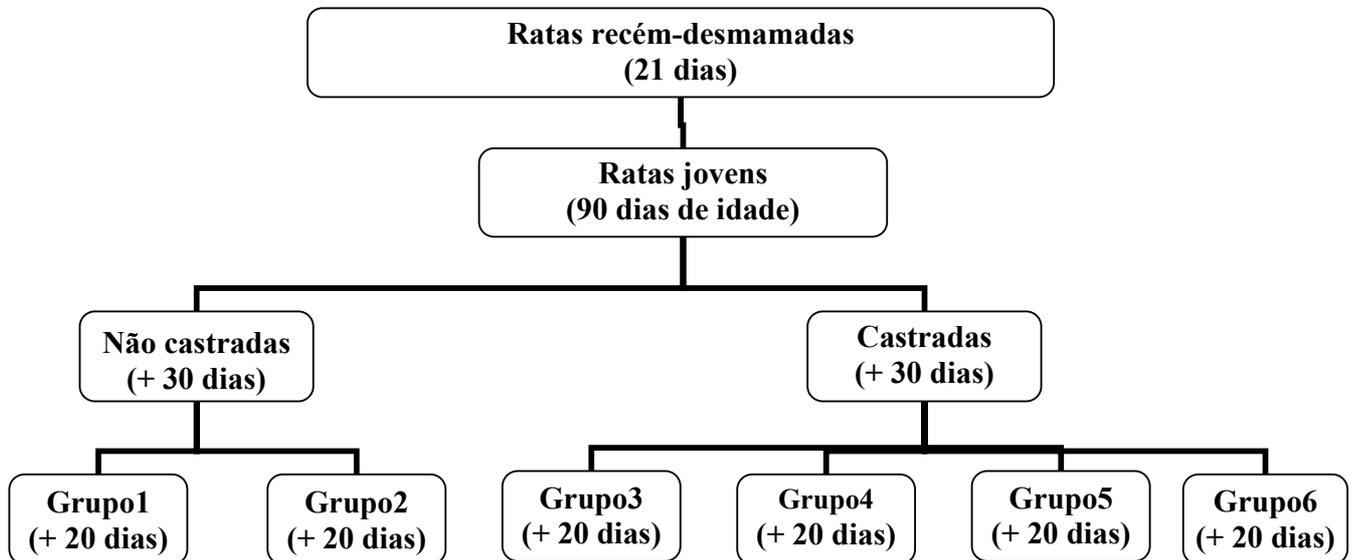
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Figura 10. Esquema experimental dos grupos de estudo

4.1.2) Monitoração do ganho de peso dos animais durante a fase de maturação sexual

Durante a fase de maturação sexual, o ganho de peso dos animais foi monitorado uma vez por semana a fim de se controlar o crescimento dos mesmos, como pode ser observado na Figura 11.

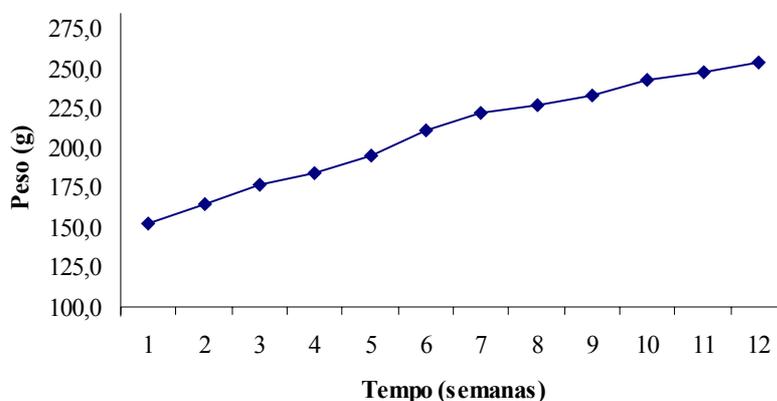


Figura 11. Ganho de peso dos animais durante a fase de maturação sexual

4.1.3) Esfregaço vaginal

O esfregaço vaginal foi realizado ao final da fase de maturação sexual, através do método de Shorr, com a finalidade de confirmação do ciclo estral das fêmeas (idade adulta) (Figura 12) (Gonzalez et al, 1960).

Este ciclo divide-se em quatro fases: a primeira é o estro, fase do período sexual de receptividade do macho (12 horas), quando a fêmea permite a monta e a cópula. Neste período ocorre o predomínio de células corneificadas na citologia esfoliativa vaginal; posteriormente, mais especificamente 21 horas após o estro, ocorre a fase de metaestro na qual a citologia esfoliativa vaginal é representada pela presença de muitos leucócitos entre poucas células corneificadas; a fase seguinte é a mais longa do ciclo estral (57 horas) e caracteriza-se por grande quantidade de leucócitos no esfregaço vaginal e quase ausente em células corneificadas, sendo

denominada de diestro; o ciclo termina com uma fase preparatória do próximo estro denominada de proestro. Nesta fase com duração de 12 horas, o esfregaço da citologia esfoliativa vaginal apresenta células epiteliais nucleadas não corneificadas e já há sinais de receptividade do macho no fim deste período.

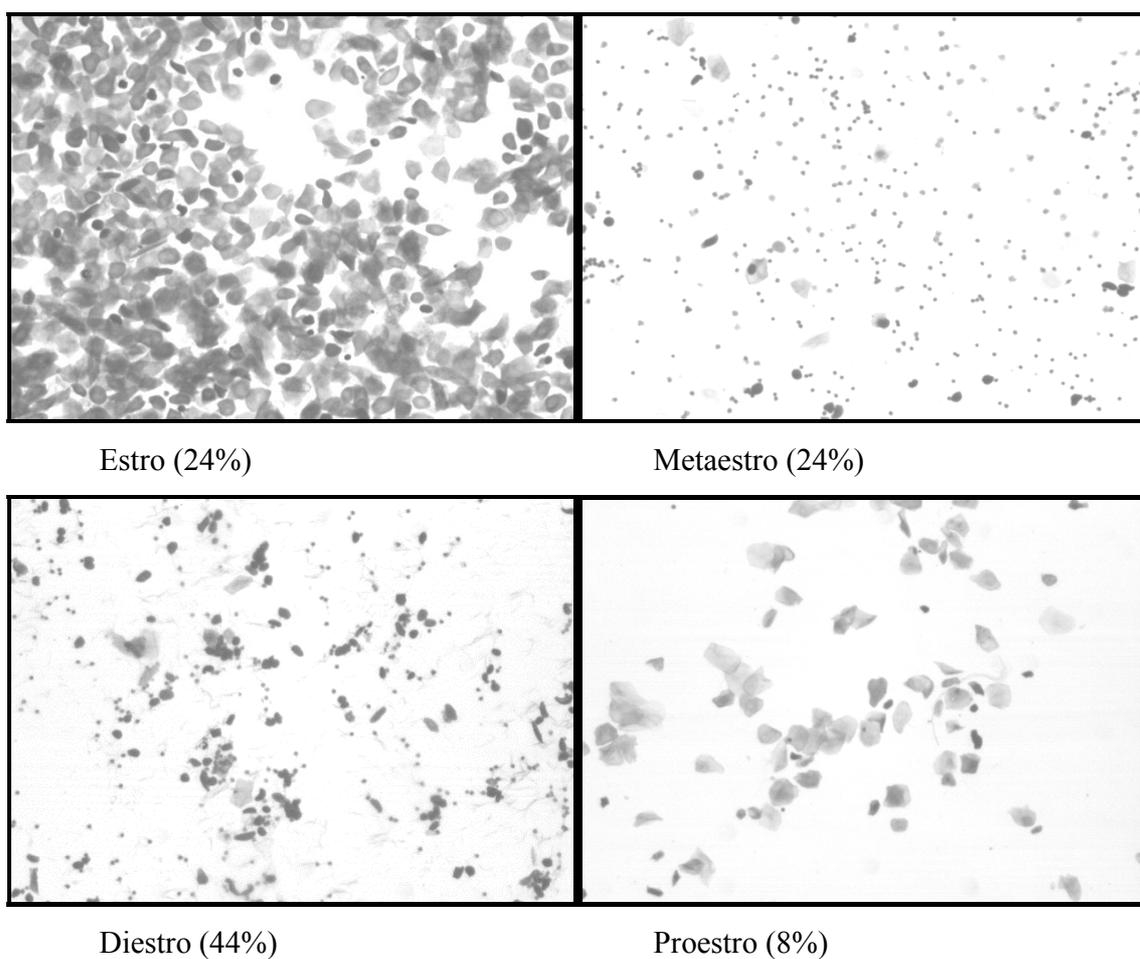
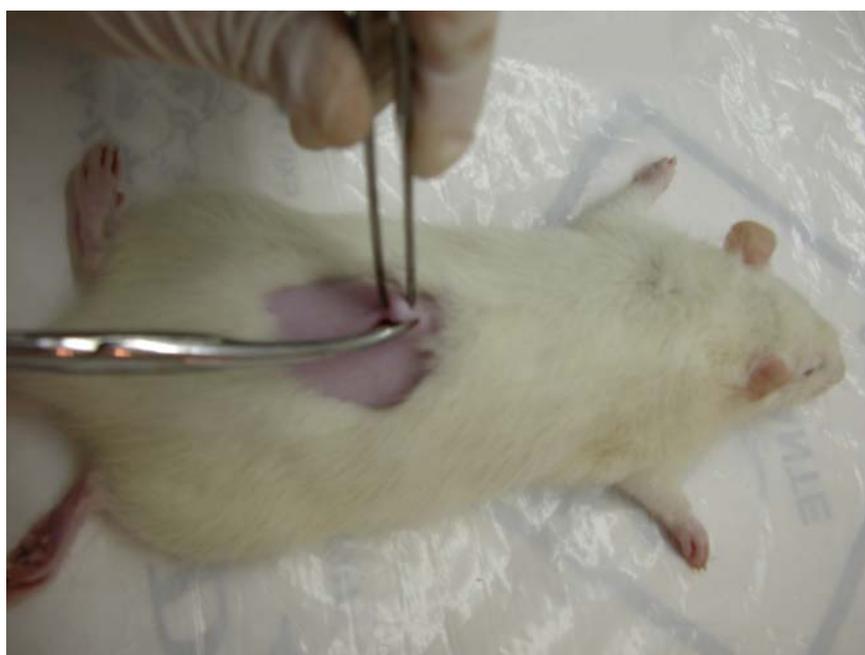


Figura 12. Esfregaço vaginal (1,25x; 12,5x / hematoxilina)

4.1.4)Castração

Após a confirmação da idade adulta, foi realizada a castração bilateralmente utilizando-se como anestésico pentobarbital sódico (40 mg/Kg), sendo este administrado através de injeção intraperitoneal (Reddy e Lakshmana,2003) (Figuras 13 a, b, c, d; Figura 14).



a



b



c



Figura 13 (a, b, c, d). Fases do processo de castração.

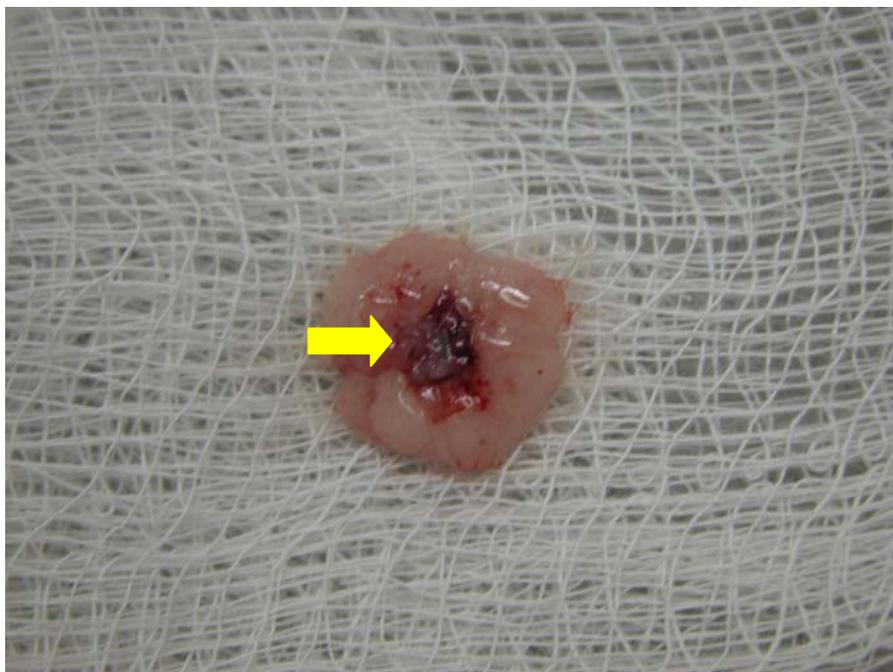


Figura 14. Ovário.

4.1.5) Dosagem de estrogênio

Após a castração, foi feita uma coleta de sangue para análise quantitativa de estrogênio sérico através de radioimunoensaio enzimático tipo competição (Kit / In Vitro DSL) (Anexo 2).

Esta dosagem foi realizada no Laboratório de Dosagem Hormonal, Departamento de Reprodução Animal – Faculdade de Medicina Veterinária / USP.

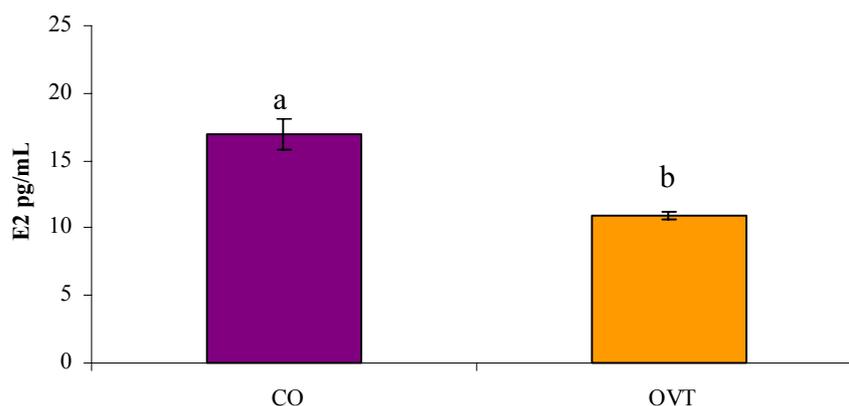


Figura 15. Dosagem quantitativa de estrogênio sérico ($p < 0,05$).

4.1.6) Frutooligossacarídeos (FOS)

A mistura de FOS utilizada (RAFTILOSE P95) foi gentilmente cedida pela empresa ORAFIT (Active Food Ingredients) sendo esta obtida através de hidrólise enzimática parcial da inulina retirada da raiz da chicória utilizando água quente (Figura 4).

Essa mistura, segundo o fabricante, é composta por 95% de oligofrutose com grau de polimerização de 2 a 7 e, os 5% restante constituído por glicose, frutose e sacarose.

Deste 1g de FOS administrado, somente 5% apresenta valor calórico, o que representou aproximadamente 0,3% do valor calórico total da dieta consumida diariamente pelos animais.

4.1.6.1) Administração de FOS

A administração do FOS foi realizada diariamente durante os 20 dias finais do experimento através de gavagem e a dosagem foi de 1g da mistura/dia, ou seja, cerca de 5% da ingestão diária de ração (Ohta et al, 1998).

4.1.7) Hormônio

O hormônio utilizado foi o β -estradiol sintético (SIGMA), sendo o mesmo administrado por injeção subcutânea diária na dose de 30 μ g/Kg/dia (Liu et al, 2004).

4.1.8) Dieta

A dieta oferecida para todos os animais durante o experimento foi uma ração comercial LABINA-PURINA (Agribands do Brasil LTDA).

4.1.8.1) Composição centesimal da dieta

A composição centesimal da dieta foi realizada de acordo com as seguintes metodologias citadas abaixo e os resultados confirmaram as especificações do fabricante (Tabela 5).

- Proteína: método de Kjeldahl (AOAC, 1975)
- Lipídeos totais: Bligh & Dyer (1959)
- Cinzas e Umidade: Adolfo Lutz (1985)
- Carboidratos: por diferença
- Cálcio: Adolfo Lutz (1976)

Tabela 5. Composição centesimal da ração comercial.

Composição Centesimal da Ração Comercial (%)					
Proteína	Lipídeo	Carboidrato	Umidade	Cinzas	Cálcio
25,00	5,20	61,53	1,33	5,19	0,009

4.1.9) Esquema de administração da dieta

Durante a fase experimental (20 dias finais), a ração era retirada no período da manhã e recolocada no final da tarde após a gavagem. Dessa forma, os animais foram condicionados a se alimentarem logo após a administração do FOS.

4.2) Determinação de cálcio

4.2.1) Fecal

A coleta das fezes foi realizada no 8º e 18º dia nos 20 dias finais de experimento durante três dias cada período, sendo os animais colocados em gaiolas metabólicas individuais (Chonan, Matsumoto e Watanuki, 1995; Chonan e Watanuki, 1995; Chonan e Watanuki, 1996).

As fezes foram calcinadas em mufla à 550°C por 6h e suas cinzas diluídas em ácido clorídrico 50% e ácido nítrico. Posteriormente, o cálcio fecal foi determinado por precipitação com oxalato e titulado com permanganato de potássio (Adolfo Lutz, 1976).



4.2.1.1) Absorção aparente

A absorção aparente de cálcio foi determinada pela seguinte equação (Chonan e Watanuki, 1995):

$$\text{Absorção aparente (mg/dia)} = \text{consumo diário de cálcio (mg/dia)} - \text{excreção fecal (mg/dia)}$$

4.2.2)Fêmur

O fêmur direito foi retirado após o sacrifício dos animais, limpo, congelado e, posteriormente, calcinado em mufla à 550°C por 6 h. Suas cinzas foram utilizadas para determinação do conteúdo de cálcio a partir do método citado anteriormente (Item 4.2.1). Antes de serem calcinados, os ossos foram mantidos em formaldeído 10 % por 48 horas (Carvalho e Cliquet, 2003).

4.2.3)Dieta

A determinação de cálcio na dieta foi realizada através do método citado anteriormente (Item 4.2.1).

4.2.4)Sérico

O sangue foi coletado por exsanguinação retro-ocular e punção cardíaca, centrifugado à 3000rpm/10 min para obtenção do soro e o cálcio determinado por kit disponível comercialmente (LABORLAB) (Item 4.2.2).

4.2.5)Lavagem do material utilizado nas análises

Todo o material utilizado nas análises de dosagem de cálcio foi previamente limpo com detergente não iônico e posteriormente enxaguado três vezes com água desionizada, como indicado no kit utilizado para dosagem de cálcio sérico (Anexo 3).

4.3) Determinação cinética da atividade da fosfatase alcalina sérica

A atividade da enzima fosfatase alcalina sérica total foi determinada através de um kit colorimétrico cinético disponível comercialmente (BIODIAGNÓSTICA) (Anexo 4).

A metodologia utiliza-se de um substrato de para-nitrofenil-fosfato e tampão aminometilpropanol (AMP) na determinação cinética da atividade da fosfatase alcalina. A reação ocorre entre o p-nitrofenil-fosfato, p-nitrofenol e fosfato e é mediada pela fosfatase alcalina. A velocidade de aumento na concentração de p-nitrofenol no meio de reação (medido a 450 nm no espectrofotômetro) é proporcional à atividade da fosfatase alcalina na amostra.



4.4) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A tíbia direita foi retirada após o sacrifício dos animais, limpa e congelada. Posteriormente, foi realizada fratura manual para retirada da epífise proximal, sendo esta analisada em microscopia eletrônica de varredura (Scanning Microscope JSM-5800LV/Jeol Serving Advanced Technology (Carvalho e Cliquet, 2003).

Para a realização de tal análise, os fêmures foram descalcificados através de uma solução com citrato de sódio a 20% e ácido fórmico a 50% (partes iguais de cada) e desidratados em

etanol. Posteriormente, foram montados em *stubs* e cobertos com ouro usando-se um *sputter* . (Carvalho e Cliquet, 2003; Reddy e Lakshmana, 2003).

4.5) Tratamento Estatístico

Os resultados foram submetidos à análise de variância ANOVA, sendo utilizado o teste de Tukey para o confronto das médias. O *software* utilizado STATISTICA 6.0[®] *for windows* (STATSOFT, 2000), considerando $p < 0,05$ como probabilidade mínima aceitável para diferença entre as médias.

5) RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1) Ensaio biológico

Durante a fase de depleção (30 dias após a castração), o consumo médio de ração(g)/dia das ratas ovariectomizadas (OVT) e controle (CO) foi significativamente diferente ($p < 0,05$), sendo maior no primeiro grupo (Figura 16). Esse maior consumo percebido no grupo OVT pode estar associado à deficiência hormonal bem como com o maior ganho de peso deste grupo (Figura 17).

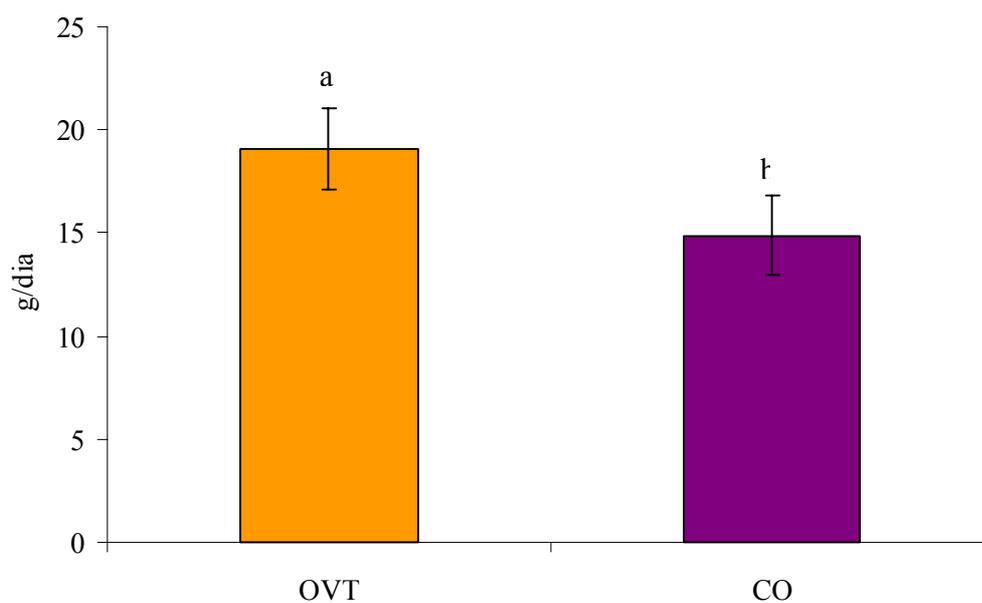


Figura 16. Consumo médio de ração (g)/dia durante a fase de depleção.

*Letras distintas representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

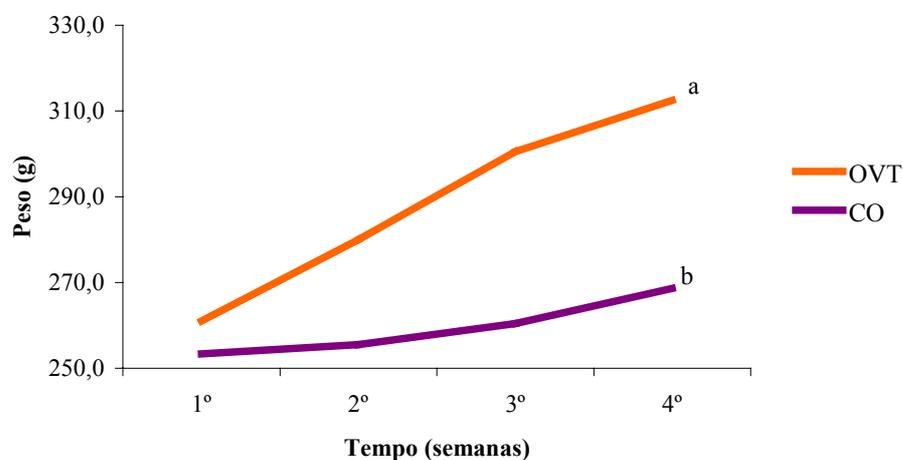


Figura 17. Ganho de peso (g)/semana durante a fase de depleção.

*Letras distintas representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

A menopausa está associada a mudanças adversas no peso, composição corpórea e distribuição de gordura no corpo da mulher. Esse aumento de peso se faz com o aumento de tecido adiposo e diminuição da massa magra (Kirchengast et al, 1999). Essas alterações podem estar relacionadas às alterações da função do eixo somatotrófico, como descrito por Bernardi et al (1998) que mulheres na pós-menopausa apresentam níveis séricos de hormônio de crescimento menores quando comparadas com mulheres na peri-menopausa.

Durante a fase experimental, como pode ser observado nas Figuras 18 e 19, o consumo de ração se manteve constante em todos os grupos (estatisticamente iguais) e o ganho de peso permaneceu diferente (estatisticamente diferentes).

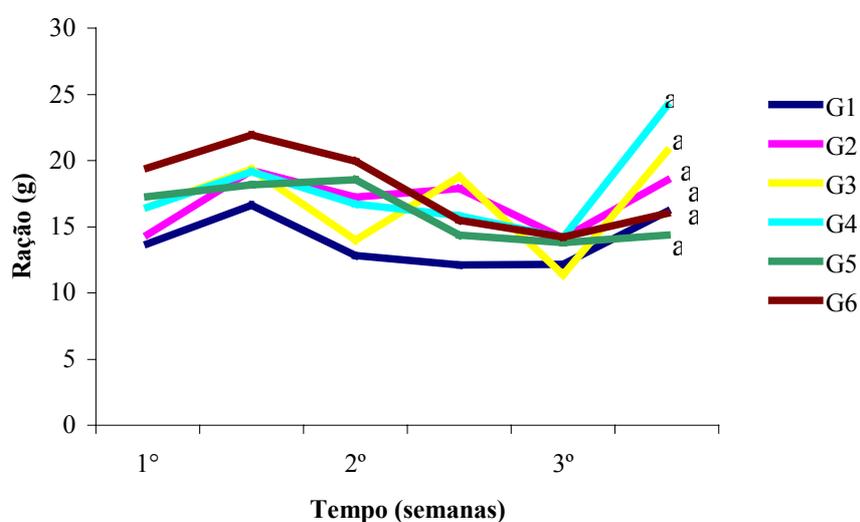


Figura 18. Consumo médio de ração (g)/dia durante a fase experimental.

*Letras idênticas indicam ausência de diferença estatística entre tratamentos ($p < 0,05$).

G1: Falsa castração + gavagem com FOS

G2: Falsa castração + gavagem com água

G3: Castração + gavagem (FOS) + hormônio

G4: Castração + gavagem (FOS) + sol. salina

G5: Castração + gavagem (água) + hormônio

G6: Castração + gavagem (água) + sol. Salina

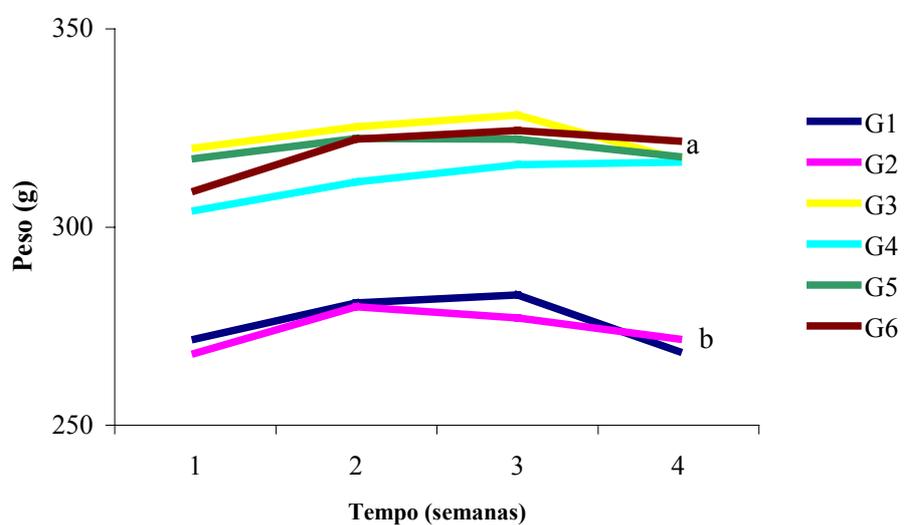


Figura 19. Ganho de peso durante a fase experimental.

*Letras distintas representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

G1: Falsa castração + gavagem com FOS

G2: Falsa castração + gavagem com água

G3: Castração + gavagem (FOS) + hormônio

G4: Castração + gavagem (FOS) + sol. salina

G5: Castração + gavagem (água) + hormônio

G6: Castração + gavagem (água) + sol. Salina

Como descrito anteriormente, a absorção intestinal de cálcio é o resultado de dois processos, transporte ativo transcelular, principalmente no duodeno e porção superior do jejuno, e difusão passiva paracelular, que ocorre por todo intestino delgado, principalmente no íleo e muito pouco no intestino grosso (5%) (Pansu et al, 1981; Pansu e Bronner, 1999).

Apesar da absorção passiva de cálcio no intestino grosso ser de apenas 5%, esta torna-se particularmente importante quando utilizamos carboidratos não digeríveis na dieta, já que estes são fermentados e produzem ácidos graxos de cadeia curta. Esses ácidos graxos diminuem o pH intestinal promovendo uma maior solubilidade do cálcio (Ca^{+2}), favorecendo assim o transporte passivo deste mineral (Griffin e Abrams, 2005).

Os resultados obtidos e apresentados na Figura 20 e 21 corroboram com a afirmação de Griffin e Abrams (2005), Younes et al (2001) e Mineo et al (2001), já que a administração diária de FOS por gavagem fez com que a quantidade de cálcio fecal fosse estatisticamente menor nos grupos G1, G3 e G4 quando comparados com os grupos G2, G5 e G6, que não receberam o FOS.

Na Figura 21, podemos observar que a absorção aparente de cálcio (Item 4.2.1.1) foi estatisticamente maior ($p < 0,05$) nos grupos G1, G3 e G4 quando comparados aos grupos G2, G5 e G6, sendo estes valores inversamente proporcionais à quantidade de cálcio fecal. Esse resultado reforça a ação benéfica do FOS na absorção de cálcio, enfatizando sua denominação como ingrediente funcional.

Devido a essa capacidade de favorecer a absorção de cálcio demonstrada na Figura 21, o consumo diário de oligossacarídeos não digeríveis na dieta deveria ser estimulado, principalmente por indivíduos suscetíveis à deficiência deste mineral devido às condições fisiológicas específicas, tais como: infância, adolescência, gestação, idosos e mulheres na pré e pós menopausa (Coxam, 2005).

Veereman-Wauters (2005), por exemplo, descreveu o uso de pré-bióticos incluindo frutooligossacarídeos em alimentos infantis.

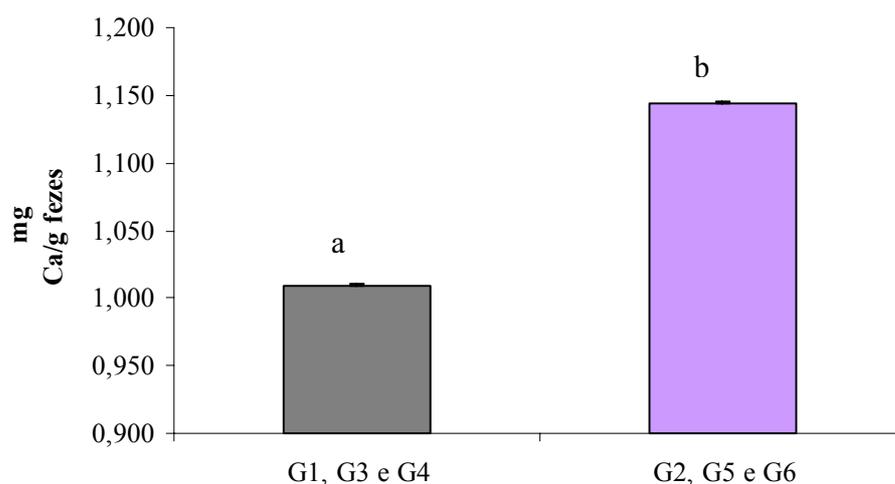


Figura 20. Determinação de cálcio fecal.

*Letras distintas representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

G1, G3 e G4 = Grupos que receberam gavagem com FOS

G2, G5 e G6 = Grupos que receberam gavagem com água

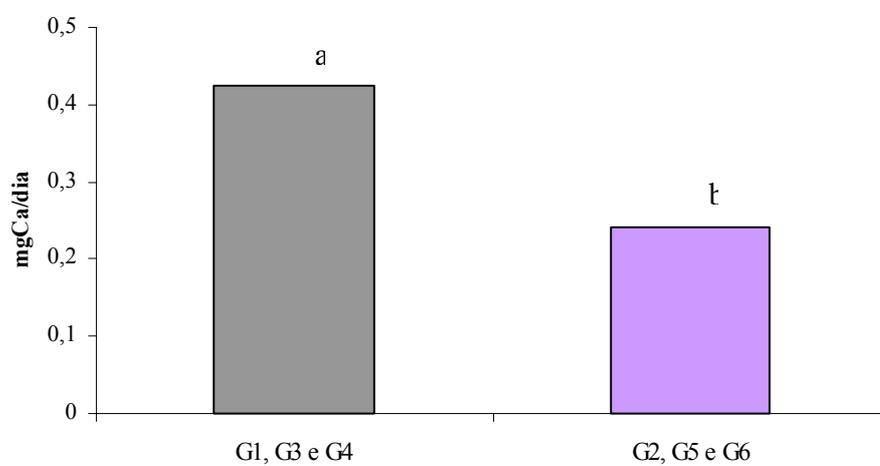


Figura 21. Absorção aparente (mg Ca/dia).

*Letras distintas representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

G1, G3 e G4 = Grupos que receberam gavagem com FOS

G2, G5 e G6 = Grupos que receberam gavagem com água

5.3) Cálcio sérico

Como descrito anteriormente, somente em circunstâncias extremas como desnutrição ou hiperparatireoidismo que a concentração de cálcio sérico ionizado sofre alterações ficando acima ou abaixo do normal (1,1 – 1,3mmol/L) (British Nutrition Foundation, 1989), sendo esta controlada através da absorção intestinal, excreção urinária, secreção endógena e remodelação óssea (Cashman, 2002).

Como mostrado na Figura 22, apesar das diferenças de estrogênio sérico bem como da administração de FOS nos diferentes grupos, interferindo respectivamente nas taxas de remodelação óssea e absorção intestinal de cálcio respectivamente, a concentração sérica deste mineral se manteve constante, confirmando os dados encontrados na literatura (British Nutrition Foundation, 1989).

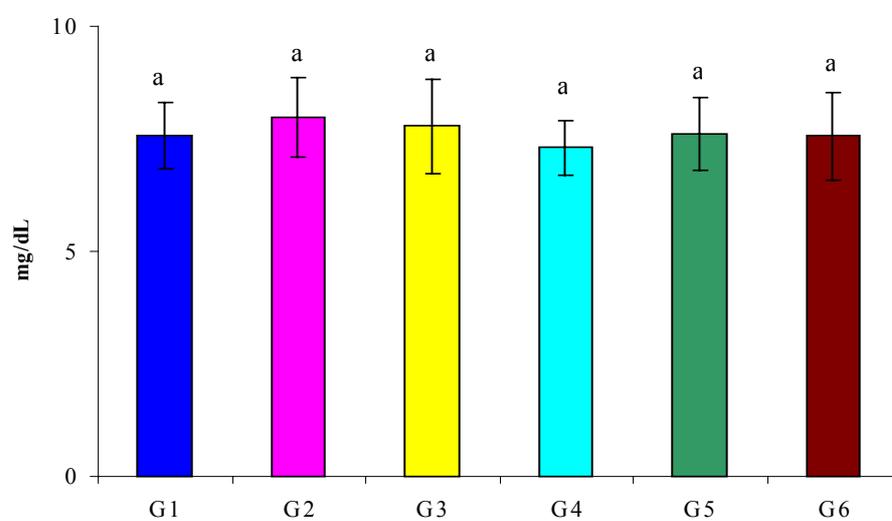


Figura 22. Determinação de cálcio sérico.

*Letras idênticas indicam ausência de diferença estatística entre tratamentos ($p < 0,05$).

G1: Falsa castração + gavagem com FOS

G2: Falsa castração + gavagem com água

G3: Castração + gavagem (FOS) + hormônio

G4: Castração + gavagem (FOS) + sol. salina

G5: Castração + gavagem (água) + hormônio

G6: Castração + gavagem (água) + sol. salina

5.4) Determinação cinética da atividade da fosfatase alcalina (FA) sérica

O processo de calcificação envolve três processos bioquímicos que ocorrem na interface líquido extracelular - cristal ósseo: deposição óssea, troca iônica e perda óssea. O processo de deposição óssea é controlado por três tipos de fatores: humorais, teciduais e celulares. Dentre os fatores humorais, destaca-se o produto da concentração de íons Ca^{+2} (mols/litro) pela concentração de íons PO_4H^{-2} (mols/litro), que deve ser mantido dentro dos limites normais ($0,72 \times 10^{-6}$ mol/L, com uma amplitude que oscila entre $0,47$ e $1,06 \times 10^{-6}$), uma vez que esta relação influencia na capacidade celular de deposição de cálcio na matriz óssea (Houssay, 2004).

Como as fosfatases são enzimas capazes de hidrolisar ésteres do ácido ortofosfórico, que consiste em clivar a ligação O-P com liberação de ácido fosfórico, essas têm como função fornecer íons fosfato aos sítios de calcificação (Houssay, 2004).

Essas enzimas existem em quase todos os líquidos e tecidos do organismo animal. Nos seres humanos, quatro fosfatases são codificadas por diferentes genes. Três dessas isoenzimas têm uma distribuição específica conforme o tecido e são chamadas de intestinal, placentária e germinal. A quarta isoenzima tem ampla distribuição, mas é especialmente abundante no fígado e esqueleto (90%) (Houssay, 2004).

Um aspecto relativo ao uso e interpretação dos valores de fosfatase alcalina é o fato de que eles não elevam exclusivamente com o aumento da formação óssea, mas também na osteomalácia ou outras condições em que o metabolismo ósseo esteja aumentado (Vieira, 2005). Reddy e Lakshmana (2003) demonstraram um aumento na atividade da fosfatase alcalina em

animais ovariectomizados enquanto Yoshikubo et al (2005) verificaram um aumento na atividade da fosfatase alcalina tanto na osteogenia como na regeneração de escamas de peixes-dourados tratados com 17β -estradiol, sendo que a regeneração respondeu mais sensivelmente ao hormônio, sendo o aumento de 1,75 vezes quando comparado ao grupo que também passou pelo processo de regeneração, porém, sem ter recebido tratamento com estrogênio.

Como pode ser observado na Figura 23, não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na atividade da fosfatase alcalina entre os grupos G1 e G6, sendo maior nestes do que nos demais grupos. Esse fato sugere um aumento no metabolismo ósseo em ambos os grupos, porém, no primeiro provavelmente ocorreu um aumento no processo de calcificação, enquanto no segundo um aumento no processo de perda óssea. Essa hipótese pode ser confirmada ao observarmos a determinação de cálcio (Item 6.5) bem como a análise qualitativa óssea através de microscopia eletrônica de varredura (Item 6.6).

Os grupos G3, G4 e G5 não apresentaram diferença estatística entre eles ($p < 0,05$), porém, quando comparados ao grupo G6, pode-se observar que houve uma substancial redução nos níveis de atividade enzimática, sugerindo que os tratamentos administrados de forma isolada ou em conjunto foram eficazes na redução da perda óssea causada pela castração. Além disso, os grupos G3, G4 e G5 foram estatisticamente iguais ao grupo G2, indicando uma normalização no processo de perda óssea.

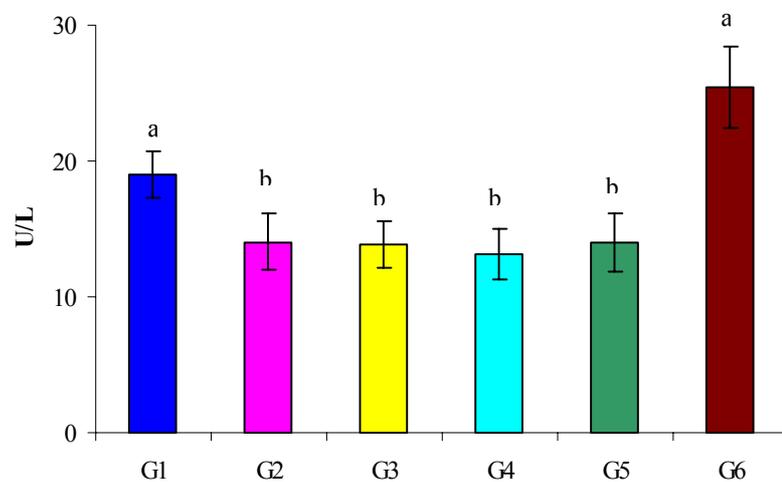


Figura 23. Determinação cinética da atividade da fosfatase alcalina sérica.

*Letras distintas representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

G1: Falsa castração + gavagem com FOS

G2: Falsa castração + gavagem com água

G3: Castração + gavagem (FOS) + hormônio

G4: Castração + gavagem (FOS) + sol. salina

G5: Castração + gavagem (água) + hormônio

G6: Castração + gavagem (água) + sol. salina

5.5) Cálcio ósseo (fêmur direito)

O sistema esquelético desempenha um papel imprescindível na homeostase de cálcio através da remodelação esquelética, participando do processo de manutenção da concentração sanguínea ionizada deste mineral. Essa remodelação se faz através de hormônios sistêmicos, bem como por algumas citocinas (Cashman, 2002).

De acordo com a Figura 24, os grupos controle G1 e G2 bem como os grupos ovariectomizados G3 (que recebeu os dois tipos de tratamento em conjunto) e G4 (que recebeu o FOS como tratamento isolado), não apresentaram diferenças estatísticas entre eles. Esse fato mostra que os tratamentos com FOS associado à TRH bem como a administração de FOS isoladamente foram eficazes no processo de mineralização óssea, tendo estes sobrepujado a castração.

Porém, o grupo G4 apresentou uma tendência a se igualar ao grupo G5 (grupo que recebeu como tratamento somente TRH), que teve uma menor quantidade de cálcio ósseo depositado, sugerindo que os tratamentos isolados sejam eficazes nos processos de manutenção do cálcio ósseo e conseqüentemente da saúde deste tecido, enquanto os dois tratamentos associados seriam mais eficazes na recuperação óssea propriamente dita. Este fato pode ser reafirmado através dos resultados obtidos na análise qualitativa óssea por microscopia eletrônica de varredura (Item 5.6).

Dessa forma pode-se sugerir o uso de FOS para mulheres na pré-menopausa ou mesmo indivíduos com idade em torno de 50 anos, a fim de se manter o equilíbrio entre o processo de deposição e reabsorção de cálcio ósseo por um período maior de tempo, atrasando ou reduzindo as chances de se instalar o processo de osteoporose.

O grupo G2 também foi estatisticamente igual ao grupo G5 (recebeu como tratamento TRH isoladamente), sugerindo que este também teve uma tendência a diminuir a deposição de cálcio ósseo quando comparado ao grupo controle que recebeu o FOS.

Quanto ao grupo G6, este foi estatisticamente igual somente ao grupo G5, enfatizando que a TRH isoladamente não foi tão eficaz na deposição de cálcio ósseo quando comparada aos demais tratamentos.

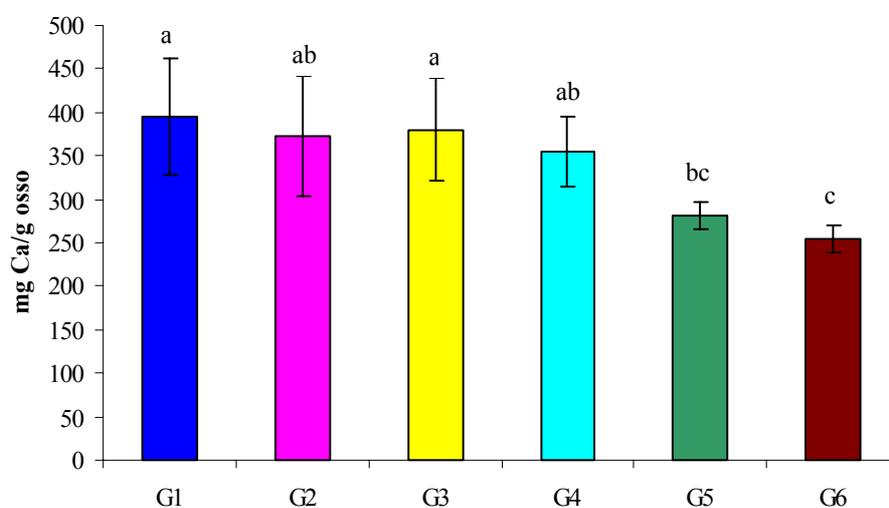


Figura 24. Determinação de cálcio ósseo no fêmur direito.

*Letras distintas representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

G1: Falsa castração + gavagem com FOS

G2: Falsa castração + gavagem com água

G3: Castração + gavagem (FOS) + hormônio

G4: Castração + gavagem (FOS) + sol. salina

G5: Castração + gavagem (água) + hormônio

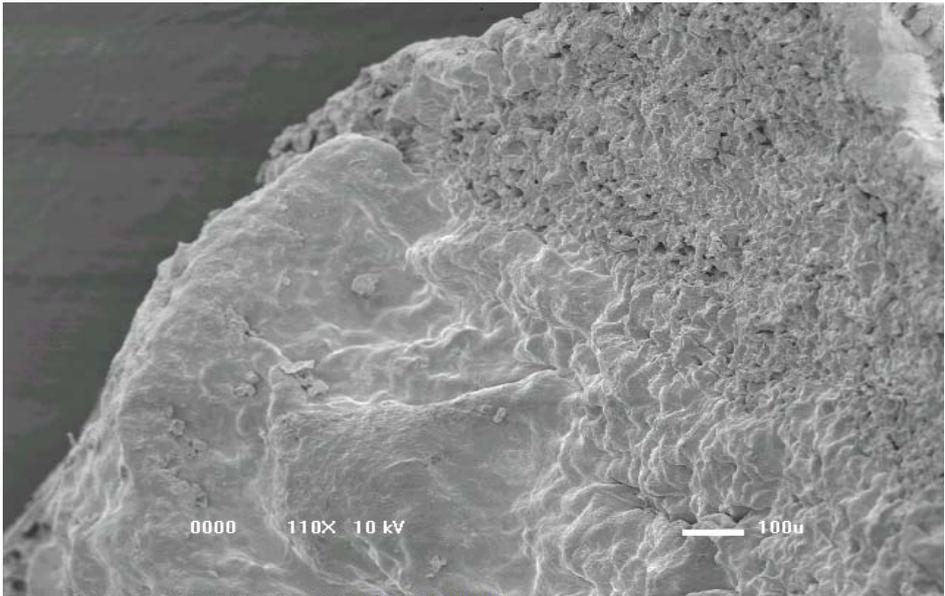
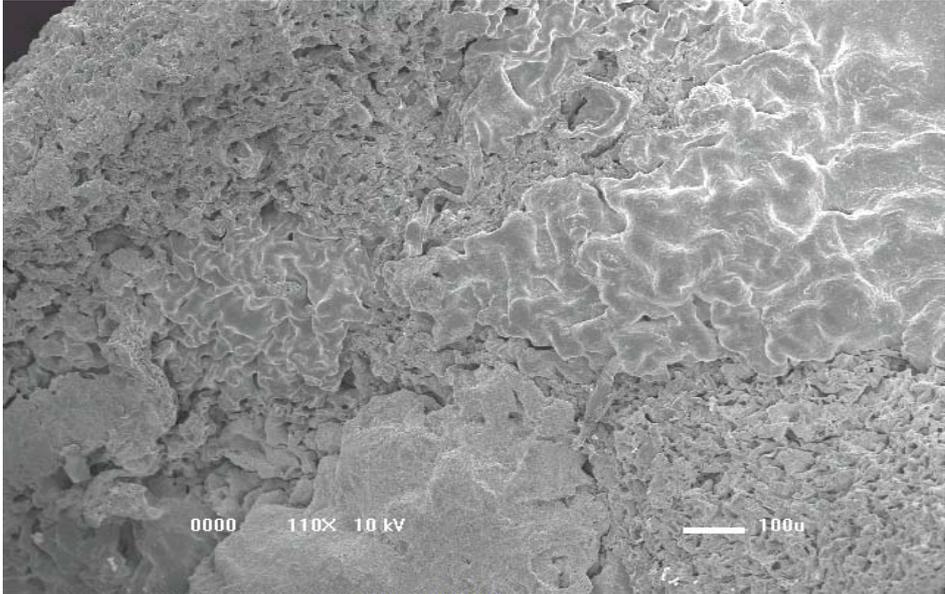
G6: Castração + gavagem (água) + sol. salina

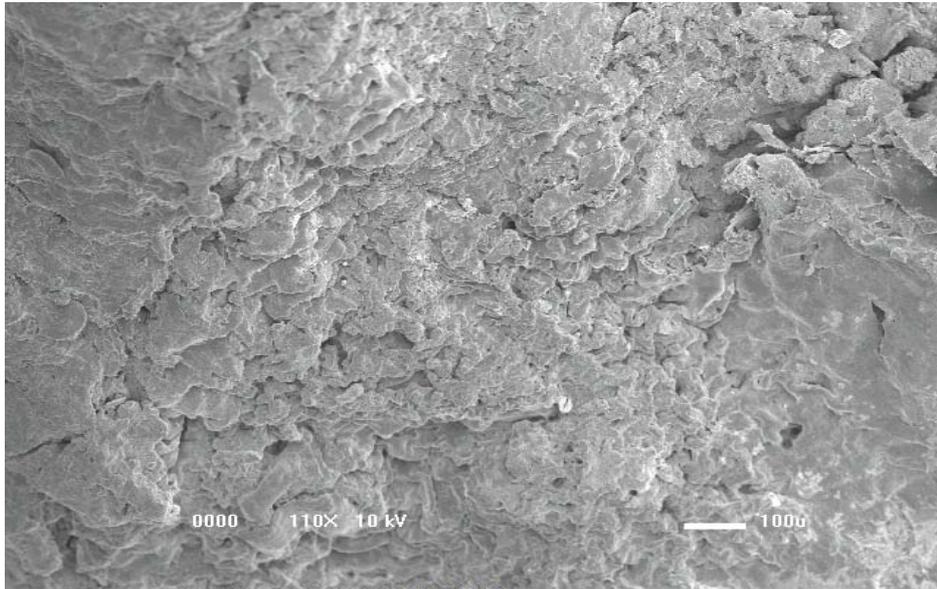
5.6)Análise óssea por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise qualitativa da epífise proximal da tíbia direita das ratas através de MEV demonstra claramente o efeito danoso que a privação de estrogênio causa na estrutura óssea (Reddy e Lakshmana, 2003). Esse fato pode ser observado ao compararmos os grupos G1(Figura 25a) e G2 (Figura 25b) (controle) com o grupo G6 (Figura 25f) (ovarectomizado sem tratamento). Nota-se que o ovarectomizado apresenta várias fossas de reabsorção visivelmente profundas e conseqüentemente um osso fragilizado, enquanto os grupos controle apresentam uma superfície íntegra.

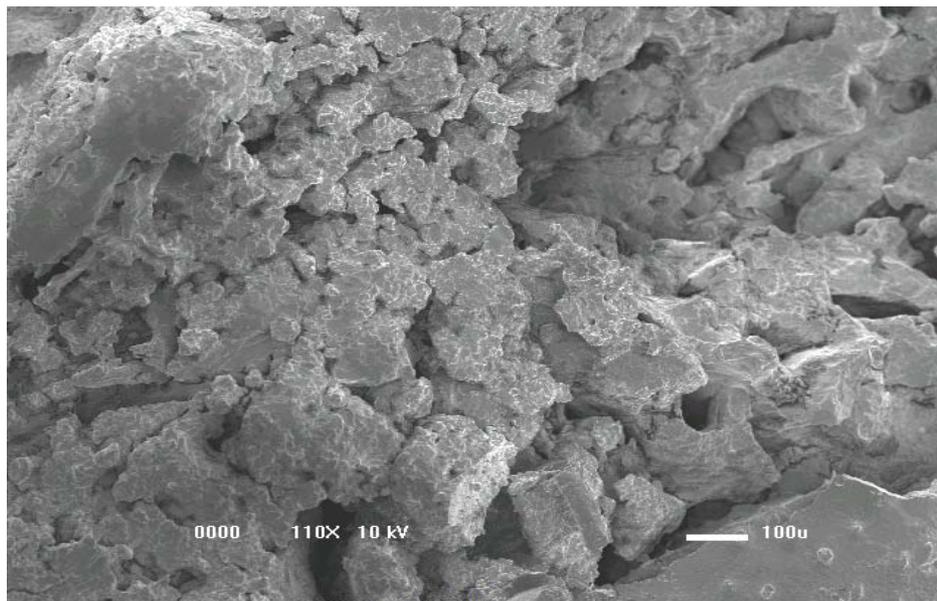
Quanto aos tratamentos propostos neste estudo, com a finalidade de recuperar a estrutura óssea danificada, podemos observar que a administração de frutooligossacarídeos (G4) (Figura 25d) ou da terapia de reposição hormonal (G5) (Figura 25e) isoladamente recuperou de forma parcial a estrutura óssea desses animais, porém, não o suficiente para uma reestruturação completa, como observado no grupo G3 (Figura 25c). Esse grupo recebeu os dois tratamentos de forma conjunta e apresentou uma qualidade óssea substancialmente melhor que os demais ovarectomizados, apresentando uma superfície íntegra, contínua e sem fossas de reabsorção, muito semelhante aos grupos controle (G1 e G2).

Esse resultado sugere que para se obter uma recuperação total da qualidade óssea em animais ovarectomizados, deve-se utilizar o tratamento com frutooligossacarídeos associado à terapia de reposição hormonal, já que a associação desses tratamentos foi melhor do que os mesmos administrados isoladamente, como observado também na determinação de cálcio ósseo.





c



d

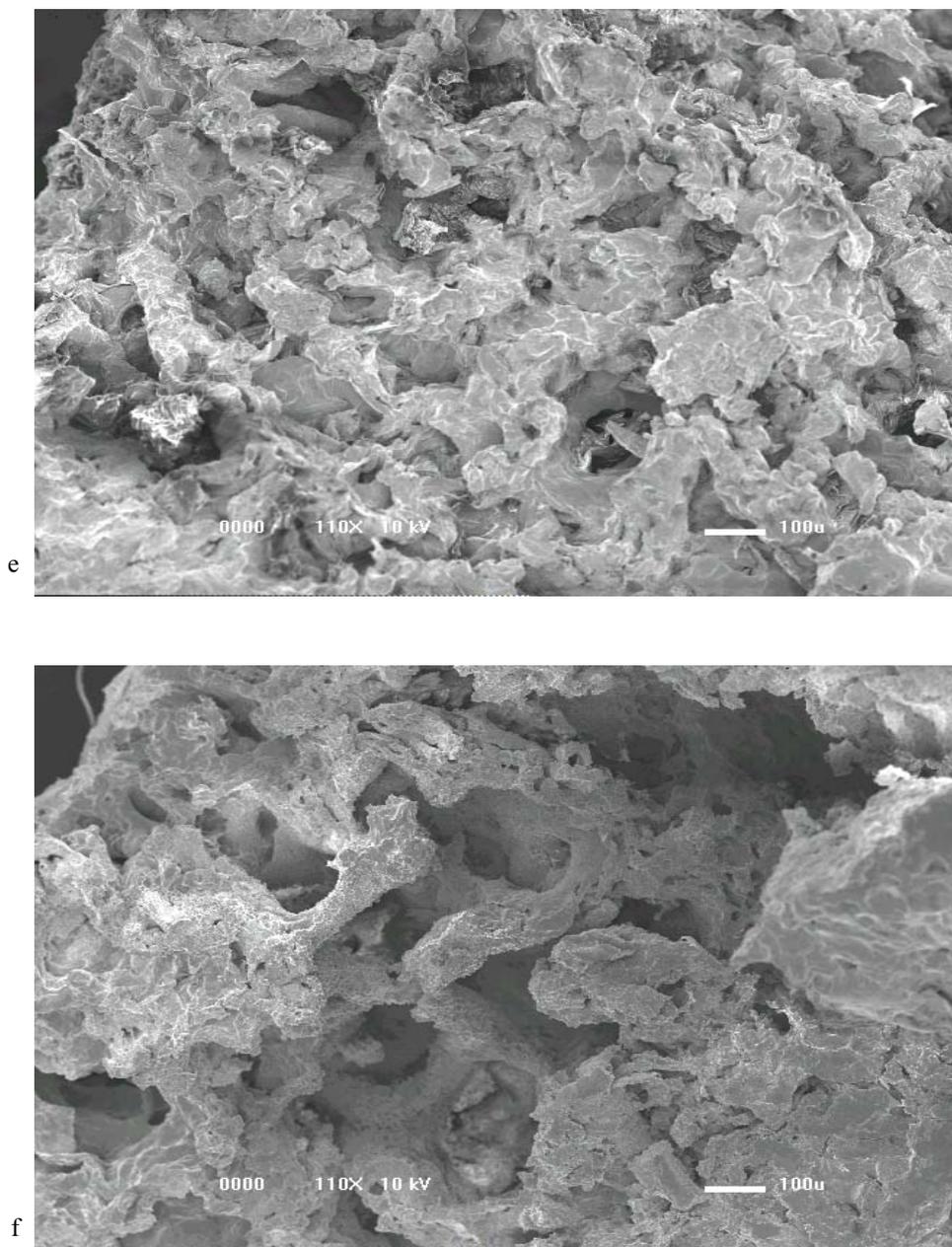


Figura 25. Análise qualitativa da epífise proximal da tíbia direita de ratas castradas ou não através de microscopia eletrônica de varredura. (a)G1: Falsa castração + gavagem com FOS; (b)G2: Falsa castração + gavagem com água; (c)G3: OVT + gavagem com FOS + injeção de hormônio; (d)G4: OVT + gavagem com FOS + injeção de solução salina; (e)G5: OVT+ gavagem com água + injeção de hormônio; (f)G6: OVT + gavagem com água + injeção de solução salina.

6) CONCLUSÕES

- A administração diária de FOS aumentou a absorção aparente de cálcio intestinal, favorecendo a deposição óssea deste mineral.
- O cálcio sérico se manteve em concentrações constantes, apesar dos diferentes tipos de tratamento.
- A atividade da fosfatase alcalina sérica foi maior nos grupos G1 e G6, sugerindo um aumento no metabolismo ósseo em ambos os grupos. O primeiro devido ao aumento no processo de formação óssea induzido pelo FOS e o segundo devido ao aumento no processo de perda óssea induzido pela ovariectomia (OVT sem tratamento). Os grupos G3, G4 e G5 não apresentaram diferença estatística entre eles, porém, quando comparados ao grupo G6, podemos observar que houve uma satisfatória redução nos níveis de atividade enzimática, sugerindo que os tratamentos administrados de forma isolada ou em conjunto foram eficazes na redução da resorção óssea. Além disso, esses grupos foram estatisticamente iguais ao grupo G2, indicando uma normalização no processo de remodelação óssea.
- A concentração de cálcio no fêmur direito dos animais mostrou que a associação do FOS e da TRH sobrepujou a castração bem como os tratamentos administrados isoladamente e, o efeito do tratamento com FOS de forma isolada foi superior a TRH.
- Através da análise qualitativa da epífise proximal da tíbia direita das ratas também podemos observar que a administração de FOS associada à TRH foi mais eficaz na recuperação da estrutura óssea dos ratos OVT do que esses mesmos tratamentos administrados de forma isolada, como a concentração de cálcio ósseo.

7)REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 2ed. São Paulo. v.1, 1976.

ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3ed. São Paulo. v.1, 1985.

AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 12 ed. Washington: AOAC International, v.2, p.15, 1975.

BELLATON C.; ROCHE, C.; RÉMY, C.; PANSU, D. Absorption du calcium. Données physiologiques récentes. Conséquences diététiques. **Gastroenterology of Clinical Biology**, v.16, p.239-247, 1992.

BERNARDI, F.; PETRAGLIA, F.; SEPALLA, M.; SPINETTI, A.; BERTOLINI, S.; FERDEGHINI, M.; GENAZZANI, A. R. Somatotropic axis and body weight in pre-menopausal and post-menopausal women: evidence for a neuroendocrine derangement, in absence of changes of insulin-like growth factor binding protein concentrations. **Human Reproductions**, v.13, n.2, p.279-284, 1998.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. Journal of Biochemistry and Physiology**., 37: 911-917, 1959.

BOONEN, S.; BODY, J.J.; BOUTSEN, Y. DEVOGELAER, J.P.; GOEMAERE, S. KAUFMAN, M.; ROZENBERG, S. REGINSTER, J.Y. Evidence-based guidelines for the treatment of

postmenopausal osteoporosis: a consensus document of the Belgian Bone Club. **Osteoporosis International**, v.16, p.239-254, 2005.

BRITISH NUTRITION FOUNDATION. Calcium. London: **British Nutrition Foundation**, 1989.

BROADUS, A.E. Physiological functions of calcium, magnesium and phosphorus and mineral ion balance. In: **Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism**. 2nd ed. New York: Raven Press, p. 41-46, 1993.

BRONNER, F. Current concepts of calcium absorption: an overview. **Journal of Nutrition**, v.122, p. 641-643, 1992.

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

CARSTENS, J.H. Future horizons for calcitonin: a US perspective. **Calcif Tissue International**, v.49, (Suppl 2) p.S2-S6, 1991.

CARVALHO, D. C. L.; CLIQUET Jr, A. Ação do ultra-som de baixa intensidade sobre ossos de ratas osteopênicas. **ACTA de Ortopedia Brasileira**, v.11, n.1, p.17-24, 2003.

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

CHAPUY, M.C.; ARLOT, M.E.; DUBOEU, F.; BRUN, J.; CROUZET, B.; ARNAUD, S.; DELMAS, P.D.; MEUNIER, P.J. Vitamin D₃ and calcium to prevent hip fractures in the elderly women. **New England Journal of Medicine**, v.327, p.1637-1642, 1992.

CHAPUY, M.C.; ARLOT, M.E.; DELMAS, P.D.; MEUNIER, P.J. Effect of calcium and cholecalciferol treatment for three years on hip fractures in elderly women. **British Medical Journal**, v.308, p.1081-1082, 1994.

CHAPUY, M.C.; PAMPHILE, R.; PARIS, E.; KEMPF, C.; SCHLICHTING, M.; ARNAUD, S.; GARNERO, P.; MEUNIER, P.J. Combined calcium and vitamin D₃ supplementation in elderly women: confirmation of reversal of secondary hyperparathyroidism and hip fracture risk: Decalyos II study. **Osteoporosis International**, v.13, p.257-264, 2002.

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

CHONAN, O.; WATANUKI, M. Effect of galacto-oligosaccharides on calcium absorption in rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.41, p.95-104, 1995.

CHONAN, O.; WATANUKI, M. The effect of 6'-galacto-oligosaccharides on bone mineralization of rats adapted to different levels of dietary calcium. **International Journal of Vitamin and Nutritional Research**, v.66, p.244-249, 1996.

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, p.111-123, 2005.

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

EARLY BREAST CANCER Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomized trials. **Lancet**, v. 351, p.1451-1467, 1998.

ENSRUD, K.E. Hip and Calcaneal bone loss increase with advancing age: longitudinal results from the study of osteoporotic fractures. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 11, p.1778-1787, 1995.

ETTINGER, B.; BLACK, D.M.; MITLAK, B.H.; KNICKERBOCKER, R.K.; NICKELSEN, T.; GENANT, H.K. Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Investigators. **JAMA**, v. 282, p. 637-645, 1999.

FOOD AND NUTRITION BOARD. Dietary Reference Intakes: Recommended levels for individual intake. Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, **Food and Nutrition Board**, Institute of Medicine. Washington, DC: National Academy of Sciences, 1998.

FRANCO, Guilherme. **Tabela de Composição Química de Alimentos**. 9 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 307p, 1999.

FRITH, J.C.; MÖNKKÖNEN, J.; BLACKBURN, G.M.; RUSSEL, R.G.G; ROGERS, M.J. Clodronate and liposome –encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5' triphosphate, by mammalian cells invitro. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.12, p.1358-1367, 1997.

GIBSON, G.R; BEATTY, E.R.; WANG, X.; CUMMINGS, J.H. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. **Gastroenterology**, v.108, (4), p.975-982, 1995.

GONZALEZ, P. J. C.; CHEVALIER, R.A.; MORGAN, E.J.; PORTNOY, M.E. The staining of vaginal smears by the Papamiltiades-Shorr method. Its hormonal and cancerous cytodagnostic use. **La Semana Medica**, 14 (117): 173-176, 1960.

GUÉGUEN, L. Dietary calcium intake in France: contribution of milk and cheese. **Proc. of the 1st World Congress on Calcium and Vitamin D in Human Life**. Rome, 1996.

GUÉGUEN, L.; POINTILLART, D.V.M. The bioavailability of dietary calcium. **Journal of the American College of Nutrition**, v.19, n.2, p.119S-136S, 2000.

HEILBERG, I. P. Homeostasia mineral. Em:Osteoporose: **Diagnóstico e Tratamento**. São Paulo: Sarvier, pp.30-38, 2000.

HOUSSAY, A.B. Metabolismo de cálcio e do fósforo. Em: **Fisiologia Humana de Houssay**. 7 ed. Porto Alegre: Artmed, p.595-614, 2004.

INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary Reference Intakes: Calcium, Magnesium, Phosphorus, Vitamin D and Fluoride. Washington, DC: **Food and Nutrition Board**, National Academy Press, 1997.

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.

KIRCHENGAST, S.; GRUBER, D.; SATOR, M.; HUBER, J. Postmenopausal weight status, body composition and body fat distribution in relation to parameters of menstrual and reproductive history. **Maturitas**, v.33, p.117-126, Jun. 1999.

KOBAYASHI, Y. I.; KIM, K.J.; ITOH, T. Gene expression of bone-resorbing cytokines in rat osteolysis model. **Journal of Orthopaedic Science**, 10 (1): 62-69, 2005.

KRUGER, M.; BROWN, K.; COLLET, G.; LAYTON, L.; CHOLLUM, L. 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.

LANZILLOTTI, H.S.; LANZILLOTTI, R.S.; TROTTE, A.P.R.; DIAS, A.S.; BORNAND, B. COSTA, E.A.M.M. Osteoporose em mulheres na pós-menopausa, cálcio dietético e outros fatores de risco. **Revista de Nutrição**, 16 (2): 181-193, 2003.

LINDER, M. C. Nutrition and Metabolism of the Major Minerals. In: Nutrition Biochemistry and Metabolism. **Califórnia: Prentice-Hall International Inc.**, cap. 6, p.191-213, 1991.

LIU, M.L.; XU, X.; RANG, W.Q.; LI, Y.J.; SONG, H.P. Influence of ovariectomy and 17 β -estradiol treatment on insulin sensitivity, lipid metabolism and post-ischemic cardiac function. **International Journal of Cardiology**, v.97, p.485-493, 2004.

MAHAN, L.K.; ESCOTT – STUMP, S. Nutrição na saúde óssea. Em: **Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 9 ed. São Paulo: Roca, p.583-596, 1998.

MÁRQUEZ, L.R. **A fibra terapêutica**. São Paulo: Americana de Publicações, 132p., 1999.

MINEO, H.; HARA, H.; TOMITA, F. Short-chain fatty acids enhance diffusional Ca transport in the epithelium of the rat cecum and colon. **Life Science**, v.22, n.69(5), p.517-526, 2001.

NAKANO, H. Recente Japanese development in the enzymatic production and application of oligosaccharides; **apresentado no Seminário on Enzyme and bacterial technology**, 1998, Campinas. Japan International Cooperation Agency (s.d).

NHI - NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. Consensus Conference Development panel on optimal calcium intake. Optimal Calcium Intake. **JAMA**, v.272, p.1942-1948, 1994.

OHTA, A.; MOTOHASHI, Y.; OHTSUKI, M.; HIRAYAMA, M.; ADACHI, T.; SAKUMA, K. Dietary fructooligosaccharides change the concentration of calbindin-D9k – Differently in the mucosa of the small and large intestine of rats. **The Journal of Nutrition**, v.128, n.6, p.934-939, 1998.

PANSU, D.; BELLATON, C.; BRONNER, F. Effect of lactose on duodenal calcium-binding protein and calcium absorption. **Journal of Nutrition**, v. 109, p.508-512, 1979.

PANSU, D.; BRONNER, F. Nutritional aspects of calcium absorption. **Journal of Nutrition**, v.129, p. 9-12, 1999.

PANSU, D.; BELLATON, C.; BRONNER, F. The effect of calcium intake on the saturable and non-saturable components of duodenal calcium transport. **American Journal of Physiology**, v.240, p.G32-37, 1981.

PLOSKER, G.L.; MC TAVIS, D. Intranasal salcaltonin: a review of its pharmacological properties and role in the management of postmenopausal osteoporosis. **Drugs Aging**, v.8, p.378-400, 1996.

RANZI, S.; VINAY, K.; TUCKER, C. **Patologia Estrutural e Funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6ed., pp.1087-1114, 2000.

REDDY, N.P.; LAKSHMANA, M. Prevention of bone loss in calcium deficient ovariectomized rats by OST-6, a herbal preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.84, p.259-264, 2003.

REGINSTER, J.Y. Effect of calcitonin on bone mass and fracture rates. **American Journal of Medicine**, v.91, Suppl 5B, p.19S-22S, 1991.

REID, I.R. Osteoporosis: non-HRT treatments. **Reviews in Gynaecological Practice**, v.2, p.48-53, 2002.

RIGGS, L. Differential Changes in Bone Mineral Density of the Appendicular and the axial Skeleton with aging: Relationship to Spinal Osteoporosis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 67, p.328-335, 1981.

RIGGS, B.L.; HARTMANN, L.C. Selective estrogen-receptor modulators – Mechanisms of action and application to clinical practice. **New England Journal of Medicine**, v. 348, p.618-629, 2003.

RIGGS, B.L.; MELTON, L.J. The worldwide problem of osteoporosis: insights afforded by epidemiology. **Bone**, v. 17 (Suppl. 5), p. 505S-511S, 1995.

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, May. 1993.

ROSEN, C.J.; BILEZIKIAN, J.P. Anabolic therapy for osteoporosis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.86, p.957-964, 2001.

RYAN, W.G.; WOLTER, J.; BAGDADE, J.D. Apparent beneficial effect of tamoxifen on bone mineral content in patients with breast cancer: preliminary study. **Osteoporosis International**, v.2, p.39-41, 1991.

SCHOLZ-AHRENS, K.E.; SCHREZENMEIR J. Inulin, oligofructose and mineral metabolism - experimental data and mechanism. **British Journal of Nutrition**, v.87, Supl. 2, p.179-186, 2002.

SILVERMAN, S. Calcitonin. **Rheum. Dis. Clin. North American**, v.27, p.187-196, 2001.

SITE: <http://nautilus.fis.uc.pt/st2.5/bitmaps/resumo-p/r020.jpg> Acesso em: 15/04/2005.

SITE: <http://geocities.yahoo.com.br/anutricao>. Acesso em: 10/12/2003.

STATSOFT, Inc. **STATISTICA for Windows** [Computer program manual]. Tulsa, USA, WEB: <http://www.statsoft.com>. 2000.

TAGUCHI, A.; OHTA, A.; ABE M, B. S.; OHTSUKI, M.; TAKIZAWA, T.; YUDA, Y.; ADACHI, T. Effects of fructooligosaccharides on bone and mineral absorption in the rat model with ovariectomised osteoporosis. **Meiji Seika Kenkyu Nenpo**, v.33, p.37-43, 1995.

TAKAHASHI, S.; GOLDRING, S.; KATZ, M. Downregulation of calcitonin receptor mRNA expression by calcitonin during human osteoclast-like cell differentiation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, p.167-171, 1995.

TEITELBAUM, S.L. Postmenopausal osteoporosis, T cells and immune dysfunction.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.101 (48): 16711-16712, 2004.

TORGERSON, D.J.; BELL-SYER, S.E. Hormone replacement therapy and prevention of nonvertebral fractures: a meta-analysis of randomized trials. **JAMA**, v.13, p.285:289, 2001.

VEEREMAN-WAUTERS, G. Application of prebiotics in infant foods. *British Journal of Nutrition*. **British Journal of Nutrition**, v.93, Suppl. 1, p.57-60, 2005.

VIEIRA, J.G.H. Exames e Métodos Laboratoriais Relacionados com o Metabolismo Ósseo. In: **Manual de Doenças Ósteo-Metabólicas**. Fleury Laboratórios, cap. 1, 2005.

VORAGEN, A. G. J. Technological aspects of functional food-related carbohydrates. **Trends in Food Science & Technology**, v.9, p.328-335, 1998.

WEAVER, C.M.; HEANEY, R.P. Calcium. In: **Modern Nutrition in Health and Disease**. Baltimore: Williams and Wilkins, pp. 141-156, 1999.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Assessment of fracture risk and its application to Screening for postmenopausal osteoporosis. **Technical Report Series 843**. Geneva: World Health Organization, 1994.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Interim report and recommendations of the World Health Organization Task-Force for Osteoporosis. *Osteoporosis International*, v.10, p.259-264, 1999.

WOOD, R.J. Searching for the determinants of intestinal calcium absorption. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.72 (3), p.675-676, 2000.

WRITING GROUP FOR THE WOMEN'S HEALTH INITIATIVE INVESTIGATORS. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. **JAMA**, v.288, p.321-333, 2002.

YOSHIKUBO, H.; NOBUO, S.; TAKEMURA, K.; HOSO, M.; YASHIMA, S.; IWAMURO, S.; TAKAGI, Y. TABATA, M. HATTORI, A. Osteoblastic activity and estrogenic response in the regenerating scale of goldfish, a good model of osteogenesis. **Life Sciences**, v.76, p.2699-2709, 2005.

YOUNES, H.; COUDRAY, C.; BELLANGER, J.; DEMIGNÉ, C.; RAYSSIGUIER, Y.; RÉMÉSY, C. Effects of two fermentable carbohydrates (inulin and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats. **British Journal of Nutrition**, v.86 (4) p.479-485, 2001.

ZIMOLO, Z.; WESOŁOWSKI, G.; RODAN, G.A. Acid extrusion is induced by osteoclast attachment to bone: Inhibition by alendronate and calcitonin. **Journal of Clinical Investigation**, v. 96, p.2277-2283, 1995.

8)ANEXOS

Anexo 1



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 547-1, sobre "AValiação da Absorção de Cálcio pela Administração Intragástrica de Galactooligossacarídeo em Ratas Castradas" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Celio Kenil Miyasaka/Claudia Cardoso Netto 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 na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 11 de Março de 2004.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 547-1, entitled "EVALUATION OF THE CALCIUM ADSORPTION FOR ADMINISTRATION INTRAGASTRICA OF GALACTOOLIGOSSARIDEO IN CASTRATED RATS", 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 March 11, 2004.

Campinas, 11 de Março de 2004.

Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP

Anexo 2

Anexo 3

CAT N.º 00800
Somente para
Uso in Vitro

CÁLCIO

MÉTODO COLORIMÉTRICO

**DEFINIÇÃO**

O teste é feito para determinar os níveis de cálcio, que é o responsável pela contração muscular, transmissão nervosa e coagulação sanguínea. O hormônio paratireoideano e a vitamina D aumentam a absorção de cálcio do tracto gastrointestinal e aumentam a liberação do cálcio para os ossos na existência de déficit.

FISIOPATOLOGIA

O cálcio quando é removido por desmineralização pode causar fragilidade óssea e fraturas.

SIGNIFICADO CLÍNICO

Valores elevados - Hiperparatireoidismo, alcalose, grande consumo de cálcio, hipervitaminose, hipertireoidismo, uremia, transplante renal, mieloma múltiplo, fraturas, cálculo renal, exercício em excesso, indivíduos acamados por períodos prolongados.

Valores baixos - Diarréia, abuso de laxante, infecções sérias, queimaduras, hipoparatiroidismo, alcoolismo, pancreatite, deficiência renal crônica, absorção deficiente de cálcio.

INTERFERÊNCIAS

Falsos valores elevados - Estrógenos, sais de cálcio, vitamina D, antiácidos, dieta rica em cálcio.

Falsos valores baixos - Cortisona, gentamicina, metilicina, uso excessivo de laxante, heparina, insulina, mitramicina, dieta pobre em cálcio, cloreto de sódio intravenoso.

MÉTODO

Colorimétrico de Ponto Final.

LINEARIDADE E ESTABILIDADE DA REAÇÃO

A reação é linear até 20 mg/dL. Para valores superiores utilizar 10 µL de amostra e multiplicar o resultado final por 2. A cor final da reação é estável por 3 horas.

COMPOSIÇÃO DO KIT

Reativo Padrão CAT N.º 00801

Solução estabilizada de Cálcio = 10 mg/dL

Volume = 4 mL

Reativo CFX CAT N.º 00802

Solução estabilizada de Cresoltaleína

Complexona = 3,7 mmol/L Volume = 3,5 mL

Reativo Tampão CAT N.º 00803

Solução de AMP = 0,2 mmol/L, pH=11

Volume = 250 mL

MATERIAL NÃO FORNECIDO (NECESSÁRIO)

Espectrofotômetro ou Colorímetro

Micropipetas e pipetas capazes de medir os volumes indicados na técnica.

Tubos de ensaio.

Relógio ou Cronômetro.

VIDA ÚTIL E ARMAZENAMENTO

O kit é estável até seu vencimento impresso na caixa, quando à temperatura ambiente.

PRECAUÇÕES

O kit não contém derivados de sangue humano, porém, considerar qualquer amostra de paciente como potencialmente infectante. Evitar o contato direto com as amostras.

Não pipetar reagentes ou amostras com a boca.

Descartar as sobras das reações de acordo com as Boas Práticas de Laboratório em local próprio para materiais potencialmente infectantes.

AMOSTRA

Soro ou urina, não usar plasma, pois os anticoagulantes complexam o cálcio dando resultados errôneos.

A determinação na urina requer uma dieta prévia de pelo menos 3 dias livre de cálcio (eliminar leite e seus derivados).

A amostra se mantém por uma semana refrigerada.

TÉCNICA

O material a ser utilizado, tubos de ensaio, ponteiros de micropipetas, pipetas, etc. devem estar rigorosamente limpos, livres de cálcio e de traços de anticoagulantes. Aconselhamos lavá-lo com detergente não iônico ou com solução diluída de ácido mineral, lavando após, várias vezes com água deionizada.

A técnica se caracteriza por Absorbâncias dos blanks muito baixas, leituras acima de 0,200 indicam contaminação grosseira por cálcio e os reativos devem ser desprezados.

Colocar em 2 tubos de ensaio, marcados P (padrão) e D (desconhecido):

	P	D
Reativo CFX	50 µL	50 µL
Reativo Tampão	3,5 mL	3,5 mL

Misturar, ler as Absorbâncias dos blanks internos BP e BD em Espectrofotômetro a 570 nm ou em Colorímetro com filtro vermelho (560-590 nm), zerando o aparelho com água deionizada. Logo após, agregar:

Padrão	20 µL	
Amostra		20 µL

Misturar, após 10 minutos repetir as leituras, P e D.

CÁLCULOS

Cálcio mg/dL = $D-BD \times f$

onde, $f = \frac{10 \text{ mg/dL}}{P-BP}$

Os volumes dos Reativos, Padrão e Amostra, podem ser aumentados ou diminuídos conforme o aparelho utilizado, por exemplo:

Reativo CFX	20 µL
Reativo Tampão	1,5 mL
Padrão/Amostra	10 µL

DOSAGEM NA URINA

Coletar a urina de 24 horas (sobre 20 mL de HCL a 50%).

Completar a 2 litros com água deionizada. Homogeneizar e realizar a técnica como no soro empregando 20 µL desta amostra.

CÁLCULOS

Cálcio Urinário mg/24 horas = $\frac{D-BD}{P-BP} \times 200 \text{ mg/24 horas}$

VALORES DE REFERÊNCIA

Soro = 8,5 a 10,5 mg/dL

Urina = 60 a 200 mg/24 horas

APRESENTAÇÃO

Kit suficiente para 70 a 125 reações

BIBLIOGRAFIA

1) Martinek, R.G. - J. Am. Med. Tech. 33:416 (1971).

2) Henry, R.J. - Clinical Chemistry, Principles and Techniques Harper & Row Publishers (1964).

Anexo 4

FOSFATASE ALCALINA - AMP**1. FINALIDADE**

Teste cinético para determinação da atividade da fosfatase alcalina (FAL) no soro, usando Amino-Metil-Propanol (AMP) como tampão.

2. INTRODUÇÃO

A existência de diversas metodologias para determinação da FAL contribuiu ao longo dos anos para dificultar a comparação de resultados. As metodologias tradicionais, como Bodansky, King & Armstrong ou Bessey-Lowry, colorimétricas, praticamente estão em desuso, com o advento de metodologias cinéticas, mais específicas e reprodutíveis. A metodologia Laborclin utiliza-se de um substrato de para-nitrofenil-fosfato e tampão aminometil-propanol (AMP) na determinação cinética da atividade da fosfatase alcalina.

3. IMPORTÂNCIA CLÍNICA

A fosfatase alcalina é encontrada nos osteoblastos, fígado, intestinos e placenta, sendo excretada pela bile. Atividades elevadas de fosfatase alcalina são observadas em diversas enfermidades, tais como: osteíte deformante, raquitismo, osteomalácia, metástase óssea, hiperparatireoidismo, sarcoma osteogênico e doença de Paget. Nas doenças hepatobiliares, a atividade da fosfatase alcalina é útil no diagnóstico da icterícia obstrutiva.

4. AMOSTRA**a- Preparo do paciente**

Apesar de não essencial, recomenda-se que o paciente seja instruído a manter um jejum de cerca de 8-12h antes da coleta.

b- Tipos de amostra

- **Soro:** deve ser a amostra de escolha, recém-coletado, isento de hemólise e separado do coágulo o mais rápido possível após a coleta.

- **Plasma:** evitar o uso de plasma coletado com citrato, EDTA ou oxalato, podendo usar plasma recém-coletado com heparina, isento de hemólise e separado o mais rápido possível após a coleta.

c- Armazenamento e estabilidade

A análise deve ser processada o mais rapidamente possível após a coleta, pois em temperatura ambiente a atividade da FAL na amostra aumenta cerca de 1% a cada 6h, e em geladeira (2-8 °C) o acréscimo fica em redor de 2% a cada 24h. Todas as amostras congeladas, devem ser descongeladas e mantidas em temperatura ambiente por 18-24 h antes de se realizar a análise, para que haja plena reativação da enzima. A prática de se congelar a amostra é desaconselhada devido ao aumento já descrito que se verifica no período de descongelamento.

d- Critérios de rejeição

As amostras hemolisadas, que apresentem sinais de contaminação microbiana ou que tenham sido descongeladas e imediatamente enviadas para análise devem ser rejeitadas.

e- Precauções e cuidados especiais

Todas as amostras devem ser manipuladas com extrema cautela, pois podem veicular diversas doenças infecto-contagiosas (hepatite, SIDA etc.). Seu descarte deve ser feito preferencialmente após sua autoclavação, devendo-se evitar sua eliminação diretamente no meio ambiente. Igual cuidado se recomenda no descarte dos outros materiais como ponteiros plásticos, seringas e agulhas.

5. INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE O PRODUTO**a- Registro no Ministério da Saúde: 100.970.10090.****b- Princípio de Técnica**

p-nitrofenil-fosfato + p-nitrofenol + fosfato (reação mediada pela fosfatase alcalina)

O tampão AMP atua como receptor de fosfato liberado, além de regular o pH do meio e acelerar a reação. A velocidade de aumento na da concentração de p-nitrofenol no meio de reação (medido a 405 nm) é proporcional à atividade da fosfatase alcalina na amostra.

c- Reagentes

- **Substrato fosfatase alcalina:** após reconstituído contém 16 mmol/L de p-nitrofenil-fosfato.

- **Reagente reconstituente:** composto por solução tamponada contendo estabilizante e preservativo, 0,35 mmol/L de AMP (aminometil-propanol), 2 mmol/L de EDTA, 1 mmol/L de sal de zinco, 2 mmol/L de sal de magnésio, com pH final 10,4 ± 0,05 (a 25 °C).

- **Preparo do reagente de trabalho:** Adicionar ao frasco contendo o substrato em pó a quantidade de reagente reconstituente que consta em rótulo, homogeneizando suavemente até sua completa dissolução.

d- Armazenamento e estabilidade

Os componentes do conjunto podem permanecer até 72h em temperatura ambiente para fins de transporte. No laboratório devem ser armazenados em geladeira (2-8 °C) onde se mantém estáveis até a data de vencimento expressa em rótulo, desde que isentos de contaminação química ou biológica. O reagente de trabalho após preparado se mantém estável por até 10 dias em geladeira (2-8 °C) desde que isento de contaminação química ou biológica. Não congelar.

e- Precauções e cuidados especiais

Os reagentes destinam-se ao uso diagnóstico *in vitro*, não devendo ser ingeridos ou entrar em contato com os olhos, pele e mucosas.

6. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS (porém não fornecidos)

- Espectrofotômetro, fotocolorímetro ou equipamento automatizado dotado de compartimento de leitura termostaticado;

- Pipetas graduadas de vidro;

- Micropipetadores;

- Cronômetro.

7. PROCEDIMENTO TÉCNICO (para equipamentos manuais e semi-automáticos)

- Deixar reagentes e amostras adquirirem temperatura ambiente;

- Selecionar a temperatura de 37 °C e ajustar o comprimento de onda a 405 nm (a cubeta deve ter 1 cm de passagem de luz);

Reagente de trabalho	1,0 mL
Incubar aproximadamente	3 minutos a 37 °C
Amostra	0,02 mL
Homogeneizar e acionar o cronômetro simultaneamente.	
Após exatamente 1 minuto ler a absorvância inicial.	
Ler as absorvâncias exatamente após 1, 2 e 3 minutos.	

8. CÁLCULOS

- Inicialmente calcular a variação ou delta de absorvância por minuto ($\Delta A/\text{min}$):

$$\Delta A = \frac{(A3\text{min} - A2\text{min}) + (A2\text{min} - A1\text{min}) + (A1\text{min} - A\text{inicial})}{3}$$

- Multiplicar o valor de $\Delta A/\text{min}$ pelo fator **2764** de forma a obter a atividade da fosfatase alcalina em U/L na amostra.

9. RESULTADOS

- **Unidade utilizada:** U/L

- Valores de referência

- **Adultos:** 24 - 118 U/L

- **Recém-natos:** até 295 U/L

- **1 - 12 anos:** até 413 U/L

- **Meninos 12-15 anos:** até 590 U/L

Meninas de 12-15 anos e meninos de 15-20 anos podem aproximar seus valores aos de adultos ou aos de crianças, dependendo portanto da atividade osteoblástica

(crescimento).

Para as meninas acima de 15 anos e meninos acima de 20 anos, os valores referenciais igualam-se aos verificados em adultos.

10. LIMITAÇÕES DO MÉTODO**-Limites de diluição**

O reativo de trabalho possui um limite para determinar a atividade da FAL, 770 U/L, limite este que, caso seja excedido, implica na necessidade da diluição da amostra em solução fisiológica (NaCl 0,85%) e conseqüente repetição da análise.

- Interferentes

Muitas interferências verificam-se principalmente por problemas na conservação ou manipulação das amostras. Para uma melhor apreciação de interferentes nesta reação, recomendamos a leitura dos textos de Tietz e Young.

11. CONTROLE DA QUALIDADE**- Materiais necessários**

Amostras de controle originárias de pool de soros preparados pelo próprio laboratório e/ou controles de origem comercial, mapas e gráficos de controle.

- Periodicidade

Ao iniciar o trabalho com um novo lote de reagentes recomenda-se avaliar os mesmos quanto a precisão e exatidão. Durante a execução da rotina, recomenda-se avaliar uma amostra de controle em paralelo a cada bateria de testes.

- Interpretação e avaliação

Como o objetivo do controle de qualidade é garantir que os resultados liberados sejam compatíveis com a realidade do paciente, o laboratório deve definir quais são os parâmetros de controle adotados bem como as medidas para possíveis ações corretivas.

12. ESTATÍSTICAS DO MÉTODO

- Precisão: Foi calculado um coeficiente de variação entre 1,4 - 1,2 % na análise de 2 pools de soros com valores compreendidos entre 77 U/L e 199 U/L.

- Exatidão: A análise de regressão linear entre 53 amostras ficou na faixa entre 48 e 793 U/L, comparando-se a metodologia Laborclin com outro método similar de boa procedência comercial, conforme a equação:

$$Y(LB) = 1,10 \times \text{mét. referência} + 5,0$$

O coeficiente de correlação obtido foi 0,999.

13. GARANTIA DA QUALIDADE

A Laborclin obedece o disposto na Lei 8.078/90 - Código de Defesa do Consumidor. Para que o produto apresente seu melhor desempenho, é necessário:

- que o usuário conheça e siga rigorosamente o presente procedimento técnico;

- que os materiais estejam sendo armazenados em condições adequadas;

- que os equipamentos e demais acessórios necessários estejam em boas condições de uso, manutenção e limpeza.

Antes de ser liberado para venda, cada lote do produto é submetido a testes específicos, que são repetidos periodicamente até a data de vencimento expressa em rótulo. Os certificados de análise de cada lote podem ser solicitados junto ao SAC - Serviço de Assessoria ao Cliente, bem como em caso de dúvidas ou quaisquer problemas de origem técnica, através do telefone 0xx-41-667-1188. Quaisquer problemas que inviabilizem uma boa resposta do produto, que tenham ocorrido comprovadamente por falha da Laborclin serão resolvidos sem ônus ao cliente, conforme o disposto em lei.

14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bessey, O.A.; Lowry, O.H. And Brock, M.J. J. Biol. Chem. 164:321, 1946.

2. A reference method for measurement of alkaline phosphatase activity in human serum. Study group on alkaline phosphatase. Clin. Chem., 29: 751, 1983.

3. Mc Combe, R.B.; Bowers, G.N. Jr. Clin. Chem., 18:97, 1972.

4. Mc Combe, R.B.; Bowers, G.N.Jr. & Posen, S. Alkaline phosphatase. Plenum Press, New York, NY, 1979.

5. Massion, C.G.; Frankenfeld, J.K. Clin. Chem, 18:365, 1972.

6. Young, D.S.; Pestaner, L.C. And Gibberman, F. Clin. Chem. 21:5, 1975.

7. Burtis, C.A.; Ashwood, E.R.: Tietz, fundamentals of clinical chemistry, 4 rd. ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1996.

8. Young, D.S. Effects of Preanalytical Variables on Clinical Laboratory Tests. 2nd edition. AACCPress. 1997. pp. 3-82 a 3-89, 4-49 a 4-62

9. Young, D.S. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. 4th edition. AACCPress. 1995.

15. INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

- Os protocolos de programação para equipamentos automáticos podem ser solicitados junto ao SAC ou pela internet no site www.laborclin.com.br;

- Conforme descrito no item referente às amostras, os materiais de controle liofilizados após sua reconstituição passam igualmente a ter um aumento na atividade da FAL, porém este aumento é em proporção maior, atingindo entre 50-100% a cada 24h a 37 °C e cerca de 10% caso armazenado em geladeira (2-8 °C).



LB 170123 - 800 - Rev. 02 - 01/02

SERVIÇO DE
ASSESSORIA AO
CLIENTE

0xx-41-667-1188

e-mail: sac@laborclin.com.br

LABORCLIN PRODUTOS PARA LABORATÓRIOS Ltda.
Rua Cassemiro de Abreu, 521
Pinhais/PR - CEP. 83.321-210
CNPJ: 76.619.113/0001-31 - Insc. Est.: 13700129-26
Resp. Téc.: Elisa H. Uemura CRFPR 4311
www.laborclin.com.br
INDÚSTRIA BRASILEIRA