

Faculdades Integradas de Patos
 Curso de Medicina
 v. 3, n. 3, jul./set. 2018, p. 1036-1043.
 ISSN: 2448-1394



EFEITO DA HEMOCROMATOSE NO PERFIL LIPÍDICO, HEPÁTICO E GLICÊMICO EM RATOS DA LINHAGEM WISTAR

EFFECT OF HEMOCROMATOSIS IN LIPIDIC, HEPATIC AND GLYCEMIC PROFILE IN WISTAR RATS

Maria Margareth Camara de Almeida
 Faculdades Integradas de Patos – FIP – Patos – Paraíba - Brasil
megacamara@yahoo.com.br

Bruno de Medeiros Moreno
 Faculdades Integradas de Patos – FIP – Patos – Paraíba - Brasil
bruno.biomed8@gmail.com

Gustavo Henrique Oliveira Cavalcante
 Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN – Natal – Rio Grande do Norte - Brasil
gugahenrique@gmail.com

RESUMO

Objetivo: O presente estudo teve como objetivo induzir a hemocromatose em ratos Wistar através de sulfato ferroso via oral e avaliar o perfil lipídico, glicêmico e hepático, com o intuito de observar o aumento da glicemia juntamente com o colesterol e suas frações e as transaminases.

Métodos: O trabalho foi um estudo experimental utilizando ratos wistar, a doença foi induzida através de sulfato ferroso via oral em doses crescentes. Foram realizadas análises bioquímicas, incluindo o colesterol total, triglicerídeos, HDL, LDL, TGO e TGP.

Resultados: foram encontrados alterações nos parâmetros glicêmicos no qual todos os grupos tiveram alterações com um maior aumento no G6. Já no parâmetro lipídico foram obtidos resultados abaixo da média, onde do G2 ao G6 tiveram uma diminuição notória. Já os parâmetros hepáticos tiveram uma elevação significativa do G2 ao G6.

Conclusões: A hemocromatose é uma doença caracterizada pelo excesso de ferro no organismo, a indução da doença pelo sulfato ferroso resultou em vários parâmetros bioquímicos alterados, mostrando que até mesmo o sulfato ferroso pode ser capaz de induzir essa doença e causar várias complicações.

Palavras-Chave: Hemocromatose. Perfil lipídico. Perfil glicêmico. Ratos wistar. Perfil hepático.

ABSTRACT

Objective The present study aimed to induce hemochromatosis in Wistar rats by ferrous sulfate via oral and to evaluate the lipid, glycemic and hepatic profile, in order to observe the increase of glycemia along with cholesterol and its fractions and transaminases.

Methods: The work was an experimental study using Wistar rats, the disease was induced by oral ferrous sulfate in increasing doses. Biochemical analyzes were performed, including total cholesterol, triglycerides, HDL, LDL, GOT/AST and GPT/ALT.

Results: Changes in glyceimic parameters were found, in which all groups had changes with a higher increase in G6. In the lipid parameter, results below the mean were obtained, where G2 to G6 had a noticeable decrease. In contrast, the hepatic parameters had a significant elevation of G2 to G6.

Conclusions: Hemochromatosis is a disease characterized by excess of iron in the body, the induction of the disease by ferrous sulfate resulted in several altered biochemical parameters, showing that even ferrous sulfate may be able to induce this disease and cause various complications

Keywords: Hemochromatosis. Lipid profile. Glyceimic profile. Wistar rats. Hepatic Profile.

1. Introdução

O ferro é um importante íon que atua na biotransformação e formação da estrutura de proteínas na célula. Muitas proteínas podem ser citadas, como HFE, que age regulando o metabolismo do ferro¹.

Muitas vezes, uma mutação no gene HFE cria um distúrbio e um aumento impróprio da absorção de ferro no intestino. Em consequência disso, o ferro é acumulado progressivamente nos tecidos e órgãos, principalmente articulações, pele, fígado, baço, pâncreas e coração, resultando em uma doença de caráter autossômica recessiva conhecida como Hemocromatose^{2,3}.

A hemocromatose hereditária (HH) é uma doença de caráter autossômico recessivo que se desenvolve em indivíduos heterozigóticos, caracterizada pelo aumento da quantidade de ferro no organismo e acúmulo nos tecidos, ocasionando em lesão tecidual e até mesmo em morte, acometendo um em cada dez indivíduos de origem céltica ou descendentes europeus⁴.

A hemocromatose pode se manifestar de duas formas. A primeira é quando há uma mutação gênica desencadeando o acúmulo progressivo do ferro, e a segunda forma é a adquirida, quando provocada por doenças ou fatores ambientais^{5,6}.

Até mesmo um pequeno acúmulo de ferro pode intensificar a resistência à insulina, diabetes e aterosclerose^{7,8}. A desordem conseqüente do ferro, glicose e metabolismo de lipídios associados à hiperferritinemia cria essa condição de resistência à insulina⁹. Níveis altos de ferritina também se associam com obesidade central e dislipidemias^{10,11}.

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo induzir a hemocromatose em ratos Wistar para avaliar o perfil lipídico e glicêmico, através de exames bioquímicos com o intuito de observar o aumento da glicemia juntamente com o colesterol e suas frações e as transaminases.

2. Métodos

O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) e segue os preceitos éticos e as diretrizes nacionais e internacionais para a utilização de animais de laboratório. A presente pesquisa foi realizada em um período de 30 dias.

Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) machos Wistar jovens, padrão sanitário com idade inicial de 60 dias e peso variando de 175 g a 295 g, provenientes do Núcleo de Pesquisa Experimental (NUPE) das Faculdades Integradas de Patos (FIP). Para indução da Hemocromatose, utilizou-se 5 animais por grupo totalizando 30 ratos, considerando um grupo controle e cinco experimentais.

Alojamento e Manutenção

Os animais foram alojados coletivamente em grupos de cinco ratos por gaiola, em uma sala de quarentena destinada à experimentação de roedores, onde permaneceram por todo o período de estudo. As gaiolas foram colocadas em ordem do grupo um ao seis nas estantes e suas posições se mantiveram constantes, após o procedimento com os animais. Foram utilizadas gaiolas constituídas de polipropileno, de dimensões de 340 mm de largura x 490 mm de comprimento x 160 de altura, com tampa gradeada em aço inox e comedouro embutido em "V", contendo aproximadamente 3 cm de maravalha *Pinus* sp. previamente autoclavada. As gaiolas foram trocadas a cada dois dias. Os animais alimentados com ração comercial purina e receberam água *ad libitum* durante todo o período experimental. O fotoperíodo (12 horas claro e 12 horas escuro) foi obtido através da utilização de um aparelho "timer". A temperatura e a umidade foi medida um termo-higrômetro.

Indução da Hemocromatose

A doença foi induzida através de administração de sulfato ferroso por via oral. Cada grupo recebeu uma dosagem diferente, onde cada gota possui 2,5 mg de ferro elementar, a fim de que fossem experimentadas concentrações mais baixas até concentrações maiores. Esta metodologia foi usada para a obtenção de concentrações elevadas de ferro sérico através de ferro medicamentoso de uma forma que ainda não havia sido descrita na literatura, a fim de verificar possíveis efeitos da administração oral.

Grupo Experimental

Os animais do grupo dois (G2) ao grupo seis (G6) receberam doses de sulfato ferroso, cada grupo teve uma dosagem diferente onde o G2 recebeu por via oral utilizando uma agulha de gavagem 3 gotas, equivalente a 7,5 mg de ferro elementar, G3 administração de 5 gotas equivalente a 12,5 mg de ferro elementar, G4 administração de 7 gotas equivalente a 17,5 mg de ferro elementar, G5 administração de 9 gotas equivalente a 22,5 mg de ferro elementar e G6 administração de 11 gotas equivalente a 27,5 mg de ferro elementar. O grupo controle (G1) não recebeu doses do medicamento, mas foi submetido ao mesmo tipo de estresse que os demais grupos, com administração de água.

Coleta, processamento e análise das amostras

Ao final do período de experimentação de todos os grupos, os ratos foram anestesiados com associação de xilazina 15mg/kg e ketamina 30 mg/kg por via intraperitoneal. O sangue foi coletado com seringas de 5 ml através de punção cardíaca. Os procedimentos citados foram realizados individualmente em local isolado, para evitar estresse e luto dos demais animais. Foi realizado jejum prévio de 4 horas.

Parâmetros bioquímicos

Tubos secos de 4 ml foram utilizados para a realização da maioria das análises bioquímicas, incluindo o colesterol total, triglicérides, HDL, LDL, TGO e TGP. Para a determinação da concentração de glicose, após 20 dias foi feita uma coleta na cauda de cada animal e dosado com um glicosímetro (ONETOUCH Select Plus Flex®). As amostras sem anticoagulante foram deixadas em repouso por cerca de 30 minutos em temperatura ambiente previamente a centrifugação até a retenção completa do coágulo. Para a obtenção do soro e plasma as amostras foram centrifugadas a 2500 RPM durante 10 minutos.

As análises foram realizadas por espectrofotometria, utilizando kits comerciais da Labtest, seguindo as recomendações do fabricante, em aparelho semiautomático e automático.

3. Resultados e Discussão

Durante o tratamento, não foram observados sinais clínicos de toxicidade aguda ao ferro e nenhum óbito foi registrado. O tratamento de 30 dias com ferro elementar mostrou aumento da glicemia e parâmetros hepáticos e diminuição no perfil lipídico quando comparados ao controle. Na tabela 1 estão listados os valores do perfil lipídico, glicêmico, aspartato aminotransferase (AST ou TGO), alanina aminotransferase (ALT ou TGP), associados à hemocromatose adquirida induzida por sulfato ferroso.

Tabela 1 - Valores da média de parâmetros bioquímicos associados à hemocromatose adquirida.

PARÂMETROS	REFERÊNCIA	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Glicose (mg/dL)	100	88	85	84	86	77	116
Colesterol (mg/dL)	190	152	56	66	60	53	57
Triglicérides (mg/dL)	150	117	105	106	74	69	77
HDL (mg/dL)	40	53	47	52	59	47	51
LDL (mg/dL)	100	72	11	12	13	7	9
VLDL (mg/dL)	30	23	21	17	15	8	15
TGO (UI/L)	40	67	189	181	204	182	134
TGP (UI/L)	56	51	129	132	119	112	123

Fonte: Próprio autor

Observa-se na tabela um aumento da glicose 24% do G6 acima da média de glicose para o G1 e discretamente acima dos valores de referência os quais receberam uma maior dosagem de sulfato ferroso, mostrando uma relação de risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2, confirmando o que é preconizado na literatura. Segundo estudos realizados, esse fato dá-se por meio de mecanismo do acúmulo de ferro nas células β do pâncreas levando a sua destruição por apoptose, aumentando a glicemia plasmática e diminuindo a sua capacidade excretora de insulina¹².

Com relação ao perfil lipídico, os resultados obtidos demonstraram uma diminuição de 62% do colesterol total do G1 quando comparados ao G6. Essa diminuição também foi seguida do triglicérides (34%) e colesterol LDL(87%). Um estudo realizado por Ali-rahmani *et al.*, associa essa diminuição como causa principal de complicações neurológicas, dentre elas o surgimento de Alzheimer¹³. A hipótese dessa pesquisa foi baseada na mutação H63D do gene HFE, que inibe o metabolismo do colesterol contribuindo para a degeneração neurológica e déficit de memória. Essa mesma pesquisa ressaltou que até mesmo os ratos mais velhos tiveram uma diminuição significativa de colesterol. Tendo em vista que, a presente pesquisa revelou uma correlação com a redução do colesterol com acometimento da hemocromatose adquirida. O fato de o presente trabalho apresentar diminuição do colesterol em ratos com acúmulo de ferro de forma adquirida sem relação com a mutação citada acima, pode acender para um novo caminho que explique a diminuição do colesterol que necessite ser devidamente esclarecido em pesquisas posteriores.

O fígado é o principal sítio de armazenamento do ferro. Estudos relatam que aproximadamente 90% do excesso férrico está depositado nesse órgão. E a ausência de um diagnóstico precoce e tratamento adequado, podem levar um quadro de lesão tecidual e disfunção fisiológica do mesmo¹⁴. Essa problemática pode ser comprovada através de testes bioquímicos, tais como TGO e TGP.

Os níveis de TGO e TGP foram significativamente elevados no G6 sendo TGO 50% de aumento para o G6 e TGP 58% confirmando o surgimento de dano hepático ocasionado pelo excesso de ferro, onde muitos estudos vinculam a hemacromatose a diversas complicações, sendo a cirrose e carcinoma hepatocelular as mais severas¹⁵.

Cançado e Chiattonne (2010) ressaltam que, aproximadamente 95% dos casos que apresentam sintomas possuem hepatomegalia, que influenciam nas alterações nos testes de função hepática¹⁶. Além disso, advertem, que a taxa de mortalidade esta envolvida com os casos de cirrose e carcinoma hepatocelular, pelo qual o paciente com hemocromatose quando comparados com a população em geral apresenta um risco de 200 vezes maior e o tratamento para a sobrecarga de ferro não é eficaz para a erradicação do tumor.

A tabela 2 demonstra os pesos dos animais do G1 ao G6, nos 30 dias de experimento.

Tabela 2: Média da evolução dos pesos dos animais por grupo

GRUPOS	19/09	26/09	03/10	18/10
G1	244	240	236	210
G2	222	241	221	212
G3	230	235	214	223
G4	229	229	215	226
G5	223	225	215	233
G6	204	216	205	204

Fonte: Próprio autor

Não foi observada alteração significativa em relação aos pesos dos animais nos grupos estudados.

4. Conclusão

O presente trabalho mostra que a hemocromatose é uma doença complexa e que pode acarretar varias complicações ao organismo, tanto sua forma hereditária quanto adquirida podem ocasionar grandes riscos a saúde, a prática de suplementação de ferro medicamentoso é muito comum nos dias de hoje, visto que os alimentos já possuem bastante ferro. Ratos Wistar que receberam doses maiores do medicamento apresentaram várias alterações bioquímicas.

Vários parâmetros bioquímicos foram analisados, dentre eles o perfil lipídico, perfil glicêmico e as transaminases, no qual foi o perfil que mais foi alterado dentre os grupos experimentais. O perfil lipídico também teve alterações significativas de acordo com o grupo controle, tendo uma baixa em todo o perfil.

A glicemia teve uma elevação notória no grupo G6 em relação aos demais grupos, resultado esse, devido à maior dose de sulfato ferroso dentre todos os grupos. O peso dos animais não teve alterações significativas. A indução da hemocromatose em ratos Wistar através do sulfato ferroso resultou na alteração de vários parâmetros bioquímicos.

Referências

1. Swinkels DW, Janssen MC, Bergmans J, Marx JJ. Hereditary hemochromatosis: genetic complexity and new diagnostic approaches. *Clinical chemistry*,2006;52(6): 950-968.
2. Fix OK, Kowdley KV. Hereditary hemochromatosis. *Minerva medica*,2008;99(6):605-617.
3. Pietrangelo A. Inherited metabolic disease of the liver. *Current opinion in gastroenterology*, 2009;25(3):209-214.
4. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis—a new look at an old disease. *New England Journal of Medicine*,2004; 350(23): 2383-2397.
5. Leitman SF. Hemochromatosis: the new blood donor. *ASH Education Program Book*,2013;(1):645-650.
6. Bourscheit F, Biavatti K, Silveiro SP, Rodrigues TDC. Hemocromatose e Diabeter Melito: relato de caso e revisão da literatura. *Revista HCPA*. 2008;28(3):194-199.
7. Kim CH, Kim HK, Bae SJ, Park JY, Lee KU. Association of elevated serum ferritin concentration with insulin resistance and impaired glucose metabolism in Korean men and women. *Metabolism*,2001;60(3):414-420.
8. Minqin R, Rajendran R, Pan N, Tan BKH, Ong WY, Watt F et al. The iron chelator desferrioxamine inhibits atherosclerotic lesion development and decreases lesion iron concentrations in the cholesterol-fed rabbit. *Free Radical Biology and Medicine*,2005;38(9):1206-1211.

9. Fargion S, Mattioli M, Fracanzani AL, Sampietro M, Tavazzi D, Fociani P et al. Hyperferritinemia, iron overload, and multiple metabolic alterations identify patients at risk for nonalcoholic steatohepatitis. *The American journal of gastroenterology*, 2001;96(8):2448.
10. Gillum RF. Association of serum ferritin and indices of body fat distribution and obesity in Mexican American men—the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *International journal of obesity*, 2001;25(5):639.
11. Williams MJ, Poulton R, Williams S. Relationship of serum ferritin with cardiovascular risk factors and inflammation in young men and women. *Atherosclerosis*, 2002;165(1):179-184.
12. Domingues CS. Diabetes Mellitus no contexto de Hemocromatose. Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto; 2017.
13. Ali-Rahmani F, Grigson PS, Lee S, Neely E, Connor JR, Schengrund CL. H63D mutation in hemochromatosis alters cholesterol metabolism and induces memory impairment. *Neurobiology of aging*, 2014;35(6), 1511-e1.
14. Aguiar KM, Colares TDS, Xavier ARO, Xavier MAS. Mutações genéticas, métodos diagnósticos e terapêuticas relacionadas à hemocromatose hereditária. *Biotemas*, 2014;27(1):133-142.
15. Wahlbrink D, Rempel C, Moreschi C, Rodrigues JBP. Características da hemocromatose: uma revisão narrativa. *Saúde Santa Maria*, 2016;(suppl):25-36.
16. Cañado RD, Chiattoni CS. Visão atual da hemocromatose hereditária. *Rev Bras Hematol Hemoter*, 2010;32(6):469-75.