

# 1 INTRODUÇÃO

A carência de ferro é a deficiência nutricional mais prevalente no mundo, sendo considerada um problema de saúde pública principalmente nos países em desenvolvimento, porém, também altamente observada em países desenvolvidos [1, 2]. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de dois bilhões de pessoas, aproximadamente 30% da população, são anêmicas principalmente devido à falta de ferro, o que prejudica diretamente a vida das pessoas acometidas, sobretudo nos estágios mais avançados [3-5]. As crianças fazem parte do grupo mais afetado pela carência de ferro. São vulneráveis em virtude da hematopoiese, do rápido crescimento e do estado metabólico ativo que exige diversos micronutrientes principalmente nos três primeiros anos de vida [6, 7].

Os prebióticos possuem características fisiológicas semelhantes às fibras solúveis, o que os tornam benéficos no tratamento da constipação, mas gera preocupações a respeito de um possível prejuízo sobre a absorção de ferro, tendo em vista que, tradicionalmente, considera-se que a fibra alimentar seja capaz de diminuir a absorção de minerais no intestino [8-10]. Evidências atuais apontam benefícios na absorção do ferro a partir da ingestão de prebióticos [11-13]. O mecanismo envolvido se relaciona ao fato da fibra solúvel chegar intacta ao cólon e sofrer fermentação. Essa fermentação colônica dá início a uma intensa produção de ácidos graxos de cadeia curta gerando diversas mudanças estruturais e fisiológicas, melhorando a solubilidade dos minerais e facilitando sua absorção [14, 15].

A absorção do ferro, de uma maneira geral, ocorre em nível de intestino delgado, especialmente no duodeno, porém, tem sido relatado na literatura científica que o intestino grosso também possui capacidade absorptiva de alguns minerais. Os trabalhos se relacionam em maior escala ao cálcio e, em menor escala, ao ferro [12, 14, 16].

O papel de determinados componentes alimentares, como os prebióticos, tem recebido especial atenção no metabolismo e absorção de ferro com intuito de reduzir as taxas de anemia na população [17-19]. O prebiótico goma guar parcialmente hidrolisada (GGPH) é uma fibra solúvel advinda da hidrólise enzimática parcial da goma guar, reduzindo assim seu aspecto viscoso e a capacidade de reter água sem uma perda

considerável de fibras, tornando essa goma utilizável nas dietas enterais, como suplemento de fibra alimentar, em bebidas e alimentos e na indústria alimentícia em geral [11, 20].

Ainda não há um consenso sobre o consumo de fibras por crianças menores de um ano por acreditar que tal nutriente poderia prejudicar no desenvolvimento e crescimento - devido à saciedade precoce - e também na absorção de diversos minerais, dentre eles, o ferro [21]. Porém, considerando as evidências atuais que apontam benefícios na absorção do ferro a partir da ingestão de prebióticos [11, 12] e a ausência de recomendações de fibra alimentar para as menores faixas etárias, torna-se importante esclarecer possíveis mecanismos de ação de prebióticos ainda pouco estudados, como a goma guar parcialmente hidrolisada na utilização da alimentação infantil.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos Gerais e Epidemiologia da Anemia Ferropriva

A anemia é uma condição na qual os glóbulos vermelhos não fornecem oxigênio adequado para os tecidos do corpo [22]. As anemias nutricionais resultam da falta isolada ou combinada de nutrientes como o ferro, o ácido fólico e cianocobalamina (vitamina B<sub>12</sub>). Outros tipos menos frequentes incluem carência de piridoxina (vitamina B6), riboflavina (vitamina B2) ou vitamina A [3]. Mundialmente, a anemia mais comum é a ferropriva ou anemia por falta de ferro, por isso que o termo “anemia” e “anemia ferropriva” são comumente utilizados como sinônimos. Estima-se que 50% dos casos de todas as anemias sejam por falta de ferro [5].

A carência de ferro é a deficiência nutricional mais prevalente no mundo, observada principalmente em países em desenvolvimento, mas também frequente em países desenvolvidos [1, 2]. O número de vítimas de anemia esconde-se por trás de estatísticas globais de mortalidade, hemorragia materna, redução do desempenho escolar e menor produtividade [5]. De acordo com a OMS, cerca de dois bilhões de pessoas, aproximadamente 30% da população, são anêmicas principalmente devido à falta de ferro, o que afeta diretamente a vida das pessoas acometidas, sobretudo nos estágios mais avançados [4, 23].

A distribuição de ferro ocorre de dois modos: funcional e de depósito. A quantidade de ferro funcional (hemoglobina, mioglobina e outras enzimas) contribui com  $\frac{2}{3}$  do ferro total do organismo e a de depósito (ferritina e hemossiderina) totaliza  $\frac{1}{3}$ . Os estoques estão aumentados nas crianças em decorrência de maiores demandas para o crescimento [24]. Um adulto tem em seu organismo de 4 a 5g de ferro, sendo que cerca de 60 -70% na forma de hemoglobina, 10% em outras hemoproteínas e enzimas, 0,1% ligado à transferrina e 10 – 30% nos depósitos [24-26].

A deficiência de ferro, sem anemia propriamente instalada, pode ocorrer basicamente por duas formas: quando há uma falta mais branda do mineral ferro, afetando minimamente os estoques ou mesmo quando os estoques estão normais. Neste último caso, a deficiência pode ocorrer por meio de quadros infecciosos (citocinas liberadas durante o processo de inflamação mediada pela hepcidina) ou quando há uma carência de outros

nutrientes (vitamina A, por exemplo) que leva a uma deficiência funcional do mineral. Neste caso, os tecidos ainda são capazes de manter as funções fisiológicas [27]. A anemia é uma manifestação tardia (estágio III) que surge geralmente após algumas semanas de esgotamento das reservas orgânicas ou quando há uma falta severa. Quando há uma deficiência maior de ferro, concentrações de hemoglobina são reduzidas abaixo dos níveis ideais e, desta maneira, considera-se anemia por deficiência de ferro já instalada [1, 22].

O primeiro estágio (deficiência de ferro) é caracterizado pela ausência mensurável dos estoques de ferro, no segundo (eritropoiese deficiente de ferro) há um restrito suprimento de ferro, mas ausência de anemia, e no terceiro é onde se observa as baixas taxas de hemoglobina [27].

A mensuração da anemia é simples e de baixo custo, realizada de acordo com níveis de hemoglobina e/ou hematócrito. A OMS [28] classifica a anemia de acordo com as taxas de hemoglobina, segundo idade/sexo. São considerados anêmicos os indivíduos que apresentarem valores inferiores à referência, como consta no quadro abaixo:

<b>Idade/ Sexo</b>	<b>Valores de referência de hemoglobina (g/dL)</b>
Crianças (0 a < 5 anos)	11,0
Crianças ( $\geq 5$ a < 12 anos)	11,5
Crianças ( $\geq 12$ a < 15 anos)	12,0
Mulheres não grávidas ( $\geq 15$ anos)	12,0
Gestantes	11,0
Homens ( $\geq 15$ anos)	13,0

Valores de referência de hemoglobina segundo idade/sexo. **Fonte:** OMS, 2008

A OMS, com base na literatura científica, analisou mundialmente dados entre 1993 e 2005. Os dados disponíveis para as estimativas foram os mais representativos até a presente data, sendo considerado um reflexo fiel da anemia mundial. Crianças em idade pré-escolar (<5 anos) e gestantes lideraram os grupos: 45,7-49,1% e 39,9-43,8% (IC 95%) dos indivíduos se mostraram anêmicos, seguidos por mulheres não grávidas (28,7-31,6% - IC 95%), crianças em idade escolar, de cinco a 14 anos, (19,9-30,9% - IC 95%), idosos (18,3-29,4% - IC 95%) e, por fim, homens (8,60-16,9% - IC 95%). Quando analisados apenas dados brasileiros, observa-se que crianças em idade pré-escolar configuram um problema grave, enquanto mulheres gestantes e não gestantes se enquadram em um problema moderado de saúde pública. Ressalta-se que estes foram os últimos dados mundiais sobre taxas de anemia [28].

Em Dourados – MS foram estudados 462 indivíduos de todas as idades. Dentre as crianças com menos de um ano, os achados foram menores: 30,8% estavam anêmicas, porém, quando analisadas crianças com um ano, de dois a cinco anos e com idades entre seis e 12 anos, mais da metade de todos os grupos evidenciou anemia (57,1%, 56,0% e 52,0% respectivamente). Já dentre os adolescentes (12 a 16 anos) essa ocorrência foi ainda maior (64,3%), enquanto 13,8% dos indivíduos acima de 16 anos apresentaram manifestação de anemia. Quando analisados todos os grupos, os resultados foram semelhantes à literatura (22,7%), sendo a maioria das anemias consideradas como leve [3].

Dados como estes devem chamar a atenção das autoridades públicas sobre a necessidade de reavaliar as estratégias de controle da anemia. Desta maneira é necessário um estudo de abrangência nacional/internacional que identifique a prevalência de anemia ferropriva dentre as várias faixas etárias, principalmente nas crianças que fazem parte do grupo de risco para carência de ferro, considerando a geografia, nível de desenvolvimento e outros fatores sociais e econômicos.

Apesar das evidências de significativa redução na prevalência da desnutrição na população brasileira nas últimas décadas, a anemia ferropriva continua presente, demonstrando que a deficiência de ferro parece não acompanhar a melhoria do estado nutricional da população, cursando como a deficiência endêmica mais proeminente, superando até mesmo a carência de iodo, de vitamina A e a própria desnutrição proteico-calórica [4, 23].

As causas comuns da anemia ferropriva são decorrentes de perdas crônicas de sangue (gastrointestinal, hipermenorreia, infecções parasitárias), uso de ácido acetilsalicílico, anti-inflamatórios, gastrectomia, gravidezes repetidas, desnutrição e doenças infecciosas de repetição. A baixa ingestão, absorção deficiente de ferro, dietas com baixa biodisponibilidade, especialmente nos períodos com requerimentos elevados do nutriente (crescimento e gestação) são os principais fatores das causas da anemia [1, 2, 28].

Nos adultos anêmicos, dentre os sintomas frequentemente encontrados estão: fraqueza, cansaço, sonolência, indisposição, perda da libido, mal estar, deterioração da função cognitiva, comprometimento do sistema imune e predisposição às infecções [4]. Já nas crianças os sintomas são mais relacionados com o desenvolvimento cognitivo e neuropsicomotor (com manifestação em outros ciclos de vida) e no aumento da morbidade [6]. O retardo de crescimento afeta 182 milhões de crianças menores de cinco anos de idade. Acredita-se que esse prejuízo no desenvolvimento é devido à anorexia proveniente

da carência de micronutrientes essenciais, afetando negativamente os parâmetros hematológicos e prejudicando o crescimento físico [7].

As gestantes fazem parte do grupo susceptível à anemia devido a dois processos substancialmente depletivos de ferro: crescimento feto-placentário e expansão de volume sanguíneo [28]. As crianças são vulneráveis em virtude da hematopoiese, do rápido crescimento e do estado metabólico ativo que exige diversos micronutrientes principalmente nos três primeiros anos de vida. Crianças até dois anos, mulheres gestantes e no pós-parto são assistidas por meio de programas de suplementação de ferro com o objetivo de controlar as estatísticas [4, 6].

A deficiência de ferro durante a gravidez, principalmente no último trimestre, aumenta o número de nascimentos prematuros, baixo peso ao nascer, diminuição da capacidade de trabalho, pré-eclâmpsia, mortalidade perinatal e risco elevado de morte materna [23, 29]. Dados revelam que a anemia contribui para cerca de 20% de todas as mortes maternas [5]. Já na criança, a quantidade de ferro independe do estado da mãe em relação a este mineral (salvo os casos de deficiência materna muito grave). A carência de ferro na gestação teria repercussões mais importantes na própria mãe do que na criança, uma vez que ocorre espoliação das reservas de ferro da mãe para atender as suas necessidades [23].

Os determinantes da anemia nas crianças podem iniciar imediatamente no parto com o clampeamento precoce do cordão umbilical e ausência do aleitamento materno na primeira hora de vida. Os riscos aumentam quando a criança não é amamentada adequadamente nos seis primeiros meses de vida, com a introdução precoce de alimentos complementares e com as parasitoses. No período de início da alimentação complementar, a anemia se deve, principalmente, por maus hábitos alimentares, quando o leite materno (com ferro altamente biodisponível) é substituído por alimentos pobres ou que apresentam baixa biodisponibilidade de ferro [4, 30].

O ferro utilizado pelo organismo é obtido de duas fontes principais: reciclagem de hemácias senescentes pelos macrófagos e dieta. Uma vez fagocitados pelos macrófagos, os eritrócitos são degradados, a heme é libertada, o ferro é extraído pela enzima heme oxigenase localizada no retículo endoplasmático e o ferro pode ser armazenado ou exportado. A maior parte do ferro no organismo está associada à molécula de hemoglobina, desta maneira a degradação de hemácias senescentes representa uma fonte

importante de ferro (de 25 a 30 mg/dia), sendo essa quantidade de ferro reciclado suficiente para manter a necessidade diária do mineral para a eritropoiese [31].

Vale ressaltar a diferença das necessidades entre uma criança e um adulto: os adultos são capazes de reciclar 95% das hemácias senescentes, ou seja, apenas 5% do ferro devem ser proveniente da alimentação contrastando com as crianças, na qual a alimentação deve contribuir com cerca de 30% de ferro, já que a necessidade é mais elevada devido ao rápido crescimento corporal e a menor reciclagem de hemácias, portanto, a criança torna-se muito susceptível a entrar em balanço negativo de ferro [23, 24].

É fato que a anemia é um grave problema de saúde pública a nível mundial. Desta maneira, a OMS desenvolveu algumas medidas de saúde que ajudam a reduzir essa carência: aumentar a ingestão de ferro (por meio do consumo de alimentos ricos em ferro e mais biodisponíveis, fortificação alimentar e suplementação), controle de infecção (imunizações, controle da malária e parasitas intestinais) e melhora do estado nutricional com foco na prevenção de outras deficiências nutricionais como a vitamina B<sub>12</sub>, ácido fólico e vitamina A. Tais medidas estão sendo implantadas nos países com altos índices de anemia, malária e infecções parasitárias. A OMS cita ainda que, quando o tratamento é realizado a tempo, podem-se elevar os níveis de produtividade em até 20% [5].

## **2.2 Biodisponibilidade e Metabolismo de Ferro**

O ferro é um elemento vital para a homeostase celular. Sua capacidade em doar e aceitar elétrons torna-se essencial para as múltiplas e importantes funções nos processos biológicos, servindo como cofator para diversas atividades bioquímicas fundamentais. É indispensável no transporte de oxigênio (hemoglobina e mioglobina), síntese de DNA, metabolismo energético, produção de neurotransmissores, formação de colágeno e função do sistema imune. Não é de surpreender que a anemia ferropriva esteja associada a um aumento da morbidade e mortalidade [24-26].

Biodisponibilidade é definida como a quantidade de um nutriente ingerido que é absorvido e está disponível para as funções fisiológicas. É dependente da digestão, absorção pelas células intestinais e transporte para as células do corpo [32].

A biodisponibilidade de ferro no leite humano é elevada, sendo cerca de 50% absorvido, todavia esta biodisponibilidade pode diminuir até 80% quando outros alimentos passam a ser ingeridos pelo lactente antes dos seis meses de idade [23]. A introdução dos

alimentos complementares a partir do sexto mês de vida é de extrema importância visto que a partir desta data observa-se uma baixa reserva de ferro no lactente sendo necessárias escolhas alimentares que supram essa demanda [1].

O ferro da dieta é encontrado sob duas formas: heme e não heme, na forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) na forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ). O ferro heme é proveniente da quebra de hemoglobina e mioglobina contidas nas carnes e vísceras. Possui elevada biodisponibilidade e não é influenciado por fatores inibidores. Cerca de 40% do ferro heme ingerido é absorvido [23, 31].

O ferro não heme é encontrado em hortaliças, cereais, grãos e ovos principalmente na forma férrica. Por estes alimentos serem amplamente distribuídos em nossa dieta habitual perfazem 80 - 90% do ferro de uma dieta padrão, entretanto, apenas aproximadamente 10% é absorvido pelo organismo. Tem sua absorção fortemente influenciada por componentes da dieta. As substâncias ditas promotoras possuem capacidade de solubilizar o ferro facilitando a entrada no intestino delgado. Dentre tais substâncias estão os aminoácidos cisteína e histidina, o ácido ascórbico (vitamina C) e a vitamina A. Alimentos como carnes (boi, galinha, peixe, bode, fígado e porco), além de aumentar a oferta de ferro heme, aumentam a absorção do ferro não heme [23, 31, 33].

Os componentes inibidores da absorção de ferro atuam formando compostos insolúveis com o mineral, dificultando desta maneira sua absorção. Enquadram-se nessa categoria os taninos, encontrados no café e chá mate, o cálcio (leite e derivados), fosvitidina, entre outros [23, 34].

Os fitatos, presentes em alimentos ricos em fibras (cereais integrais e leguminosas), também são considerados antinutricionais [21], entretanto, recentemente, foi demonstrado que as bactérias benéficas (bifidobactérias e lactobacilos) possuem a capacidade de produzir enzimas degradantes destas substâncias, as fitases [35], contradizendo a ideia que alimentos ricos em fibras e fitatos, podem trazer prejuízos à absorção de micronutrientes. Um estudo com mulheres jovens observou que a deficiência de ferro estava associada a baixos níveis de lactobacilos nas fezes, revelando que a flora intestinal poderia facilitar a absorção do ferro pelo ceco e intestino proximal [36]. Nesse sentido, os prebióticos podem atuar servindo de substrato para os probióticos ajudando no crescimento da flora bacteriana.

É fato que uma alimentação restrita em carnes, presente nas menores faixas de renda e dietas vegetarianas, trazem como consequência a anemia ferropriva, pois além de



apresentarem um consumo menor de ferro, ingerem ferro menos biodisponível devido às dietas monótonas, ricas em cereais, e que contém pouca quantidade de carnes e de alimentos fontes de vitamina C [23].

A absorção do ferro ocorre pelo epitélio duodenal superior, que apresenta vilosidades que ampliam a superfície de absorção. O transporte do ferro do lúmen intestinal até a circulação sanguínea ocorre em três fases principais: captação e internalização na membrana apical do enterócito; deslocamento intracelular e transporte para o plasma [31]. As perdas de ferro estão relacionadas à descamação de células da mucosa e pele e também durante as perdas sanguíneas, todavia, não possuem mecanismos regulamentados para sua excreção. O equilíbrio é mantido pelo controle da absorção no duodeno, pois, apesar da importância reconhecida na manutenção da vida, quando em excesso, torna-se tóxico por catalisar a produção de radicais livres trazendo danos aos tecidos [24, 26].

Este controle de absorção ainda é pouco conhecido, mas sugere-se que ocorra por três meios: bloqueio da mucosa, processo regulador de estoques e regulação da eritropoiese. O bloqueio da mucosa nada mais é que a saturação da mucosa em relação ao ferro. Quando doses maiores do mineral são ingeridas há um bloqueio de captação adicional de ferro como se as células fossem “programadas” nas criptas para uma quantidade pré-estabelecida de absorção. Mesmo em quadros de deficiência, quando a célula é exposta a níveis excessivos do mineral, são absorvidas pequenas quantidades diárias devido a uma resposta ao acúmulo de ferro perdurando até que os enterócitos sejam substituídos por outros não expostos, o que ocorre entre 3 e 5 dias [24, 31, 33].

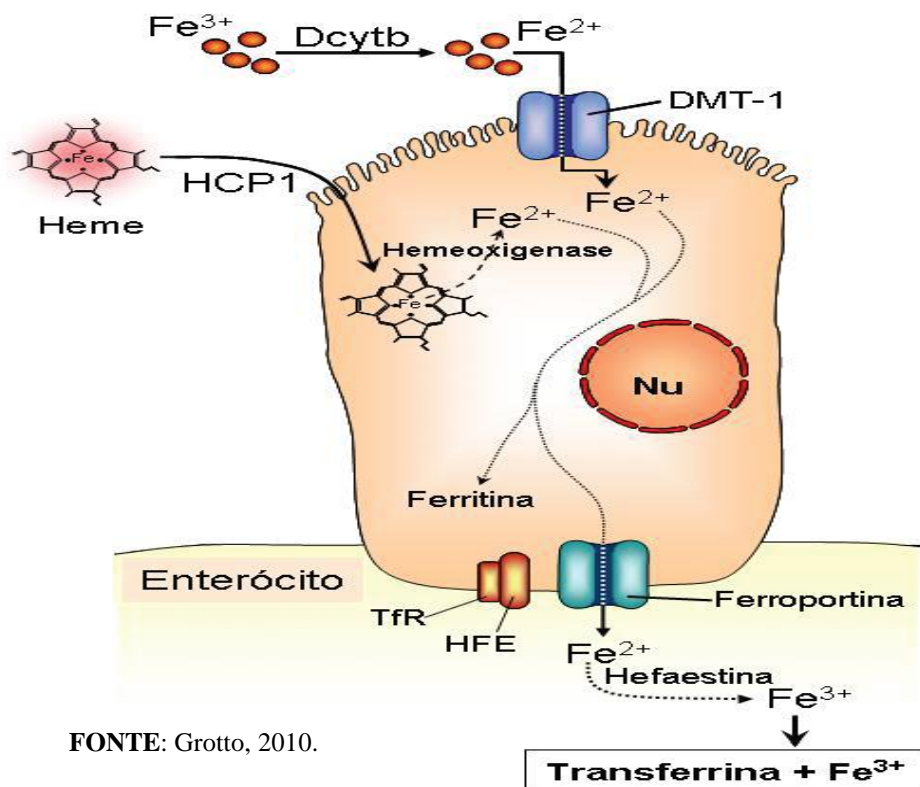
O segundo meio não está bem estabelecido. Sabe-se que os baixos estoques aumentam a capacidade absorptiva (em até três vezes mais) com redução desta capacidade quando os estoques estão elevados. Já na regulação da eritropoiese há uma resposta à deficiência de ferro, na qual as células eritroides sinalizam para a mucosa aumentar a absorção de ferro. Tal sinalização possivelmente estaria relacionada à existência de um regulador eritroide liberado pelas hemácias jovens [24, 26].

As perdas basais fisiológicas de ferro perfazem em média 1 a 2 mg ao dia e devem ser repostas em quantidade semelhante. A quantidade absorvida varia em torno de 10% de todo ferro ingerido, sendo assim, cerca de 10mg de ferro precisam estar presentes todos os dias nas dietas infantis com suas variações de acordo com a faixa etária [26].

Após a ingestão, o ácido clorídrico (HCl) em conjunto às outras secreções gástricas desnaturam as proteínas ligadas ao ferro. Tal acidez auxilia na digestão do ferro facilitando a ação da redutase citocromo B (Dcytb) na borda em escova do duodeno. Para a absorção no intestino, o ferro deve ser reduzido de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ . Esse processo redutor ocorre com influência da Dcytb, do ácido ascórbico e dos aminoácidos cisteína e histidina. O ácido ascórbico, em especial, influencia tanto na redução do ferro quanto participa como cofator para Dcytb além de aumentar o efluxo de ferro pela ferroportina (FPT), citada posteriormente. O transporte subsequente de  $\text{Fe}^{2+}$  através da membrana apical se dá pela ação do transportador de metal divalente (DMT-1) chamado também de Nramp2 (natural resistance associated transporter). No interior da célula, o  $\text{Fe}^{2+}$  absorvido liga-se à ferritina com direção à membrana basolateral, onde está localizada a ferroportina, entrando assim no trânsito intracelular [37, 38].

A via de captação da heme ainda não é bem elucidada. A internalização seria realizada pela proteína transportadora da heme-1 (HCP1) localizada na membrana apical das células do duodeno. Após tal interação, alguns autores citam que, possivelmente, a heme entre na mucosa de forma intacta e outros citam que o mecanismo ainda é incerto. Após a internalização, acredita-se que a maior parte do ferro heme seja liberada como ferro<sup>2+</sup> e entra em caminho comum ao ferro não heme antes de sair dos enterócitos [24, 31].

Após a passagem do ferro pelos enterócitos, ocorre a passagem para a membrana basolateral (serosa) até alcançar a circulação. O transporte é realizado por meio da ferroportina (também chamada de MTP-1, Ireg1, SLC40a1), uma proteína presente nos macrófagos, hepatócitos com grande expressão no duodeno, responsável pelo transporte do ferro internalizado para o plasma. A ferroportina se liga à hepcidina, que regula a exportação de ferro no plasma. Seu controle é inversamente proporcional ao estado do ferro no organismo. Após a liberação do ferro da membrana basolateral, ele é ligado a uma proteína, apotransferrina, formando a transferrina que é transportada para os tecidos. A maioria é levado à medula óssea para a síntese de novas hemácias, o restante utilizado para formação de mioglobina e outras proteínas que necessitam do ferro como cofator e também para estoques hepáticos [24, 31, 39].



FONTE: Grotto, 2010.

**Figura 1:** Proteínas envolvidas na absorção do ferro no enterócito. Dcytb: redutase citocromo B; DMT-1: transportador de metal divalente; HCP-1: proteína transportadora do heme-1; NU: núcleo; HFE: proteína da hemocromatose; TfR: receptor.

Tem sido relatado que o intestino grosso também possui a capacidade para absorver ferro. A ideia vem de estudos que demonstraram uma expressão dos genes envolvidos na absorção do mineral no duodeno, como a Dcytb, o DMT1 e a FPT. Tais estudos relacionam essa absorção aos prebióticos devido ao fato que o intestino grosso é onde são fermentados. A fermentação facilitaria a absorção devido a acontecimentos como: o aumento na expressão desses genes (porém de modo inferior que no duodeno), o aumento na produção dos ácidos graxos de cadeia curta, o aumento da parede cecal, expandindo a superfície de absorção, e também atuaria na redução do pH, o que mantém o ferro solúvel para absorção. Trabalhos anteriores relataram que os prebióticos beneficiaram a absorção de outros micronutrientes, como o cálcio e magnésio. A importância e função de tais genes no cólon ainda não estão claras. O aumento dos genes envolvidos na absorção de ferro foi observado tanto em nível de ceco como de cólon [11-13, 16, 40].

Importante ressaltar que a quantidade de ferro absorvido depende da necessidade do organismo, por exemplo, em situações em que há uma carência de ferro ou nas fases em que a necessidade é maior, há uma maior absorção de ferro. Alguns estudos relatam que nessas ocasiões há uma maior expressão das proteínas envolvidas nesse processo, como a DMT-1 e a FPT. É evidente que este mecanismo apresenta eficiência limitada, pois depende da quantidade e qualidade do ferro consumido [25].

Toda a regulação do ferro se dá por meio da hepcidina. A hepcidina é um hormônio peptídico sintetizado no fígado e composto por 25 aminoácidos. É o principal regulador sistêmico da homeostase de ferro. Como o organismo não possui mecanismos que regulam a excreção do ferro, a hepcidina regula tanto a absorção do ferro pelo duodeno quanto a reciclagem pelos eritrócitos senescentes e a recuperação do ferro de armazenamento. O único alvo molecular da hepcidina é a ferroportina, que funciona como um canal transmembranar para o plasma sendo considerada o maior transportador de ferro [37, 39].

A maioria das células contém quantidades pequenas de FPT, portanto, não exportam ferro, mas utilizam para suas necessidades metabólicas. Já os enterócitos duodenais, hepatócitos e macrófagos expressam a ferroportina em quantidade significativa liberando ferro para todo o corpo. Como a hepcidina é um hormônio regulador de ferro, sua síntese é definida por concentrações e estoques de ferro, em resumo, quando concentrações do mineral estão baixas (na anemia, por exemplo), as moléculas de ferroportina são expostas na membrana plasmática e exportam-no para o plasma. Em resposta a um aumento de ferro, há paralelamente um aumento da liberação da hepcidina que se liga à ferroportina induzindo sua internalização/degradação nos lisossomos, assim, o ferro liberado diminui progressivamente, mantendo o equilíbrio [37, 39].

Inflamações e infecções aumentam substancialmente a síntese e liberação da hepcidina, o que resulta em baixas concentrações de ferro levando a uma anemia de inflamação. Isso ocorre devido às citocinas inflamatórias, como a interleucina 6, que aumentam a síntese de hepcidina. A eliminação do hormônio é feita pelos rins e por endocitose e proteólise mediada pela ferroportina [13, 39].

### **2.3 Prebióticos e Absorção de Ferro**

O papel de determinados componentes alimentares, como os prebióticos, tem recebido especial atenção no metabolismo e absorção de ferro [17-19].

Considera-se fibra alimentar todos os polissacarídeos vegetais da dieta resistentes à digestão e absorção no intestino delgado com fermentação parcial ou completa em diferentes segmentos do cólon. O local onde ocorre a fermentação é dependente do tipo da fibra, sendo que quanto menor o peso molecular mais rápida é sua fermentação. Possuem efeitos benéficos na prevenção e tratamento de diversas doenças como diabetes mellitus,

aterosclerose, câncer de cólon, síndrome do intestino curto, constipação intestinal, entre outros [41, 42].

As fibras podem ser classificadas em solúveis e insolúveis. Dentre as fibras solúveis (fermentáveis) estão as gomas, mucilagens, o amido resistente e algumas hemiceluloses, produzindo principalmente um efeito metabólico no trato gastrointestinal. Inclui-se nas fibras insolúveis a celulose, lignina e outras hemiceluloses. Estas apresentam efeitos mecânicos no trato gastrointestinal, ou seja, mais relacionada à motilidade [42].

Os prebióticos são ingredientes seletivamente fermentáveis que induzem alterações específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, e assim conferem potenciais benefícios sobre a saúde do hospedeiro [43]. Possuem características fisiológicas semelhantes às fibras alimentares fermentáveis. Para um composto ser considerado um prebiótico, deve atender aos seguintes critérios: 1) apresentar resistência à acidez gástrica, à hidrólise por enzimas de mamíferos e absorção gastrointestinal; 2) ser fermentada pela flora intestinal e 3) estimular o crescimento e/ou atividade das bactérias intestinais que contribuem para a saúde e bem-estar [44, 45].

Os compostos não digeríveis pelas enzimas do trato gastrintestinal chegam intactos ao cólon, sofrem fermentação pelas bactérias anaeróbias dando origem aos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Dentre os AGCC mais conhecidos estão o acetato, o butirato, o propionato e o lactato. Atuam reduzindo o pH intestinal e, como consequência, dificultam o crescimento das bactérias patogênicas (*Salmonella sp.* e *Escherichia coli*) e facilitam a absorção de minerais (em especial o cálcio, zinco e ferro). Paralelamente, servem como substrato para os colonócitos (particularmente o butirato) estimulando o crescimento e/ou atividade das bactérias benéficas (Lactobacilos e Bifidobactérias) [7, 34, 46-48]. Em relação à absorção de ferro, os AGCC atuam formando complexos solúveis com o mineral facilitando sua entrada nas células intestinais [12].

Apesar de todos os benefícios supracitados em relação às fibras e prebióticos na saúde humana, a *Dietary References Intakes* (DRI) ainda não dispõe recomendações de fibras para crianças menores de um ano devido a um possível prejuízo sobre crescimento (devido à saciedade precoce) e absorção de minerais. Desta maneira, apenas sabe-se que a fibra deve fazer parte da alimentação complementar da criança, porém, não há dados quantitativos [21].

Os prebióticos mais estudados são a inulina, frutooligossacarídeos (FOS) e galactooligossacarídeo (GOS), presentes em vegetais, grãos, cereais e frutas [34, 47].

Por outro lado, há a goma guar que é uma fibra solúvel, também considerada um prebiótico, obtida por meio da moagem do endosperma da *Cyamopsis tetragonolobus L.*, uma leguminosa cultivada principalmente na Índia e Paquistão, sendo utilizada pelas indústrias alimentícias como espessante e estabilizante em diferentes tipos de alimentos desde a década de 50. Como exemplo, podemos citar as fórmulas infantis destinadas ao tratamento do refluxo gastroesofágico, que são espessadas com fibras solúveis como a goma guar [20].

A goma guar parcialmente hidrolisada (GGPH) é um produto da hidrólise enzimática parcial da goma guar, reduzindo assim seu aspecto viscoso e a capacidade de reter água, sem uma perda considerável de fibras, tornando essa goma utilizável nas dietas enterais, como suplemento de fibra alimentar, em bebidas e alimentos e na indústria alimentícia em geral [11, 20].

Seu peso molecular também é consideravelmente reduzido durante a hidrólise chegando a uma média de 20 kDa e oferece entre 1,6 a 1,9 Kcal/g. Um estudo com diferentes pesos moleculares da GGPH correlacionou positivamente o peso molecular com a produção de acetato e negativamente com a produção de propionato, porém, na literatura os achados se divergem quanto ao principal AGCC produzido. Doses de até 20 g/dia de GGPH foram estabelecidas como seguras, sem efeitos fisiológicos adversos [49, 50].

Vários efeitos benéficos dos prebióticos, de uma forma geral, são relatados na literatura como: manutenção da saúde do intestino, prevenção de colite, prevenção de câncer, melhora da imunidade (produção de IgA, modulação de citocinas), redução do colesterol sanguíneo e doenças cardiovasculares, prevenção da obesidade, tratamento da constipação, e efeito menos conhecido na absorção de íons como cálcio, magnésio, ferro, entre outros [48, 51].

O efeito mais conhecido das fibras é sobre o trato gastrointestinal, porém a fibra solúvel, em especial a GGPH, desempenha papéis importantes na saúde e manutenção do organismo.

A GGPH mostrou-se eficaz em reduzir níveis de lipídeos sanguíneos, estresse oxidativo e retardou formação de trombo arterial em *hamsters*. Estes efeitos foram devidos tanto a uma regulação positiva dos antioxidantes endógenos quanto a uma regulação negativa de expressão de ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1), molécula essa que

regula a adesão de plaquetas e leucócitos para dentro da célula endotelial. Ainda foi observado que o prebiótico reduziu o consumo alimentar, porém não influenciando significativamente o ganho de peso corporal quando comparado ao grupo controle (sem GGPH). Os autores ainda sustentam que este mecanismo do efeito insignificante da GGPH sobre o ganho de peso corporal necessita ser mais profundamente investigado [52].

Grupos de camundongos diabéticos tipo II alimentados com diferentes quantidades de GGPH (0%, 2,5% + 2,5% de celulose e 5,0% de GGPH) não apresentaram diferenças significantes no ganho de peso e no consumo alimentar. Achados como LDL-c significativamente menor no grupo contendo GGPH + celulose em relação ao grupo sem fibra, colesterol total e glicose significativamente menor no grupo com 5% de GGPH em comparação com o controle, foram encontrados. O estudo também analisou a modulação da expressão gênica. Os resultados demonstraram que a fibra em questão modulou a expressão de nove genes relacionados à função de defesa e reduziu a expressão de genes envolvidos na esterificação do colesterol e absorção no intestino delgado. Não se sabe se tal efeito deve-se à GGPH ou às fibras em geral [53].

Outro estudo realizado com crianças com idade média de 12,8 anos analisou efeito da GGPH na síndrome do intestino irritável e dor abdominal crônica. Dois grupos homogêneos quanto aos sintomas foram divididos: no grupo GGPH (n= 30) foi administrado oralmente 5g de GGPH diluída em suco de fruta e no segundo (controle - n= 30) foi administrado apenas suco de fruta, ambos durante quatro semanas. Após o período de estudo, os pacientes foram acompanhados por mais quatro semanas e paralelamente foram aplicados três questionários contendo frequência dos sintomas (na qual quanto menor a pontuação melhor o estado geral), consistência das fezes e gravidade da dor. No quesito “frequência dos sintomas”, o grupo GGPH obteve redução significativa na pontuação. Quanto à “consistência das fezes”, observou-se que no grupo GGPH houve uma tendência à normalização das evacuações na qual 40% dos pacientes da GGPH e 13,3% do grupo placebo apresentaram melhoria, porém sem diferença significativa. Na “gravidade da dor” o grupo contendo a fibra demonstrou uma redução da dor enquanto o grupo controle não apresentou melhoria, porém também sem diferenças significativas [54]. A eficácia de fibras solúveis, particularmente da GGPH, sobre a síndrome do intestino irritável é bem relatada na literatura.

Como citado, os prebióticos possuem características fisiológicas semelhantes às fibras alimentares fermentáveis, o que gera, por outro lado, preocupações a respeito de um

possível prejuízo dos mesmos sobre a absorção de ferro em nível intestinal, tendo em vista que tradicionalmente considera-se que a fibra alimentar (principalmente a insolúvel) é capaz de diminuir a absorção de minerais pela sua capacidade quelante, formando complexos de alta estabilidade, que não são absorvidos pelo intestino [8-10], todavia, tem sido relatado que algumas fibras melhoram a absorção de minerais devido à capacidade fermentativa no intestino grosso proximal [55]. Estudos em animais já demonstram benefícios dos prebióticos frente à absorção de cálcio e magnésio e, em menor escala, ferro [12]. Os AGCC produzidos na fermentação, em particular o ácido propiônico, parece desempenhar um papel no aumento da absorção de ferro, formando complexos solúveis com o mineral facilitando sua absorção [34].

Essa absorção aumentada é advinda também do aumento da área de absorção, especialmente do tecido cecal [55]. Quando aumentada essa área, conseqüentemente, ocorre um aumento do número de receptores de ferro presentes no cólon, com maior expressão de enzimas da borda em escova e do sistema de transporte de nutrientes [56, 57].

Além disso, alterações na arquitetura da mucosa do intestino como um resultado de aumentos tanto na celularidade e número de criptas são fatores que podem contribuir para um aumento na superfície de absorção de minerais [58].

Outro aparente colaborador na absorção de ferro é a mucina. As mucinas são glicoproteínas secretadas a partir das células caliciformes e estão envolvidas em uma variedade de funções citoprotetoras contra agressões mecânicas, colonização por bactérias patogênicas e suas toxinas, além de carcinógenos [59]. Nas células caliciformes e extracelularmente associados à mucina luminal encontra-se uma grande quantidade dos transportadores de ferro, DMT1 e mobilferrina, portanto o papel da mucina nessa situação seria aumentar a superfície de absorção do ferro, embora o mecanismo pelo qual a mobilferrina extracelular seria transferida para o interior do enterócito seja desconhecido. Os AGCC gerados por meio da fermentação de prebióticos são capazes de modular a secreção de citocinas e estimular a produção de mucina, o que poderia justificar outro benefício dessas fibras sobre a absorção de ferro. A mucina pode-se ligar a íons de ferro formando complexos solúveis facilitando sua entrada no enterócito [40, 43, 60, 61].

Estudo feito por Weber *et al.* [7] com ratos anêmicos em fase de crescimento, analisou o consumo de dois tipos de ração em dois grupos: ração com fibras (insolúveis e solúveis) e um grupo controle, sem adição de fibras. Ambos os grupos receberam a mesma quantidade de ferro (30mg/Kg de dieta de citrato férrico) após a indução da anemia. O



peso, comprimento e ingestão alimentar foram comparados. Ambos os grupos, após três semanas de tratamento com as respectivas dietas, demonstraram crescimento e ingestão alimentar semelhantes, demonstrando que o consumo de fibras não prejudicou tais fatores. A absorção aparente de ferro, calculada utilizando a quantidade de ferro excretada (fezes) e ingerida (ração), também foi semelhante, demonstrando que as fibras não influenciaram na absorção do mineral. Ainda, observou-se uma redução do pH cecal e aumento do volume fecal, resultados esperados pela ingestão das fibras.

Outro trabalho também realizado com ratos anêmicos em fase de crescimento analisou a influência de duas fibras adicionadas às rações: uma contendo GGPH e outra contendo celulose, além do grupo controle no qual não foi adicionado fibras à ração. Em todas as rações foi acrescentado 25 mg/Kg de ferro elementar, quantidade menor que a recomendada. Parâmetros como ganho de peso, comprimento e recuperação da hemoglobina foram analisados. Foi demonstrado que o consumo de ração e ganho de peso entre os grupos foram semelhantes, porém o grupo contendo GGPH demonstrou uma recuperação de níveis de hemoglobina e absorção de ferro aparente mais satisfatória em relação aos outros grupos, com diferença significativa. Os fígados obtiveram pesos frescos semelhantes entre os grupos, e quando analisados os conteúdos de ferro hepático no tecido seco, a GGPH mais uma vez demonstrou melhores resultados em comparação aos outros grupos [11].

Freitas *et al.* [12], da mesma forma, utilizando ratos anêmicos em fase de crescimento, estudaram inulina, oligofrutose e um composto inulina + oligofrutose (*synergy*) comparando-os a um grupo controle no qual a fibra foi substituída por amido de milho. Todas as rações, após período de indução à anemia, foram acrescentadas de 25 mg/Kg de citrato férrico. Corroborando com os resultados citados, o crescimento, ganho de peso e consumo de ração não foram influenciados pelo consumo das fibras. Após o início de tratamento com as dietas contendo fibras foi encontrado que o grupo controle e o grupo *synergy* não obtiveram aumento significativo de hemoglobina durante as três semanas subsequentes enquanto a inulina e a oligofrutose apresentaram um aumento da hemoglobina e hematócrito com diferenças significantes quando comparadas ao grupo controle. O pH encontrado no conteúdo cecal foi menor em todos os grupos recebendo prebióticos e tal órgão apresentou aumento com diferença significativa expressiva para com o grupo controle. Concluiu-se que a inulina e a oligofrutose aumentaram a biodisponibilidade do mineral.

Recentemente foram analisados novamente dois prebióticos frente à anemia: a oligofrutose e a inulina. Também foram utilizados ratos anêmicos e tais grupos foram comparados a um grupo controle. Neste estudo, durante todas as semanas, não foi acrescentado ferro à ração dos três grupos. O coeficiente de eficiência alimentar, que avalia a quantidade de ração ingerida, o crescimento, ganho de peso, peso do duodeno e cólon proximal foram semelhantes entre os grupos. Quando comparado o peso da parede cecal, foi observada uma diferença significativa entre o grupo inulina com grupo controle e grupo oligofrutose com grupo controle, o mesmo aconteceu com o pH do conteúdo cecal, o qual foi menor no grupo das fibras. A análise por *Western blotting* das proteínas de importância para absorção do ferro (Dcytb, DMT1 e FPT) não demonstrou um aumento significativo no duodeno ao serem analisados ambos os grupos que consumiram os prebióticos. Diferentemente, o grupo inulina aumentou em 162% a expressão de DMT1 no ceco e em 135% a expressão de Dcytb no cólon proximal comparado ao grupo controle. No grupo oligofrutose essa diferença não foi significativa, tendo um aumento de 59,4% de DMT1 no ceco e apenas 23% de aumento da Dcytb no cólon proximal em comparação ao controle. A ferroportina, não teve aumento significativo no duodeno, ceco ou cólon proximal no grupo inulina e foi reduzida no grupo oligofrutose [13].

Ainda não há um consenso sobre o consumo de fibras por crianças menores de um ano por acreditar que tal nutriente poderia prejudicar o desenvolvimento e crescimento - devido à saciedade precoce - e também na absorção de diversos minerais, dentre eles, o ferro. Entretanto, como pôde ser observado, estudos mais recentes (*in vivo*) não encontraram prejuízos no ganho de peso e, contrariando as antigas evidências, tais estudos demonstraram um aumento nas taxas de hemoglobina ou apenas não limitaram a absorção do ferro.

Considerando as evidências atuais que apontam benefício na absorção do ferro [11, 12], torna-se importante esclarecer possíveis mecanismos de ação de prebióticos ainda pouco estudados, como a goma guar parcialmente hidrolisada.

### 3 OBJETIVOS

Verificar o efeito da ingestão do prebiótico goma guar parcialmente hidrolisada em ratos anêmicos e em fase de crescimento, sobre os seguintes parâmetros:

- Consumo alimentar e desenvolvimento corporal;
- Hemoglobina e hematócrito;
- pH do conteúdo cecal;
- Peso da parede duodenal e cecal;
- Peso e conteúdo de ferro hepático;
- Expressão duodenal, cecal e hepática de um transportador de ferro: a Ferroportina 1 (FPN 1).

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sousa FGM, Araújo TL. Fatores de risco para carência nutricional de ferro em crianças de seis a sessenta meses na perspectiva do modelo campo de saúde. *Texto contexto enferm.* 2004;13(3):420-6.
2. Martins JM. Universal iron fortification of foods: the view of a hematologist. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2012;34(6):459-63.
3. World Health Organization (WHO). Micronutrient deficiencies: iron deficiency anaemia <http://www.who.int/nutrition/topics/ida/en/2015> [cited 2015 07 jan].
4. Lachi T, Reis CB. Frequency of anemia in the patients of a family health team in Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Anemia.* 2011; (1):1-5.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Programa Nacional de Suplementação de Ferro: manual de condutas gerais. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.
6. Sazawal S, Dhingra U, Hiremath G, Sarkar A, Dhingra P, Dutta A, *et al.* Prebiotic and probiotic fortified milk in prevention of morbidities among children: community-based, randomized, double-blind, controlled trial. *PLoS One.* 2010;5(8):e12164.
7. Weber TK, de Cássia Freitas K, Amancio OM, de Moraes MB. Effect of dietary fibre mixture on growth and intestinal iron absorption in rats recovering from iron-deficiency anaemia. *Br J Nutr.* 2010;104(10):1471-6.
8. Osório MM, Lira PIC, Batista-Filho M, Ashworth A. Prevalence of anemia in children 6–59 months old in the state of Pernambuco, Brazil. *Rev Panam Salud Publica.* 2001;10(2):101-7.
9. Bach Kristensen M, Tetens I, Alstrup Jørgensen AB, Dal Thomsen A, Milman N, Hels O, *et al.* A decrease in iron status in young healthy women after long-term daily consumption of the recommended intake of fibre-rich wheat bread. *Eur J Nutr.* 2005;44(6):334-40.
10. Feltrin C, Batista de Moraes M, de Cássia Freitas K, Beninga de Moraes T, Fagundes Neto U, Silvério Amancio OM. Effect of soluble fiber pectin on growth and intestinal iron absorption in rats during recovery from iron deficiency anemia. *Biol Trace Elem Res.* 2009;129(1-3):221-8.
11. Freitas KC, Amancio OM, Ferreira Novo N, Fagundes-Neto U, de Moraes MB. Partially hydrolyzed guar gum increases intestinal absorption of iron in growing rats with iron deficiency anemia. *Clin Nutr.* 2006;25(5):851-8.

12. Freitas KC, Amancio OM, de Moraes MB. High-performance inulin and oligofructose prebiotics increase the intestinal absorption of iron in rats with iron deficiency anaemia during the growth phase. *Br J Nutr.* 2012;108(6):1008-16.
13. Marciano R, Santamarina AB, de Santana AA, Silva ML, Amancio OM, do Nascimento CM, *et al.* Effects of prebiotic supplementation on the expression of proteins regulating iron absorption in anaemic growing rats. *Br J Nutr.* 2015:1-8.
14. Scholz-Ahrens KE, Schrezenmeir J. Inulin and oligofructose and mineral metabolism: the evidence from animal trials. *J Nutr.* 2007;137(11 Suppl):2513S-23S.
15. Capriles VD, Arêas JAG. Frutanos do tipo inulina e aumento da absorção de cálcio: uma revisão sistemática. *Rev Nutr.* 2012,25(1):147-59.
16. Sakai K, Ohta A, Shiga K, Takasaki M, Tokunaga T, Hara H. The cecum and dietary short-chain fructooligosaccharides are involved in preventing postgastrectomy anemia in rats. *J Nutr.* 2000;130(6):1608-12.
17. Tako E, Glahn RP, Welch RM, Lei X, Yasuda K, Miller DD. Dietary inulin affects the expression of intestinal enterocyte iron transporters, receptors and storage protein and alters the microbiota in the pig intestine. *Br J Nutr.* 2008;99(3):472-80.
18. Yasuda K, Roneker KR, Miller DD, Welch RM, Lei XG. Supplemental dietary inulin affects the bioavailability of iron in corn and soybean meal to young pigs. *J Nutr.* 2006;136(12):3033-8.
19. Pitarresi G, Tripodo G, Cavallaro G, Palumbo FS, Giammona G. Inulin-iron complexes: a potential treatment of iron deficiency anaemia. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;68(2):267-76.
20. Yoon SJ, Chu DC, Raj Juneja L. Chemical and physical properties, safety and application of partially hydrolyzed guar gum as dietary fiber. *J Clin Biochem Nutr.* 2008;42:1-7.
21. Institute of Medicine, Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements, Washington, D.C.:IOM, 2006.
22. Ngui R, Lim YA, Chong Kin L, Sek Chuen C, Jaffar S. Association between anaemia, iron deficiency anaemia, neglected parasitic infections and socioeconomic factors in rural children of West Malaysia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(3):e1550.
23. Osório MM. Fatores determinantes da anemia em crianças. *J Pediatr.* 2002;78(4):269-78.
24. Braga JAP, Amancio OMS, Vitalle MSS. O ferro e a saúde das populações. São Paulo: Roca, 2006.

25. Cançado RD, Muñoz M. Intravenous iron therapy: how far have we come? *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2011;33(6):461-9.
26. Wang J, Pantopoulos K. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem J.* 2011;434(3):365-81.
27. World Health Organization, International Micronutrient Malnutrition Prevention and Control Program, Centers for Disease Control and Prevention. Division of Nutrition and Physical Activity. Assessing the iron status of populations: including literature reviews, 2nd ed. Geneva: WHO,2004.
28. World Health Organization. Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005: WHO global database on anaemia. Geneva: WHO, 2008.
29. Yakoob MY, Bhutta ZA. Effect of routine iron supplementation with or without folic acid on anemia during pregnancy. *BMC Public Health.* 2011;11 Suppl 3:S21.
30. dos Santos RF, Gonzalez ES, de Albuquerque EC, de Arruda IK, Diniz AaS, Figueroa JN, *et al.* Prevalence of anemia in under five-year-old children in a children's hospital in Recife, Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2011;33(2):100-4.
31. Grotto HZW. Fisiologia e metabolismo do ferro. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2010;32 supl. 2.
32. Etcheverry P, Grusak MA, Fleige LE. Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B(6), B(12), D, and E. *Front Physiol.* 2012;3:317.
33. Grotto HZW. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2008;30(5):390-7.
34. Tako E, Glahn RP, Knez M, Stangoulis JC. The effect of wheat prebiotics on the gut bacterial population and iron status of iron deficient broiler chickens. *Nutr J.* 2014;13(58):1-10.
35. Haros M, Carlsson NG, Almgren A, Larsson-Alminger M, Sandberg AS, Andlid T. Phytate degradation by human gut isolated *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC27919 and its probiotic potential. *Int J Food Microbiol.* 2009;135(1):7-14.
36. Balamurugan R, Mary RR, Chittaranjan S, Jancy H, Shobana Devi R, Ramakrishna BS. Low levels of faecal lactobacilli in women with iron-deficiency anaemia in south India. *Br J Nutr.* 2010;104(7):931-4.
37. Lemos AdR, Ismael LAS, Boato CCM, Borges MTF, Rondó PHdC. Hepcidin as a biochemical parameter for the assessment of iron deficiency anemia. *Rev Assoc Med Bras.* 2010;56(5):596-9.
38. Scheers N, Sandberg AS. Iron transport through ferroportin is induced by intracellular ascorbate and involves IRP2 and HIF2 $\alpha$ . *Nutrients.* 2014;6(1):249-60.

39. Ganz T, Nemeth E. The hepcidin-ferroportin system as a therapeutic target in anemias and iron overload disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011(1):538-42.
40. dos Santos EF, Tsuboi KH, Araújo MR, Falconi MA, Ouwehand AC, Andreollo NA, *et al.* A ingestão de prébióticos previne a malabsorção de ferro e anemia induzidas pela gastrectomia?: Estudo experimental em ratos. *ABCD, Arq Bras Cir Dig*. 2011;24( 1 ): 9-14.
41. Bosscher D, Van Caillie-Bertrand M, Deelstra H. Effect of thickening agents, based on soluble dietary fiber, on the availability of calcium, iron, and zinc from infant formulas. *Nutrition*. 2001;17(7-8):614-8.
42. Waitzberg DL. *Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica*, 4ª Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2009.
43. Laparra JM, Díez-Municio M, Herrero M, Moreno FJ. Structural differences of prebiotic oligosaccharides influence their capability to enhance iron absorption in deficient rats. *Food Funct*. 2014;5(10):2430-7.
44. Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, *et al.* Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br J Nutr*. 2010;104 Suppl 2:S1-63.
45. Roberfroid M. Prebiotics: the concept revisited. *J Nutr*. 2007;137(3 Suppl 2):830S-7S.
46. Dostal A, Chassard C, Hilty FM, Zimmermann MB, Jaeggi T, Rossi S, *et al.* Iron depletion and repletion with ferrous sulfate or electrolytic iron modifies the composition and metabolic activity of the gut microbiota in rats. *J Nutr*. 2012;142(2):271-7.
47. Mugambi MN, Musekiwa A, Lombard M, Young T, Blaauw R. Symbiotics, probiotics or prebiotics in infant formula for full term infants: a systematic review. *Nutr J*. 2012;11:81.
48. Patel S, Goyal A. The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. *3 Biotech* 2012;2(2):115-125.
49. Stewart ML, Slavin JL. Molecular weight of guar gum affects short-chain fatty acid profile in model intestinal fermentation. *Mol Nutr Food Res*. 2006;50(10):971-6.
50. Finley JW, Soto-Vaca A, Heimbach J, Rao TP, Juneja LR, Slavin J, *et al.* Safety assessment and caloric value of partially hydrolyzed guar gum. *J Agric Food Chem*. 2013;61(8):1756-71.
51. World Gastroenterology Organisation, Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia, Probióticos e prebióticos, 1st ed. Wi: WGO, 2011.

52. Kuo DC, Hsu SP, Chien CT. Partially hydrolyzed guar gum supplement reduces high-fat diet increased blood lipids and oxidative stress and ameliorates FeCl<sub>3</sub>-induced acute arterial injury in hamsters. *J Biomed Sci.* 2009;16:15.
53. Yasukawa Z, Naito Y, Takagi T, Mizushima K, Tokunaga M, Ishihara N, *et al.* Partially hydrolyzed guar gum affects the expression of genes involved in host defense functions and cholesterol absorption in colonic mucosa of db/db male mice. *J Clin Biochem Nutr.* 2012;51(1):33-8.
54. Romano C, Comito D, Famiani A, Calamarà S, Loddo I. Partially hydrolyzed guar gum in pediatric functional abdominal pain. *World J Gastroenterol.* 2013;19(2):235-40.
55. Miyazato S, Nakagawa C, Kishimoto Y, Tagami H, Hara H. Promotive effects of resistant maltodextrin on apparent absorption of calcium, magnesium, iron and zinc in rats. *Eur J Nutr.* 2010;49(3):165-71.
56. Lopez HW, Levrat-Verny MA, Coudray C, Besson C, Krespine V, Messenger A, *et al.* Class 2 resistant starches lower plasma and liver lipids and improve mineral retention in rats. *J Nutr.* 2001;131(4):1283-9.
57. Pérez-Conesa D, López G, Ros G. Effects of probiotic, prebiotic and synbiotic follow-up infant formulas on large intestine morphology and bone mineralisation in rats. *J Sci Food Agric.* 2007; 87:1059 - 1068.
58. Lobo AR, Gaievski EH, De Carli E, Alvares EP, Colli C. Fructo-oligosaccharides and iron bioavailability in anaemic rats: the effects on iron species distribution, ferroportin-1 expression, crypt bifurcation and crypt cell proliferation in the caecum. *Br J Nutr.* 2014;112(8):1286-95.
59. Barcelo A, Claustre J, Moro F, Chayvialle JA, Cuber JC, Plaisancié P. Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon. *Gut.* 2000;46(2):218-24.
60. Simovich M, Hainsworth LN, Fields PA, Umbreit JN, Conrad ME. Localization of the iron transport proteins Mobilferrin and DMT-1 in the duodenum: the surprising role of mucin. *Am J Hematol.* 2003;74(1):32-45.
61. Kleessen B, Hartmann L, Blaut M. Fructans in the diet cause alterations of intestinal mucosal architecture, released mucins and mucosa-associated bifidobacteria in gnotobiotic rats. *Br J Nutr.* 2003;89(5):597-606.



## 5 ANEXOS

### 5.1 Artigo Científico

O artigo científico descrito neste item foi submetido à revista *Clinical Nutrition Experimental* e as normas para a submissão neste periódico encontram-se disponíveis no site: <https://www.elsevier.com/journals/clinical-nutrition-experimental/2352-9393/guide-for-authors>

**Title: Effect of Partially Hydrolyzed Guar Gum on ferroportin expression in the intestine of anemic growing rats**

Luciana Noia Borges de Carvalho<sup>a\*</sup>, Débora Regina Hoff Brait<sup>a</sup>, Márcia Soares Mattos Vaz<sup>a</sup>, Pablo Christiano Barboza Lollo<sup>a</sup>, Priscila Neder Morato<sup>a</sup>, Silvia Aparecida Oesterreich<sup>a</sup>, Jorge Luiz Raposo Junior<sup>b</sup>, Karine de Cássia Freitas<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Federal University of Grande Dourados, School of Health Sciences, Dourados (Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências da Saúde), Mato Grosso do Sul, Brazil.

<sup>b</sup>Federal University of Grande Dourados, School of Exact Sciences and Technology, Dourados, (Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia), Mato Grosso do Sul, Brazil.

<sup>c</sup>Federal University of Mato Grosso do Sul, Center of Biological Sciences and Health (Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

\*Corresponding author. Address for correspondence: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados– MS. Cidade Universitária s/n, zip code: 79804-970, Brazil. Phone: + 55 (67) 3410-2320. E-mail: [luciana\\_nbc@hotmail.com](mailto:luciana_nbc@hotmail.com)

## Abstract

**Background & aims:** Recent studies reported a positive effect of prebiotics on the bioavailability of iron in fighting the high prevalence of iron deficiency anemia. The objective of the present study was to assess the effect of partially hydrolyzed guar gum (PHGG) on iron absorption mechanisms in anemic growing rats. **Methods:** Male Wistar rats (n=24) aged 21 days in the beginning of the experiment were fed AIN93-G without iron during three weeks in order to induce iron deficiency anemia. Then they were fed a control diet (n=12; without fiber) or a diet with 7.5% of PHGG (n=12), both without iron. Food intake, body growth and feed efficiency coefficient were measured. The animals were euthanized after 2 weeks of treatment and the duodenum, cecum and liver were removed. The weight of organs (duodenum, cecum and liver), pH of cecum content and hepatic iron were assessed. Ferroportin expression in cecum, duodenum and liver was analyzed by Western blotting. **Results:** The intake of PHGG reduced food intake without affecting body growth, and there was a statistically significant difference between the groups regarding feed efficiency coefficient ( $p=0.026$ ), with the highest value found in the PHGG group. Liver and duodenum weights were not statistically significant between the groups. The weight of cecal content showed a significant increase in group PHGG ( $p\leq 0.001$ ) and the pH of cecal content was significantly lower in the same group ( $p\leq 0.001$ ). Hepatic iron, hemoglobin and hematocrit levels did not differ between the groups. PHGG intake significantly increased ferroportin expression in the cecum ( $p\leq 0.001$ ); however, the difference was not significant in the duodenum and liver. **Conclusions:** PHGG seems to have a positive influence on iron absorption through transporter expression, structural and physiological changes in the colon of anemic growing animals.

**Keywords:** Dietary fiber, Animal model, Rats, Anemia, Iron, Growth

Abbreviations: PHGG, partially hydrolyzed guar gum; Hb, hemoglobin; Ht, hematocrit; FEC, feed efficiency coefficient; DMT1, Divalent Metal Transporter; Dcytb, Cytochrome B Reductase; FOS, fructo-oligosaccharides.

## 1. Introduction

Iron deficiency is the most prevalent nutritional deficiency in the world, particularly in developing countries, but is also common in developed countries [1]. According to the World Health Organization, around two billion of people, approximately 30% of the population, are anemic mainly due to the lack of iron, which directly impacts the lives of the affected people, especially in the late stages [2-4]. Children are among the vulnerable groups to iron deficiency anemia due to hematopoiesis, fast growth, and the active metabolic state that require several micronutrients, especially in the first three years of life [5,6]. Low iron intake, malabsorption of iron, monotonous diets with low bioavailability of the mineral, especially in periods of high requirements are the main causes of anemia [1,6].

The role of some food components, such as prebiotics, has received special attention in metabolism and absorption of iron [7-9]. As described in the literature, prebiotics act on the absorption of minerals by generating short chain fatty acids forming soluble complexes, increasing the surface absorption, the number of receptors, among other mechanisms [10].

Partially hydrolyzed guar gum (PHGG) is a soluble fiber, also considered a prebiotic derived from *Cyamopsis tetragonolobus L.*, with lower viscosity and a retaining a considerable share of the fiber content. It is used in large scale in enteral feeding, as dietary fiber supplement, in drinks and foods, and in the food industry in general [11]. However, little is known about the effect of PHGG on the absorption of minerals and its mechanisms, but since recent studies have shown benefits associated to prebiotic intake on mineral absorption [10-12], with no damage to the body growth of the animals. The present study aimed to analyze the effect of PHGG intake on food intake, body growth, intestinal weight and on ferroportin expression in the intestine and liver of anemic growing rats.

## 2. Materials and Methods

Wistar rats (*Rattus norvegicus Wistar*) (n=24) aged 21 days were used at the beginning of the experiment. During all of the study period the rats received: ad libitum, diet and deionized water, by means of the MilliQ Plus system (Millipore Corp., São Paulo, SP, Brazil). They were maintained in individual metabolic cages, made of stainless steel

(Beiramar - MA122R<sup>®</sup>), in a room with a 12/12 h light/dark cycle, at 23±1°C. The use of these cages was intended to prevent coprophagy and feed contamination with iron. This project was entirely approved by the Animal Ethics Committee of Federal University of Grande Dourados (UFGD) under protocol n° 008/2013.

The animals were fed a diet recommended by the American Institute of Nutrition (AIN93-G), which included the nutrients necessary for the appropriate growth of the rats. For the induction of iron deficiency anemia, no iron was added to the diet during the first three weeks of the study. In the sixth week of life (42 days of age), the animals were distributed in two groups, according to weight, body length, hemoglobin rate (Hb) and hematocrit (Ht), with the purpose of forming similar groups.

The weight was measured weekly in digital balance (Camry EK4052<sup>®</sup>) with maximum capacity of 5000 g, measurement intervals of 1g, and length (body and tail) was measured with a 2- meter inelastic measuring tape (Sanny<sup>®</sup>) with a precision of 0.1cm, fixed along the bench to facilitate the measurement. Blood collection for hemoglobin and hematocrit was performed on the tail of the animal previously anesthetized with ketamine and xylazine in combination, intraperitoneally (66,6 and 13,3 mg/Kg, respectively).

After collection, the samples were taken to University Hospital of Federal University of Grande Dourados (HU/UFGD) and analyzed in Sysmex XT-4000<sup>®</sup> hematology analyzer. For confirmation of the induction of anemia, values below 11g/dL were considered [10].

Therefore after induction of anemia, two groups with twelve animals each were formed; the animals were fed the following diets in the subsequent two weeks, as follows: 1) Partially hydrolyzed guar gum group (PHGG): diet containing 75g of partially hydrolyzed guar gum (100 g of Nutrisource Fiber - Nestlé<sup>®</sup>) and 2) Control group: diet without dietary fiber, which was replaced by 100g of corn starch, as suggested in the literature [13]. Both diets had no addition of iron, and the amount of PHGG was subtracted from the total corn starch of the diet.

At first, the food portion prepared was equal to the total amount of food to be ingested by the two groups during the experimental period, consisting of the ingredients common to the two groups. Then, the diets were separated, and the individual components of each were added. Most ingredients were weighed in digital balance with maximum capacity of 10 Kg and precision of 1 g (SF-400), and the smallest components were

weighed in electronic analytical balance (BEL Mark M<sup>®</sup>) with maximum capacity of 220 g and precision of 0.1 mg.

For confirmation of the iron content, both diets were analyzed by the Laboratory of Spectrometry and Applied Chromatography of School of Exact Sciences and Technology (FACET) of Federal University of Grande Dourados (UFGD), measured in triplicate, and their average obtained. The composition of each diet is described in Table 1:

After the beginning of the administration of the experimental diets, weight, length and hemoglobin and hematocrit values were measured on a weekly basis, and food intake was daily measured. In the same period, the feed efficiency coefficient (FEC) was calculated by dividing weight gain (g) / diet consumption (g).

After the two weeks of treatment, the animals were euthanized with intraperitoneal injections of ketamine (90 mg/Kg) and xylazine (10 mg/Kg) in combination. Median incision was made in the abdominal wall and the peritoneum, and then liver, duodenum and cecum were removed. In the duodenum, the section removed extended from the pylorus to the ligament of Treitz. The cecum was isolated from the ileocecal valve and the beginning of the proximal colon. All adhesions to the intestines were discarded and pH of cecum content was measured. Thus, the animals were euthanized between 6 a.m. and 10 a.m., when intestinal fermentation is more active [10]. The contents of the cecum were placed in a beaker immediately after body section, and pH was measured by a benchtop pH meter (Hanna HI 2221-01).

All the organs were rinsed with deionized water to remove excess blood and lumen contents. The organs were placed on filter paper to remove excess water and then weighed on analytical balance (BEL Mark M<sup>®</sup>). The intestines and the liver sample were stored in buffer and frozen in ultrafreezer (-86° C) until analyzes by Western blot.

After determination of its fresh weight, the remainder of the liver was dried in oven for 22 hours and weighed for three consecutive times or more to constant dry weight. After drying, analysis of the hepatic iron content in the samples was performed.

## **2.1 Determination of Iron in Liver Samples and Diets**

Ultrapure water (resistivity of 18.2 MΩ cm) obtained from a *Millipore Milli-Q Academic* deionizer (*Beadford*<sup>®</sup>, US) was used to prepare all working solutions.

Iron determination was performed using flame atomic absorption spectrometry AA 240FS (*Agilent Technologies*<sup>®</sup>, EUA) equipped with mono element hollow cathode lamp (LCO). Measurements were made at the Fe 248.3-nm line, lamp current (5 mA), slit width (0.5 nm), flame composition (air/acetylene), acetylene flow (2.0 L min<sup>-1</sup>), oxidizer flow (13.0 L min<sup>-1</sup>) and burner height (100 mm). With a flow rate fixed at 5.0 mL min<sup>-1</sup>, the solutions were aspirated by the nebulizer/burner system and the element was atomized under optimal conditions. All measurements were made with 5 repetitions.

Mono-element calibration analytical solutions were prepared at each daily routine work by appropriate dilution of the stock solution (1000 mg L<sup>-1</sup>, *SpecSol*<sup>®</sup>, Brazil) at interval 0.5 – 8.0 mg L<sup>-1</sup> Fe in 1.0% (m/v) HNO<sub>3</sub> medium

For the sample preparation procedure, masses of 1.0000 (± 0.0001 g) of liver and/or diet were weighed in analytical balance FA2104N (*Bioprecisa*<sup>®</sup>, Brasil) and transferred to reaction/decomposition tubes. Then, 5.0 mL HNO<sub>3</sub> (65% (v/v), *Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>, Brasil) and 3.0 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98% (v/v), *Vetec*<sup>®</sup>, Brasil) were added. The sample + reagent mixture was submitted to slow heating in digestion blocks until 200°C and was maintained there for another 150 minutes. Aliquots of 6.0 and 3.0 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% (m/v), *Dinâmica*<sup>®</sup>, Brasil) were added at 150 and 180 minutes, respectively. The addition of (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) helps in the process of decomposition/oxidation process present in the samples. Digestion procedures were made in triplicate.

The main parameters of analytical reliability, such as detection and quantification limit, were calculated by IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) method using Microsoft Office<sup>®</sup> Excel and Microcal<sup>®</sup> OriginPro as calculation tools.

Running water was used to clean the materials used in the preparation of the solutions. Later decontamination was made by immersion nitric acid 10% (v/v) for 24 hours. Then the materials were thoroughly rinsed with deionized water.

## 2.2 Analysis of protein levels by Western blotting

The tissues (duodenum, cecum and liver) were homogenized in extraction buffer (Trizma base 100 mM, pH 7.5; Aprotinin 0.1 mg/mL; PMSF 2 mM; 10 mM sodium Orthovanadate; 100 mM sodium fluoride; 10 mM sodium pyrophosphate and EDTA 10 M) with Polytron<sup>®</sup> model713T homogenizer (*Fisatom Equipamentos Científicos, SP, BRI*). After homogenization, 10% triton X-100 was added to the samples, and these were

kept on ice for 30 minutes and centrifuged at 14.000 rpm/40 minutes at 4°C with a type 70 Ti rotor (Beckman, Fullerton, CA, USA).

Supernatants were collected and the levels of total protein were determined by the Bradford method with Bio-Rad® reagent (Bio-Rad Laboratório, Hercules, CA, USA). Laemmli buffer was added to the amount of normalized sample by protein concentration (50 µg protein), (0.01% Bromophenol blue, 50 mM sodium phosphate, Glycerol 25%, SDS 1%) containing DTT (200 mM). The microtubes containing the samples were boiled for five minutes and the samples were applied in 8% polyacrylamide gel (Mini Wide, CA, USA). All gels were marked with mixing patterns *rainbow*™ Amersham Bioscience® (Uppsala, SE) with molecular weight compatible with the weight of the proteins to be identified.

Electrotransfer from gel to nitrocellulose membranes was performed for 1.5 hours (four membranes) at 15 volts (constant voltage) in a semi-dry transfer tank of Bio-Rad® (CA, USA). Then, the membranes were blocked at 4°C, for 30 minutes, with 5 mL of blocking buffer, baseline solution (Trizma base 100 mM; EDTA mM; Triton X-100 0.5%; sodium orthovanadate 2 mM) and 3% bovine albumin. The nitrocellulose membranes were incubated overnight at 4° with Ferroportin 1 antibody (ferroportin), molecular weight of 68 kDa, da Abcam (Cambridge, MA, EUA, catalogue number ab58695), in 1:1000 dilution in blocking buffer. After 30 minutes of washing in baseline solution, with stirring every 10 minutes, the membranes were incubated with the respective peroxidase conjugated secondary antibodies for one hour, in 1:3000 dilution in blocking buffer at 22°C.

Subsequently, the membranes were again washed for 5 minutes in baseline solution, with stirring every 10 minutes and were incubated with Enhanced Chemiluminescence luminol reagent (ECL), of Amersahm Biosciences® (Uppsala, SE) and exposed to Uvitec Alliance 4.7® gel documentation (Cambridge, UK). The intensity of the bands or spots of interest was identified by the pattern of electrophoretic motility and quantified by optical densitometry using Scion Image Software® (Scion Corporation, Frederick, MD, USA). After the first incubation, the membranes were subjected to stripping with the aim to remove previously bound antibodies and allow re-hybridization with the anti-alpha-tubulin antibody (a protein loading control antibody), with molecular weight of 56 kDa. Thus, the membranes were incubated with stripping solution ( $\beta$ -mercaptoethanol 0.2 M; Urea 8 M; albumin 0.05%; Trizma base 1 M), for 30 minutes, at a temperature of 48°C, with stirring every 5 minutes. The membranes were then neutralized

with Trizma HCL solution (1 M; pH 7.5) for 30 minutes at room temperature, also under stirring. Afterwards, the membranes were subjected to blocking, incubation with anti-alpha-tubulin primary antibody and then to incubation with secondary antibody.

The results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation for numerical variables with normal distribution. Student t-test was used for comparison between the groups, calculations were performed using Jandel-Sigma Stat software, and the level of rejection of the null hypothesis was set at 5% or  $p < 0.05$ . Mann-Whitney test was used for numerical variables with non-normal distribution.

### 3. Results

Before the dietary treatment, the average weight of the rats in groups PHGG and control was as follows:  $178.5 \pm 26.53$  and  $186.5 \pm 36.59$  g ( $p=0.560$ ); body length was  $33.42 \pm 1.73$  and  $33.47 \pm 2.21$  cm ( $p=0.959$ ) and hemoglobin values were  $7.72 \pm 1.29$  and  $7.69 \pm 1.32$  g/dL ( $p=0.963$ ) respectively. Regarding weight, body length and hemoglobin, the two groups analyzed in this study were similar before the experimental diets.

Table 2 shows the weekly intake, the total intake in the two-week period, weekly weight, body length and the Feed Efficiency Coefficient (FEC) generated in each period. In the 2-week assessment period the PHGG group showed lower values regarding total intake, which were significantly different from the results of the control group, however, there was no statistically significant difference between both groups in weight and body length. The FEC of the PHGG group was higher than that of the control group at all assessment times, with a statistically significant difference in the first week and considering the total period.

The total volume of deionized water consumed by the PHGG and control groups during the 2-week dietary treatment period was similar,  $334,08 \pm 75,81$  e  $307,08 \pm 49,92$  mL ( $p=0,314$ ). Analysis of the groups at different moments (week 1 and week 2 of the dietary treatment) showed no statistically significant difference between them).

The weekly hemoglobin (g/dL) and hematocrit (%) values of the two groups after the beginning of the dietary treatment are shown in Table 3. There were no statistically significant differences between the groups, and the results confirmed induction and maintenance of iron deficiency anemia. Hepatic iron levels, in  $\mu\text{g/g}$ , is also presented: there was no statistically significant difference between the two groups.



The fresh weight of liver was  $11.86 \pm 0.85$  g in group PHGG and  $11.83 \pm 1.45$  g in the control group, without statistically significant difference between the groups ( $p=0.959$ ).

Table 4 shows the weights of the different intestinal sections extracted after euthanasia of the animals. The weight of the cecal wall of the animals in group PHGG was significantly higher than that of the control group ( $p \leq 0.001$ ). The pH of cecal content, which was lower in the group treated with prebiotic, is also shown ( $p \leq 0.001$ ).

Western blotting analysis (figure 1) identified a significant difference regarding ferroportin in the cecum of the PHGG group compared to the control group (in absolute numbers: 34.902.526 and 9.476.214, respectively); however, there was no statistically significant difference between the PHGG and the control groups regarding the duodenum and liver (in absolute numbers - duodenum: 20.956.970 and 22.834.442; liver: 19.660.349 and 19.734.483, respectively).

#### 4. Discussion

Dietary fibers are not recommended to children in the first year of life due to possible impact on growth (early satiety) and mineral absorption [14]. In our study, the rats fed a diet containing 7.5% partially hydrolyzed guar gum showed lower food intake than the control group, though without impact on weight and body length. This finding is similar to the results of another study with PHGG in which the use of fibers reduced, though not significantly, dietary intake without impact on weight gain in hamsters [15]. In their studies of diets containing 2.5% and 5% PHGG, Yasukawa *et al.* [16] did not observe reduced dietary intake or loss in weight gain in mice during a 4-week monitoring period. The referred studies did not assess body growth. Freitas *et al.* [11] also did not find significant differences with the use of PHGG on the growth and body weight of growing rats over a 3-week period. Other soluble fibers such as oligofructose and inulin also did not affect the growth of the animals [7,10,12].

Analysis of hemoglobin and hematocrit during the two weeks of treatment and of hepatic iron levels at the end of the study were similar between the groups, without statistically significant differences. It should be stressed that in our study iron was not added to the diet at any stage of the experiment, which explains the findings. Our primary goal was to observe the effect of the prebiotic on iron regulatory factors, since anemia is

characterized by increased iron regulatory gene expression in the duodenum and the large intestine [17].

The vast bulk of mineral absorption occurs in the small intestine. However, the absorptive capacity of the large intestine has also been reported in the scientific literature. These studies relate to a greater extent to calcium, and to a lesser extent to iron [10,18,19].

It was generally believed that fibers (mostly insoluble) would have a negative effect on mineral absorption because they formed insoluble and stable complexes not absorbed by the gut [14,20-22], however, prebiotics such as inulin and oligofructose are extensively studied in calcium absorption and contradict this principle. The mechanism involved is that the soluble fiber reaches the colon intact and undergoes colonic microbiota fermentation. Such fermentation initiates intense production of short chain fatty acids, especially butyrate, consequently reducing cecal pH and improving the solubility of minerals, facilitating their absorption. Besides, butyrate, the main energy source of colonocytes, induces structural changes stimulating cell proliferation in the entire colon, increasing the absorptive area of the intestinal epithelium [18,23]. Increased mucosal cellularity and the number of intestinal crypts can also contribute to increase the mineral absorptive surface [24].

There are no excretory mechanisms of iron: iron absorption by the small intestine is regulated according to the body needs. Thus, low iron intake increases iron regulatory gene expression. The genes involved in iron metabolism such as Divalent Metal Transporter (DMT1), Cytochrome B Reductase (Dcytb) and ferroportin are also expressed in the large intestine, but significantly less than in the duodenum [25,26].

Ferroportin is a protein highly expressed on enterocytes, but also on macrophages and hepatocytes. This protein binds to hepcidin, which regulates iron transport into plasma and after being transported across the basolateral membrane, the iron is bound to apotransferrin that becomes transferrin and is delivered to the bone marrow (for the synthesis of new red blood cells), and the remainder is used for the formation of myoglobin and other proteins (enzyme cofactors) that require additional iron, and also as liver iron reserves [27].

In the present study, the expression of ferroportin, which transports iron into the plasma was significantly higher in the cecum in the PHGG than in the control group ( $p \leq 0.001$ ), indicating an increase of approximately 368.3%. There were no statistically significant differences for protein expression in the duodenum and liver. Yasuda *et al.* [28]

explained that the metabolites generated from prebiotics have greater influence on the expression of genes in the cecum and colon. This study aimed to identify responses to the finding of Freitas *et al.* [11], and the result is consistent with the findings of these authors who reported that during a 3-week experiment, hemoglobin count was higher in the PHGG group than in the cellulose and control groups ( $p < 0.001$ ).

Sakai *et al.* [19] investigated the performance of fructo-oligosaccharides (FOS) to iron absorption in the large intestine, monitoring the recovery from anemia in gastrectomized rats with or without cecotomia. The rats were divided into four groups: control (*sham* operated), gastrectomized (Gx), cecotomized (Cx) and gastrectomized + cecotomized (GCx). Half of each group was fed a control diet and the other half with a diet containing 7.5% of FOS during 28 days. The only cecotomized rats showed no decrease in Hb and Ht. The gastrectomized rats showed significantly lower values of Hb and Ht compared to *sham* operated animals, except for the group fed on FOS, as this diet prevented anemia in Gx rats. Hb and Ht of Gx rats fed on FOS were statistically higher than in Gx rats fed a control diet ( $p < 0.05$ ), however, in GCx animals, Hb and Ht values were not influenced by the experimental diet. Also, there was an increase in the fraction of soluble iron in cecal content. Thus, the authors concluded that FOS stimulated iron absorption in the large intestine and that the cecum plays a key role in mineral absorption, especially iron.

In a recent study, Marciano *et al.* [12] using the same animal model of the present study, assessed the intake of inulin (9.7%) and oligofructose (9.2%) in DMT1, ferroportin and Dcytb expression. Like PHGG, inulin and oligofructose did not promote a significant increase of these proteins in the duodenum. Inulin increased by 162% a DMT1 expression in the cecum and by 135% Dcytb expression in the proximal colon compared to the control group. In the oligofructose group this difference was not significant, with an increase of 59.4% of DMT1 in the cecum and only 23% increase in Dcytb in the proximal colon compared to the control group. Ferroportin was not significantly increased in the duodenum, cecum or proximal colon in the inulin group and was reduced in the oligofructose group.

Another study [24] involving FOS demonstrated that the prebiotic reduced ferroportin expression in the cecum compared to the other groups. The increase in ferroportin expression in the group fed the PHGG diet may suggest that this fiber is more efficient in increasing the number of iron absorption related receptors, due to the size of the

chain and degree of polymerization, and structural differences of prebiotics may affect iron homeostasis and generate different physiological responses [29]. So, further studies are needed to assess the effect of PHGG on other intestinal receptors for comparison purposes.

Our results demonstrated that fresh weight of liver and duodenum did not differ between the groups, but PHGG and fructans had similar impact on the significant reduction of pH and in the significant increase in the cecal area compared to the control group ( $p \leq 0.001$ ), which would facilitate iron solubilization and absorption. Our study corroborated a study conducted by Freitas *et al.* [10] using inulin, oligofructose and *synergy* (inulin + oligofructose), in which liver and duodenum weights did not differ between the groups, but cecal pH was significantly lower in the groups fed with prebiotics, and cecal area increased ( $p \leq 0.001$ ) compared to the group not fed prebiotics.

Although these studies involved animals they can provide valuable information for humans that would be difficult to obtain in studies with human subjects due to practical and ethical reasons.

In general, studies [10,11,12,29,30] with different types, associations and concentrations of prebiotics did not observe any negative effect on iron absorption. In contrast with previous evidence, these soluble fibers increased Hb levels or at the very least did not limit iron absorption.

There is little information on the effect of PHGG on mineral absorption. Further studies are needed to clarify the effect of PHGG on other carriers responsible for iron absorption. Although mineral iron absorption by the colon is lower compared to the duodenum, further studies on the use of these fibers by humans may provide greater insight on the physiology of the gastrointestinal tract.

## 5. Conclusion

The data obtained in this study showed that despite the lower food intake by the PHGG group compared to the control group, there was no loss in weight gain and body growth of the animals. PHGG produced important changes in the cecum of anemic growing animals, as follows: reduction in luminal pH, increased cecal wall weight and greater ferroportin expression. There were no statistically significant differences between the groups regarding the weight of duodenal wall and liver, liver iron content and ferroportin expression in the duodenum and liver during the experiment. Our results

demonstrate the benefits of this prebiotic in the expression of proteins regulating iron absorption in the large intestine, facilitating iron uptake, preventing anemia, without impairing body growth.

### **Statement of Authorship**

KCF, LNBC and SAO drafted the manuscript. KCF and LNBC performed the literature review. LNBC, MSMV and DRHB collected data. JLRJ determined iron in liver samples and diets. PNM and PCBL performed Western Blotting analysis. KCF performed the statistical analysis and conceived the study. All authors revised and approved the final version of the manuscript.

### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

### **Acknowledgments**

We would like to thank *Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul* (FUNDECT), for financial support.

### **References**

1. Martins JM. Universal iron fortification of foods: the view of a hematologist. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2012;34(6):459-63.
2. World Health Organization (WHO). Micronutrient deficiencies: iron deficiency anaemia <http://www.who.int/nutrition/topics/ida/en/2015> [cited 2015 07 jan].
3. Lachi T, Reis CB. Frequency of anemia in the patients of a family health team in Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Anemia* 2011;(1):1-5.
4. Sazawal S, Dhingra U, Hiremath G, Sarkar A, Dhingra P, Dutta A, *et al.* Prebiotic and probiotic fortified milk in prevention of morbidities among children: community-based, randomized, double-blind, controlled trial. *PLoS One* 2010;5(8):e12164.

5. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Programa Nacional de Suplementação de Ferro: manual de condutas gerais. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.
6. World Health Organization. Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005 : WHO global database on anaemia. Geneva: WHO, 2008.
7. Tako E, Glahn RP, Welch RM, Lei X, Yasuda K, Miller DD. Dietary inulin affects the expression of intestinal enterocyte iron transporters, receptors and storage protein and alters the microbiota in the pig intestine. *Br J Nutr* 2008;99(3):472-80.
8. Yasuda K, Roneker KR, Miller DD, Welch RM, Lei XG. Supplemental dietary inulin affects the bioavailability of iron in corn and soybean meal to young pigs. *J Nutr* 2006;136(12):3033-8.
9. Pitarresi G, Tripodo G, Cavallaro G, Palumbo FS, Giammona G. Inulin-iron complexes: a potential treatment of iron deficiency anaemia. *Eur J Pharm Biopharm* 2008;68(2):267-76.
10. Freitas KC, Amancio OM, de Moraes MB. High-performance inulin and oligofructose prebiotics increase the intestinal absorption of iron in rats with iron deficiency anaemia during the growth phase. *Br J Nutr* 2012;108(6):1008-16.
11. Freitas KC, Amancio OM, Ferreira Novo N, Fagundes-Neto U, de Moraes MB. Partially hydrolyzed guar gum increases intestinal absorption of iron in growing rats with iron deficiency anemia. *Clin Nutr* 2006;25(5):851-8.
12. Marciano R, Santamarina AB, de Santana AA, Silva ML, Amancio OM, do Nascimento CM, *et al.* Effects of prebiotic supplementation on the expression of proteins regulating iron absorption in anaemic growing rats. *Br J Nutr* 2015;113(6):901-8.
13. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993;123(11):1939-51.
14. Institute of Medicine, Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements, Washington, D.C.IOM, 2006.

15. Kuo DC, Hsu SP, Chien CT. Partially hydrolyzed guar gum supplement reduces high-fat diet increased blood lipids and oxidative stress and ameliorates FeCl<sub>3</sub>-induced acute arterial injury in hamsters. *J Biomed Sci* 2009;16:15.
16. Yasukawa Z, Naito Y, Takagi T, Mizushima K, Tokunaga M, Ishihara N, *et al.* Partially hydrolyzed guar gum affects the expression of genes involved in host defense functions and cholesterol absorption in colonic mucosa of db/db male mice. *J Clin Biochem Nutr* 2012;51(1):33-8.
17. Takeuchi K, Bjarnason I, Laftah AH, Latunde-Dada GO, Simpson RJ, McKie AT. Expression of iron absorption genes in mouse large intestine. *Scand J Gastroenterol* 2005;40(2):169-77.
18. Scholz-Ahrens KE, Schrezenmeir J. Inulin and oligofructose and mineral metabolism: the evidence from animal trials. *J Nutr* 2007;137(11 Suppl):2513S-23S.
19. Sakai K, Ohta A, Shiga K, Takasaki M, Tokunaga T, Hara H. The cecum and dietary short-chain fructooligosaccharides are involved in preventing postgastrectomy anemia in rats. *J Nutr* 2000;130(6):1608-12.
20. Bosscher D, Van Caillie-Bertrand M, Deelstra H. Effect of thickening agents, based on soluble dietary fiber, on the availability of calcium, iron, and zinc from infant formulas. *Nutrition* 2001;17(7-8):614-8.
21. Bach Kristensen M, Tetens I, Alstrup Jørgensen AB, Dal Thomsen A, Milman N, Hels O, *et al.* A decrease in iron status in young healthy women after long-term daily consumption of the recommended intake of fibre-rich wheat bread. *Eur J Nutr* 2005;44(6):334-40.
22. Feltrin C, Batista de Moraes M, de Cássia Freitas K, Beninga de Moraes T, Fagundes Neto U, Silvério Amancio OM. Effect of soluble fiber pectin on growth and intestinal iron absorption in rats during recovery from iron deficiency anemia. *Biol Trace Elem Res* 2009;129(1-3):221-8.
23. Capriles VD, Arêas JAG. Frutanos do tipo inulina e aumento da absorção de cálcio: uma revisão sistemática. *Rev Nutr* 2012;25(1):147-59.
24. Lobo AR, Gaievski EH, De Carli E, Alvares EP, Colli C. Fructo-oligosaccharides and iron bioavailability in anaemic rats: the effects on iron species distribution,

- ferroportin-1 expression, crypt bifurcation and crypt cell proliferation in the caecum. *Br J Nutr* 2014;112(8):1286-95.
- 25.** Cançado RD, Muñoz M. Intravenous iron therapy: how far have we come? *Rev Bras Hematol Hemoter* 2011;33(6):461-9.
- 26.** Wang J, Pantopoulos K. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem J* 2011;434(3):365-81
- 27.** Grotto HZW. Fisiologia e metabolismo do ferro. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2010;32 supl. 2.
- 28.** Yasuda K, Dawson HD, Wasmuth EV, Roneker CA, Chen C, Urban JF, *et al.* Supplemental dietary inulin influences expression of iron and inflammation related genes in young pigs. *J Nutr* 2009;139(11):2018-23.
- 29.** Laparra JM, Díez-Municio M, Herrero M, Moreno FJ. Structural differences of prebiotic oligosaccharides influence their capability to enhance iron absorption in deficient rats. *Food Funct* 2014;5(10):2430-7.
- 30.** Weber TK, de Cássia Freitas K, Amancio OM, de Moraes MB. Effect of dietary fibre mixture on growth and intestinal iron absorption in rats recovering from iron deficiency anaemia. *Br J Nutr* 2010;104(10):1471-6.



## Tables and Figures:

**TABLE 1 – Composition of diet AIN93-G indicated for growing rats, modified by replacing 50g of cellulose and 50g of starch for 100g of partially hydrolyzed guar gum or corn starch (control diet) and a free iron mineral mix.**

Ingredients	Partially hydrolyzed guar gum (g/Kg)	Control (g/Kg)
PHGG <sup>A</sup>	100.000	0.000
Corn starch	479.486	579.486
Casein	200.000	200.000
Saccharose	100.000	100.000
Soybean oil	70.000	70.000
L-cystine	3.000	3.000
Choline bitartrate	2.500	2.500
T-butylhydroquinone	0.014	0.014
Vitamin mix <sup>B</sup>	10.000	10.000
Free iron mineral mix <sup>C</sup>	35.000	35.000
Cellulose	0.000	0.000

Composition of macronutrients in 100 g of product: A- Partially hydrolyzed guar gum (100g of Nutrisource Fiber<sup>®</sup>; 75g of PHGG): Carbohydrates 0g; proteins 0g; total fats 0g; dietary fiber, 75g; B- (Rhoster<sup>®</sup>): Composition in mg: nicotinic acid, 300; pantothenate, 160; pyridoxine, 70; thiamin, 60; riboflavin, 60; folic acid, 20; biotin, 2; vitamin K<sub>1</sub>, 7.5. Composition in µg: vitamin B<sub>12</sub>, 250. Composition in IU: vitamin A, 40.000; vitamin D<sub>3</sub>, 10.000; vitamin E, 750. C- (Rhoster<sup>®</sup>): Composition in g – essential minerals – calcium, 14,294; phosphorus, 4.461; potassium, 10.281; sulphur, 0.86; sodium, 2.938; chlorine, 4.49; magnesium, 1,448. Composition in mg: zinc, 86; manganese, 30; copper, 17.241; iodine, 0.593; molybdenum, 0.432; selenium, 0.428 – potentially beneficial minerals – silicon, 14.326; chrome, 2.865; fluorine, 2.872; nickel, 1.431; boron, 1.426; lithium, 0.285; vanadium, 0.287; iron free.

**TABLE 2 – Dietary intake, weight and Feed Efficiency Coefficient (FEC) in the different study periods of the animals in the Partially Hydrolyzed Guar Gum (PHGG) and control groups.**

Variables	Period	PHGG Group n=12	Control Group n=12	<i>p</i>
Dietary Intake (g)	Week 1	127.25 ± 15.05	143.67 ± 10.32	0.005
	Week 2	123.75 ± 16.39	140.75 ± 10.26	0.006
	Total	251.00 ± 28.00	284.42 ± 18.16	0.002
Body Weight (g)	Week 1	222.50 ± 28.40	228.20 ± 35.50	0.670
	Week 2	243.80 ± 27.10	248.80 ± 34.20	0.695
Body Length (cm)	Week 1	36.07 ± 1.54	36.06 ± 1.83	0.990
	Week 2	37.04 ± 1.55	37.47 ± 1.80	0.542
FEC	Week 1	0.35 ± 0.07	0.29 ± 0.04	0.025
	Week 2	0.17 ± 0.03	0.15 ± 0.03	0.147
	Total	0.26 ± 0.05	0.22 ± 0.04	0.026

n: Number of animals. PHGG: Partially Hydrolyzed Guar Gum. FEC: Feed Efficiency Coefficient. The values are means ± standard deviation (Student *t* test).

**TABLE 3 – Values for hemoglobin, hematocrit and hepatic iron levels of the animals of the Partially Hydrolyzed Guar Gum (PHGG) and control groups in the different study periods**

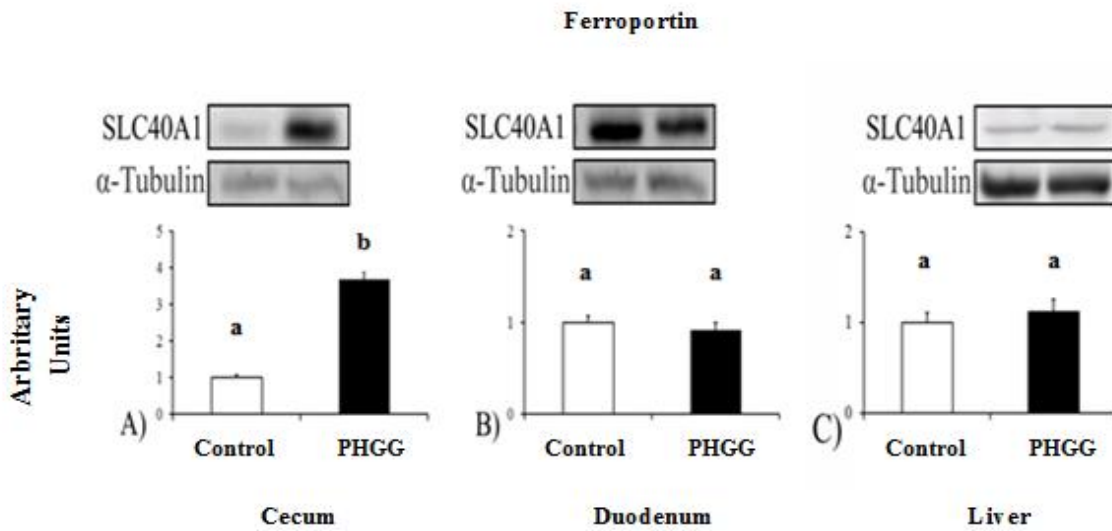
Variables	Period	PHGG Group n=12	Control Group n=12	<i>p</i>
Hemoglobin (g/dL)	Beginning	7.72 ± 1.29	7.69 ± 1.32	0.963 <sup>1</sup>
	Week 1	8.86 ± 1.50	8.42 ± 1.56	0.823 <sup>1</sup>
	Week 2	8.65 ± 1.57	8.63 ± 0.99	0.960 <sup>1</sup>
Hematocrit (%)	Beginning	23.84 ± 5.54	24.42 ± 4.33	0.780 <sup>1</sup>
	Week 1	25.83 ± 4.75	25.91 ± 4.68	0.969 <sup>1</sup>
	Week 2	27.70 ± 3.53	27.89 ± 4.04	0.903 <sup>1</sup>
Hepatic iron (µg/g)	Week 2	115.54 (98.34 –128.86)	116.89 (85.38 –191.79)	0.751 <sup>2</sup>

n: Number of animals. PHGG: Partially Hydrolyzed Guar Gum. <sup>1</sup>Teste *t* de Student (mean ± standard deviation). <sup>2</sup>Mann-Whitney test; median (percentile 25 and 75).

**TABLE 4 – Weight of duodenum and cecum and pH of cecal content in the animals of the Partially Hydrolyzed Guar Gum (PHGG) and control groups**

Variables	PHGG Group n=12		Control Group n=12	<i>p</i>
Duodenum (g)	0.40 ± 0.09		0.34 ± 0.08	0.139
Cecal wall (g)	1.70 ± 0.25	0.80 ± 0.21		≤0.001
pH of cecal content	5.90 ± 0.57	7.10 ± 0.48		≤0.001

n: Number of animals. PHGG: Partially Hydrolyzed Guar Gum. The values are means ± standard deviation (Student *t* test).



**Figure 1:** Ferroportin expression. In the cecum, duodenum and liver of anemic growing rats of the control and PHGG groups. The protein level was determined by Western blotting and normalized with  $\alpha$ -tubulin. The values are means ( $n=8$ ), with standard deviation represented by vertical bars. Different letters represent statistically significant differences ( $p \leq 0.001$ ).

## 5.2. Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal

---



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

---

### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Dourados-MS, 9 de maio de 2013

Senhora Pesquisadora:

**Silvia Aparecida Oesterreich**

O Projeto de sua responsabilidade – Protocolo nº. **008/2013** – **CEUA/UFGD** - intitulado **“Efeito dos prebióticos *goma guar* hidrolisada e oligofrutose sobre a expressão de transportadores de ferro no intestino de ratos”** foi integralmente **APROVADO** e poderá ser conduzido.

Ressaltamos que é de responsabilidade do (a) pesquisador (a) envio de notificação à CEUA sobre o término do projeto.

Felipe de Almeida Borges  
Secretário CEUA/UFGD

*Felipe de Almeida Borges*  
Assistente em Administração  
SIAPE - 1669836