



Universidade Federal de Ouro Preto
Escola de Nutrição
Programa de Pós-graduação em Saúde e Nutrição
Laboratório de Bioquímica Metabólica e
Laboratório de Nutrição Experimental



**Efeitos da Suplementação com Ferro Injetável sobre a
Produção de ERO por Granulócitos e Danos Oxidativos em
Tecidos Cardíaco e Pancreático de Ratos Diabéticos**

Ouro Preto
Março - 2012



Universidade Federal de Ouro Preto
Escola de Nutrição
Programa de Pós-graduação em Saúde e Nutrição
Laboratório de Bioquímica Metabólica
Laboratório de Nutrição Experimental



**Efeitos da Suplementação com Ferro Injetável sobre a
Produção de ERO por Granulócitos e Danos Oxidativos em
Tecidos Cardíaco e Pancreático de Ratos Diabéticos**

*Dissertação apresentada ao
programa de Pós-Graduação em
Saúde e Nutrição da Universidade
Federal de Ouro Preto, como parte
integrante dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre.*

Ouro Preto
Março - 2012



Universidade Federal de Ouro Preto
Escola de Nutrição
Programa de Pós-graduação em Saúde e Nutrição
Laboratório de Bioquímica Metabólica
Laboratório de Nutrição Experimental



**Efeitos da suplementação com ferro injetável sobre a produção de ERO
por granulócitos e danos oxidativos em tecidos cardíaco e pancreático de
ratos diabéticos**

Ana Flávia Santos Sampaio

Orientadora

Professora Doutora Maria Lúcia Pedrosa

Co-orientador

Professor Doutor Marcelo Eustáquio Silva

S192e

Sampaio, Ana Flávia Santos.

Efeitos da suplementação com ferro injetável sobre a produção de ERO por granulócitos e danos oxidativos em tecidos cardíaco e pancreático de ratos diabéticos [manuscrito] / Ana Flávia Santos Sampaio - 2012.

xx, 96 f.: il. color.; graf.; tabs.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Maria Lúcia Pedrosa.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição.

Área de concentração: Bioquímica e Fisiopatologia da Nutrição

1. Diabetes - Teses. 2. Ferro no organismo - Teses. 3. Antioxidantes - Teses. 4. Espécies reativas de oxigênio (ERO) - Teses. 5. Coração - Teses. 6. Pâncreas - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 612.392.4:616.379-008.64

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos 22 dias do mês de março de 2012, às 15h30min no Auditório da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, realizou-se a defesa da dissertação de mestrado da aluna Ana Flávia Santos Sampaio. A banca examinadora definida anteriormente foi composta pelos professores doutores Rinaldo Cardoso dos Santos (UFOP), Renata Nascimento de Freitas (UFOP) e Maria Lúcia Pedrosa (UFOP). Dando início ao exame a aluna apresentou sua dissertação de mestrado intitulada: "EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM FERRO INJETÁVEL SOBRE A PRODUÇÃO DE ERO POR GRANULÓCITOS E DANOS OXIDATIVOS EM TECIDOS CARDÍACO E PANCREÁTICO DE RATOS DIABÉTICOS". Após a apresentação a candidata foi arguida pela banca que avaliou o domínio do conteúdo metodológico e teórico relacionado ao projeto de dissertação da candidata. Após julgamento os membros da banca decidiram por **Aprovar** a aluna.


Prof. Dr. Rinaldo Cardoso dos Santos
Examinador Externo (UFOP)


Prof. Dra. Renata Nascimento de Freitas
Examinadora Interno (UFOP)


Prof. Dra. Maria Lúcia Pedrosa
Orientadora (UFOP)

Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Bioquímica Metabólica** e no **Laboratório de Nutrição Experimental** do Programa de Pós-graduação em Saúde e Nutrição da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, com o auxílio financeiro da *CAPES, FAPEMIG e UFOP*.

Dedico este trabalho aos meus pais,
Geraldo e Lydia, pelo amor incondicional e
exemplo de perseverança

Aos professores **Maria Lúcia Pedrosa e
Marcelo Eustáquio Silva**, meus orientadores,
pela paciência, pela competência e pela amizade.

A **Deus** e a **Nossa Senhora**, pelo dom da vida e pela oportunidade de mais essa vitória.

A meus irmãos, **Cristiano e Geraldo**, pelo amor e amizade em todos os momentos.

A **Wellington** pelo carinho, companheirismo e paciência.

Aos Professores **Daniela Caldeira Costa** e **Wanderson Geraldo de Lima** pela dedicação e disponibilidade com que sempre me atenderam.

A todos os colegas do Laboratório de Bioquímica Metabólica e Laboratório de Nutrição Experimental, **Aline, Bianca, Bruno, Cintia, Danielle, Emerson, Glaucy, Isabel, Joamyr, Joyce, Kely, Lorena, Melina, Natália, Poliane, Rogério, Sandra, Simone e Waleska** pela ajuda, incentivo e companheirismo. Obrigada pela atenção prestada nos momentos difíceis.

A **Jair Pastor** e a **Clodoaldo**, muito obrigada pela disponibilidade e amizade.

“Ter fé é assinar uma folha em branco e deixar
que Deus nela escreva o que quiser.”
(Santo Agostinho)

Resumo

A hiperglicemia não tratada em pacientes diabéticos intensifica um quadro de estresse oxidativo. O ferro é metal de transição e, quando em excesso, participa de vias metabólicas que favorecem danos oxidativos através da formação de espécies reativas de oxigênio (EROS). Este estudo avalia os efeitos da interação do diabetes com uma formulação de ferro injetável (Ferro Dextran) sobre balanço oxidante/antioxidante e alterações histológicas em tecidos cardíaco e pancreático. Ratos Fischer ($n = 96$), pesando aproximadamente 200g, foram divididos em quatro grupos: Controle (C) Controle ferro (CF), que recebeu injeções de ferro dextran por via intraperitoneal, Diabetes (D), que recebeu uma dose de streptozotocina (STZ) e Diabetes Ferro (DF) que recebeu uma dose de STZ e injeções de Ferro Dextran. Induziu-se o diabetes com 35mg/Kg de STZ no primeiro dia de experimento e obteve-se a suplementação de ferro com a administração intraperitoneal de quatro doses de 0,1ml de Ferro Dextran (100g Fe^{2+}/l) em intervalos de cinco dias para cada dose. Resultados mostraram alterações nos níveis glicêmicos e nos de ferro tecidual no coração e no pâncreas dos grupos tratados com STZ e ferro, respectivamente. Houve um aumento na geração de EROS, por neutrófilos para os grupos CF, D e DF em relação ao grupo C ($191,3 \pm 41,19$ RLU/30min) com valores de $363,30 \pm 130,20$; $552,80 \pm 103,30$; $1566,00 \pm 386,90$ RLU/30min, respectivamente. No coração, os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) não apresentaram diferenças; os de Proteína Carbonilada foram aumentados nos ratos do grupo DF em comparação com o C. No pâncreas, os níveis de TBARS aumentaram para os ratos diabéticos e os de Proteína Carbonilada aumentaram para os grupos CF, D e DF em relação ao grupo C ($16,62 \pm 1,76$ U/mL/ mg proteína) com valores de $27,61 \pm 10,53$; $30,96 \pm 8,29$; $52,38 \pm 12,34$ U/mL/ mg proteína. Não se observaram alterações nos níveis de Glutathiona Total, Superóxido Dismutase e Catalase em nenhum dos dois órgãos. Além disso, no diabetes ocorre um maior depósito de ferro sugerindo uma alteração no processo de captação desse metal.

Abstract

The non-treated hyperglycaemia on Diabetic patients has intensified scenery of oxidative stress. Iron is transition metal and, if in excess, takes place in metabolic ways, which helps the oxidative damages through the formation of reactive species of oxygen (RSO). This research has evaluated the effects of Diabetes with one iron injectable formula (Iron Dextran) on the oxidant/antioxidant balance in cardiac and pancreatic tissues. Fischer Mice ($n = 96$), weighting about 200g, were divided into four groups: Control (C), Iron Control (IC), that received injections of iron dextran through intraperitoneal way, Diabetes (D), that received one dose of streptozotocine (STZ), and Diabetes Iron (DI), that received one dose of streptozotocine and injections of Iron Dextran. The condition was induced with 35mg/Kg of STZ at the first day of the experience and the iron supplementation was gotten with the intraperitoneal administration of four with 0,1ml of Iron Dextran (100g Fe²⁺/l), among intervals at the five days to each dose. Results show alterations in the glucemial levels and in those ones of residual iron in the heart and in the pancreas from the treated groups with STZ and iron, respectively. There was some increasing on RSO generation, by neutrophils to the groups IC, D e DI in relation to the group C (191,3 ± 41,19 RLU/30min) with values of 363,30 ± 130,20; 552,80 ± 103,30; 1566,00 ± 386,90 RLU/30min, respectively. In the heart, the levels of reactive substances to the thyobarbituric acid (TBARS) haven't shown differences; those ones of Carboniled Protein were increases in mices from the group DI if compared with the group C. In the pancreas, the TBARS levels were increased to the groups CI, D e DI in relation to the group C (16,62 ± 1,76 U/mL/ mg protein) with values of 27,61 ± 10,53; 30,96 ± 8,29; 52,38 ± 12,34 U/mL/ mg protein. Alterations in the levels of Total Glutathione, Superoxide Dismutase, and Catalase were not observed in no of the two organs. Furthermore, diabetes results in a higher iron storage suggesting a change in the process of uptake of the metal.

Lista de Figuras

- Figura 1:** Mecanismos propostos para explicar o dano celular induzido pela hiperglicemia e o estresse oxidativo como via final comum das quatro vias metabólicas ativadas. O excesso de radical superóxido (O₂⁻) inibe parcialmente o GAPDH, uma enzima da via glicolítica, o que resulta aumento dos metabólitos formados antes da ação do GAPDH. Adaptado de Correa-Giannella e Vieira (2007).....**27**
- Figura 2:** Papel de EROS na progressão da disfunção das células-β no pâncreas. EROS são provocadas pela hiperglicemia e / ou hiperlipidemia em condições diabéticas, o que leva a ativação da via JNK no pâncreas. EROS e subsequente ativação da via JNK induzem a translocação do PDX-1, que leva à redução do PDX-1 e a biossíntese e secreção da insulina. Adaptado de Kaneto et al. (2010).....**31**
- Figura 3:** Linha cronológica dos experimentos considerando a aplicação das injeções de STZ e ferro dextran.....**42**
- Figura 4:** Delineamento amostral dos experimentos de ratos que receberam dieta padrão (AIN93M), ferro dextran (CF e DF) e STZ (D e DF) no início do experimento, após três dias da aplicação de STZ e no final de experimento.....**44**
- Figura 5:** Efeito do peso corporal final no primeiro experimento.....**51**
- Figura 6:** Efeito do tratamento com ferro dextran sobre a glicemia de ratos controle e diabéticos.....**52**
- Figura 7:** Níveis de frutossamina de ratos controle e diabéticos tratados com ferro dextran.....**52**

Figura 8: Níveis de insulina de ratos controles e diabéticos tratados com ferro dextran.....	53
Figura 9: Produção de EROS, por granulócitos, de ratos controle e diabéticos tratados com ferro dextran.....	55
Figura 10: Peso final, do coração, de ratos controle e diabéticos tratados com ferro dextran.....	56
Figura 11: Determinação bioquímica dos níveis de ferro em coração de ratos controle e diabéticos tratados com ferro dextran.....	56
Figura 12: Fotomicrografias de cortes histológicos do coração. Coloração de Perls.....	57
Figura 13: Fotomicrografias de cortes histológicos do coração. Hematoxilina e Eosina.....	58
Figura 14: Fotomicrografias de cortes histológicos do coração. Picrosírius - Hematoxilina.....	59
Figura 15: Níveis de TBARS, no coração, de ratos controle e diabéticos tratados com ferro dextran.....	60
Figura 16: Níveis de proteína carbonilada, no coração, de ratos controle e diabéticos tratados com ferro dextran.....	60
Figura 17: Peso final, do pâncreas, de ratos controle e diabéticos tratados com ferro dextran.....	62

Figura 18: Níveis de ferro tecidual, em pâncreas, de ratos controles e diabéticos tratados com ferro dextran.....	62
Figura 19: Fotomicrografias de cortes histológicos no pâncreas. Coloração de Perls.	63
Figura 20: Fotomicrografias de cortes histológicos no pâncreas. Hematoxilina e Eosina.....	64
Figura 21: Fotomicrografias de cortes histológicos no pâncreas. Picrosírius – Hematoxilina.....	65
Figura 22: Níveis de TBARS, no pâncreas, de ratos controle e diabéticos tratados com ferro dextran.....	66
Figura 23: Avaliação dos níveis de Proteína Carbonilada, no pâncreas, de ratos controles e diabéticos tratados com ferro dextran.....	67

Lista de Tabelas

Tabela 1: Dieta AIN modificada* (g/1000g de dieta).....	42
Tabela 2: Avaliação dos níveis de Ferro Sérico, Capacidade Total de Ligação do Ferro (CTLF), Transferrina, Índice de Saturação de Transferrina (IST %), Capacidade Latente de Ligação de Ferro (CLLF) e Ferro no Fígado de ratos.....	54
Tabela 3: Avaliação dos níveis de Glutathione Total, Catalase e Superóxido Dismutase em coração de ratos controle e diabéticos.....	61
Tabela 4: Avaliação dos níveis de Glutathione Total, Catalase e Superóxido Dismutase empâncreas de ratos controle e diabéticos.....	67

Lista de Abreviaturas

AGEs – produtos de glicação avançada;
C – grupo controle;
CAT – catalase;
CF – grupo controle ferro;
CLLF - Capacidade Latente de Ligação do Ferro
CTLF - Capacidade Total de Ligação do Ferro
D – grupo diabetes;
DAG – diacilglicerol;
DF – grupo diabetes ferro;
EROS – espécies reativas de oxigênio;
HDL - Lipoproteína de alta densidade;
IL-1 – interleucina 1;
IP3 – inositoltrifosfato;
IST% - Índice de saturação de transferrina;
JNK – c-Jun Nterminal Kinase;
NO – óxido nítrico;
PDX-1 – fator pancreático duodenal;
PKC – proteína kinase C;
PPAR- α - receptores ativadores da proliferação de peroxissomos;
RAGE – receptores dos produtos de glicação avançada;
SOD – superóxido dismutase;
STZ – streptozotocina;
TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico;
TGF- β – fator transformante de crescimento beta;
TRF-1 – receptor de transferrina
VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

Sumário

1– INTRODUÇÃO.....	21
2 – REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1 – Diabetes e Estresse Oxidativo.....	24
2.2 – Diabetes e Tecido Cardíaco.....	28
2.3 – Diabetes e Tecido Pancreático.....	29
2.4 – Ferro.....	32
2.5 – Ferro e Espécies Reativas do Oxigênio.....	35
2.6 – Ferro e Diabetes.....	38
2.6.1 – Estudos Epidemiológicos.....	38
2.6.2 – Estudos Experimentais.....	38
3 – OBJETIVOS.....	40
3.1 – Objetivos Específicos.....	40
4 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1 – Animais e Divisão de Grupos.....	41
4.2 – Dieta.....	42
4.3 – Reagentes e Dosagens Bioquímicas.....	43

4.4 – Indução de Diabetes.....	43
4.5 – Indução de Sobrecarga de Ferro.....	44
4.6 – Coleta de Sangue e Tecido.....	45
4.7 – Isolamento de Leucócitos Polimorfonucleares.....	45
4.7.1- Ensaio de quimioluminescência.....	45
4.8 – Determinação de Insulina Sérica.....	46
4.9 – Determinação de Ferro Tecidual.....	46
4.10 – Determinação de Proteínas Totais.....	47
4.11 – Dosagem dos Biomarcadores do Estresse Oxidativo.....	47
4.11.1 – Determinação de Proteína Carbonilada.....	47
4.11.2 – Determinação de TBARS.....	48
4.12 – Dosagem dos Biomarcadores Antioxidantes.....	48
4.12.1 – Catalase.....	48
4.12.2 – Glutationa Total.....	48
4.12.3 – Superóxido Dismutase.....	49
4.13 – Análises Histológicas.....	49
4.14 – Análises Estatísticas.....	50

5 – RESULTADOS.....	51
5.1 – Peso Corporal Final e Níveis Plasmáticos de Glicose, Frutosamina, e Insulina em Ratos Controles e Diabéticos	51
5.1.1 – Peso Corporal Final.....	51
5.1.2 – Glicemia Final.....	51
5.1.3 – Níveis de Frutosamina.....	52.
5.1.4 – Níveis de Insulina.....	53
5.2 - Níveis de Ferro Sérico, Capacidade Latente de Ligação de Ferro, Capacidade Total de Ligação de Ferro, Transferrina, Índice de Saturação de Transferrina e Ferro Tecidual (no Fígado) de Ratos Controle e Diabéticos Submetidos ao Tratamento com Ferro Dextran.....	53
5.3 - Geração de Espécies Reativas de Oxigênio em Granulócitos de Ratos Controle e Diabéticos Submetidos ao Tratamento com Ferro Dextran.....	54
5.4 - Efeito da Suplementação com Ferro sobre o Peso, Processos Inflamatórios, <i>Status</i> Oxidante e Antioxidante em Coração.....	55
5.4.1 – Peso Final em Coração.....	55
5.4.2 – Níveis de Ferro no Coração.....	56
5.4.3 – Avaliação Histológica no Coração.....	57

5.4.4 – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico no Coração.....	59
5.4.5 – Proteína Carbonilada em Coração.....	60
5.4.6 – Atividade Antioxidante em Coração.....	61
5.5 - Efeito da Suplementação com Ferro sobre o Peso, Processos Inflamatórios, Status Oxidante e Antioxidante em Pâncreas.....	61
5.5.1 – Peso Final no Pâncreas.....	61
5.5.2 – Níveis de Ferro no Pâncreas.....	62
5.5.3 – Avaliação Histológica no Pâncreas.....	63
5.5.4-Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico no Pâncreas.....	65
5.5.5 – Proteína Carbonilada no Pâncreas.....	66
5.5.6- Atividade Antioxidante no Pâncreas.....	67
6 – DISCUSSÃO.....	68
7 – CONCLUSÕES.....	73
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
9 – ANEXOS.....	82

1- INTRODUÇÃO

O Diabetes *mellitus* é reconhecido como um grupo heterogêneo de doenças com elementos comuns de hiperglicemia e intolerância à glicose, devido à deficiência de insulina, eficácia prejudicada desse hormônio, ou ambos, de acordo com os parâmetros da IDF - *International Diabetes Federation*- (2009). No diabetes ocorre aumento da formação de espécies reativas do oxigênio (ERO), potencializando assim as complicações diabéticas causadas pela hiperglicemia (Brownlee, 2001; Robertson, 2004; Correa-Giannella e Vieira, 2007).

Sabe-se que a sobrecarga de ferro também potencializa a formação da ERO, danificando estruturas celulares e agravando complicações de doenças crônicas. Níveis moderadamente aumentados de ferro no corpo, muito inferiores aos observados na hemocromatose, estão associados ao risco aumentado de diabetes tipo 2 (Rajpathak *et al.*, 2009). JEHN *et al.* (2004), ao avaliarem a relação entre os estoques de ferro, a síndrome metabólica e a resistência à insulina, em uma população de adultos dos EUA, observaram associação positiva entre os altos níveis de estoques de ferro e a prevalência da síndrome metabólica. SUN *et al* (2008, p.4695), avaliando a relação entre a concentração de ferritina com o risco para síndrome metabólica e diabetes tipo 2, em uma população de chineses, observaram que essa associação é positiva, reafirmando que pacientes que apresentaram sobrecarga de ferro tinham mais chances de desenvolverem doenças metabólicas. Em modelos experimentais, os estoques de ferro também estão correlacionados com os componentes isolados da síndrome metabólica, particularmente os níveis séricos de triacilgliceróis (TAG), de glicose plasmática, bem como marcadores de resistência à insulina (Silva *et al.*, 2008; Bonomo, 2010).

Estudos clínicos demonstram que a prevalência do diabetes nas hemocromatoses, que são distúrbios genéticos que causam uma sobrecarga de ferro, é de 7 a 40%. O papel do ferro na patogênese do diabetes é sugerido

pelo aumento da incidência de diabetes tipo 2 em diversas causas de sobrecarga de ferro (Moirand *et al.* 1997, Jiang *et al.* 2004).

Outro foco de estudo tem sido a relação entre diabetes e inflamação, pois todas as complicações reconhecidas nessa doença possuem componentes inflamatórios. Os mecanismos de defesa são comprometidos em pacientes com diabetes tipo 1 ou tipo 2 e há uma maior ativação de neutrófilos no sangue. Apesar de muitas vias estarem envolvidas na produção de ERRO, no diabetes, uma fonte importante nas lesões inflamatórias é a NADPH oxidase de neutrófilos, que representam células de defesa do organismo contra microrganismos, incluindo patógenos. Em indivíduos diabéticos, eles geram quantidades superiores de superóxido em relação a indivíduos não diabéticos (Karima *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2007; Omori *et al.*, 2008).

Os distúrbios no metabolismo da glicose também causam complicações que envolvem doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão arterial sistêmica, doença arterial coronariana e insuficiência cardíaca, sendo que 75% dos pacientes diabéticos morrem por algum evento cardiovascular (Kannel, Hjortland e Castelli 1974; Giugliano, Ceriello e Paolisso 1996; Gu, Cowie e Harris, 1999). Além disso, a hiperglicemia intracelular causa anormalidade no fluxo sanguíneo, aumentando a permeabilidade cardiovascular (Brownlee, 2001).

Entre as complicações clínicas presentes em pacientes diabéticos a cardiomiopatia que pode conduzir a insuficiência cardíaca. Tem-se demonstrado que citocinas inflamatórias são anormalmente expressas no miocárdio diabético e contribuem para a fibrose miocárdica (Boyer *et al.*, 2004).

Outra alteração metabólica importante presente no diabetes é a exposição crônica da célula- β a altos níveis de glicose que provoca danos oxidativos (Robertson e Harmon, 2006). Na literatura, descreve-se também que os níveis dos biomarcadores antioxidante são normalmente reduzidos, no coração e no pâncreas, quando comparada com os biomarcadores antioxidante no fígado, sendo, portanto, esses órgãos são mais susceptíveis a danos oxidativos do que aquele (Lenzen, Drinkgern e Tiedge 1996; Tiedge *et al.*, 1998).

O estudo das alterações metabólicas e histológicas causadas pela associação entre ferro e diabetes nos tecidos cardíaco e pancreático serão úteis para futuras intervenções clínicas que aumentem a expectativa de vida de pacientes com diabetes e/ou sobrecarga de ferro.

Considerando que o diabetes traz consequências ao coração e ao pâncreas e que esses órgãos têm atividade antioxidante reduzida, este estudo visa descrever se a suplementação com ferro altera a produção de ERO, por granulócitos, perfil histológico e *status* oxidante/antioxidante em coração e pâncreas.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1- Diabetes e Estresse Oxidativo

Dados epidemiológicos sugerem o diabetes *mellitus* como a quarta maior causa de morte nos países de alta renda. Há mais de 360 milhões de pessoas em todo mundo com diabetes e estima-se que, em 2030, esse número crescerá para 552 milhões, segundo a IDF (*op.cit*). De acordo com o DATASUS (2008), no Brasil, 9,72% da população apresentam algum dos tipos de diabetes.

O diabetes é dividido em dois tipos principais, tipos 1 e 2. No primeiro tipo, as células- β são alvo de um ataque autoimune com invasão das ilhotas por células mononucleares e citocinas inflamatórias (Interleucina-1; Óxido Nítrico) com consequente reação inflamatória que leva à perda de 70-80% no número de células- β . No diabetes tipo 2, a hiperglicemia ocorre devido a resistência a insulina, associada, na maioria das vezes, com obesidade e com fatores ambientais. Nesse último tipo, há uma perda de 25-50% do número de células- β (Cnop *et al.*, 2005).

A hiperglicemia crônica está associada a danos metabólicos, disfunção e falência de vários órgãos, além de gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio, que promove um estresse oxidativo. A maioria dos eventos deletérios provocados pela produção de ERO relaciona-se com a produção de toxinas geradas a partir de óxido nítrico, desempenhando um papel importante na patogênese do diabetes e suas complicações (Gross *et al.*, 2002).

A definição contemporânea de estresse oxidativo contempla dois diferentes mecanismos, um relacionado ao dano molecular e outro ao rompimento da sinalização redox. Assim, o estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, os quais resultam em dano macromolecular e prejuízo da sinalização redox (Sies e Jones 2007)

Em tecidos expostos à hiperglicemia, há um aumento da produção de ERO através da ativação de várias vias metabólicas como:

- a) A oxidação de glicose leva a geração de formas reduzidas de NADH e FADH₂, as quais promovem a produção de ATP através da cadeia transportadora de elétrons. O transporte de elétrons, na cadeia respiratória, acarreta a redução do O₂ com formação de H₂O, mas também a produção intracelular de radicais O₂⁻ (Brownlee, 2001).
- b) O aumento da glicose resulta na sua conversão a sorbitol pela enzima aldose redutase. O sorbitol, por sua vez, é oxidado a frutose pela enzima sorbitol desidrogenase. A redução da glicose a sorbitol consome nicotinamida adenina difosfato (NADPH). Como o NADPH é necessário para a regeneração da glutatona, a diminuição na sua concentração pode induzir ou exacerbar o estresse oxidativo intracelular (Halliwell e Gutteridge, 1989; Correa-Giannella e Vieira, 2007).
- c) A formação de sorbitol, através da enzima aldose redutase, diminui a relação NADPH : NADP⁺, o que potencializa a síntese de diacilglicerol (DAG), principal ativador fisiológico da Proteína Kinase C (PKC). A família das PKC compreende várias isoformas que, quando ativadas, resultam no aumento da produção de óxido nítrico (NO), na alteração na expressão de fatores de crescimento, como o endotelial vascular (VEGF) e o transformante de crescimento beta (TGF-β), além da ativação do NFκβ. Essas alterações resultam em uma maior produção de ERO, por neutrófilos, aumentando a concentração do radical O₂⁻ (Brownlee, 2001).
- d) A potencialização da produção de diacilglicerol gera compostos denominados produtos de glicação avançada (AGEs), que representam um grupo heterogêneo de produtos químicos resultantes de uma reação não enzimática entre açúcares redutores e proteínas, lipídios, ácidos nucleicos, ou uma combinação destes. O processo de glicação afeta a circulação de proteínas (albumina sérica, insulina, lipoproteínas, hemoglobina). A formação de AGEs implica na formação de intermediários reativos, sendo o principal o metilglioxal, que contribui nas complicações diabéticas por ativar resposta inflamatória com o

recrutamento de neutrófilos e com a formação de ERO. (Brownlee, 2001; Correa-Giannella e Vieira, 2007; Negre-Salvayre *et al.*, 2009; Kaneto *et al.*, 2010).

- e) A glicose intracelular, em excesso, também pode ser desviada para a via da hexosamina, onde é convertida em frutose-6-fosfato, que, por sua vez, é transformada em N-acetilglicosamina 6-fosfato pela enzima GFAT. A N-acetilglicosamina 6-fosfato é, posteriormente, convertida em UDP-N-acetilglicosamina, que modula a expressão de proteínas as quais funcionam como fatores de transcrição que estimulam a via da aldose redutase, potencializando o consumo de NADPH e diminuindo a regeneração da glutatona redutase (Valko *et al.*, 2007; Negre-Salvayre *et al.*, 2009).

A hiperglicemia gera uma elevação no gradiente de potencial transmembrana, na mitocôndria. Isso inibe o transporte de elétrons, aumentando a meia-vida de intermediários da cadeia respiratória, coenzima Q (ubiquinona), que reduzem o O_2 a superóxido (Reis *et al.*, 2008).

O excesso de O_2^- , provocado pelo estresse oxidativo, é o elemento comum dessas vias induzido pela hiperglicemia. A superprodução de O_2^- inibe, parcialmente, uma enzima da via glicolítica, a D-gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), aumentando os metabólitos formados antes da ação da GAPDH. Esses metabólitos são desviados para utilização nas quatro principais vias metabólicas responsáveis pelo dano celular da hiperglicemia, em um ciclo vicioso que aumenta ainda mais a geração de O_2^- , como pode ser observado na Figura 1 (Correa-Giannella e Vieira, 2007 p.378).

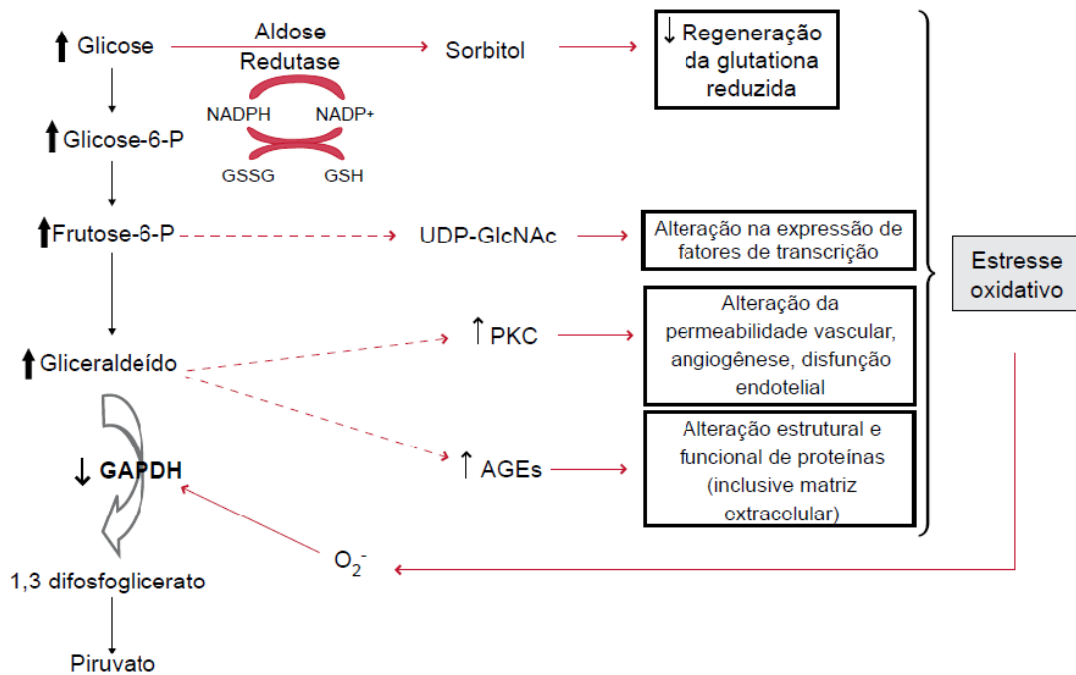


Figura 1: Mecanismos propostos para explicar o dano celular induzido pela hiperglicemia e o estresse oxidativo como via final comum das quatro vias metabólicas ativadas. O excesso de radical superóxido (O_2^-) inibe parcialmente a GAPDH, uma enzima da via glicolítica, o que resulta aumento dos metabólitos formados antes da ação da GAPDH. Adaptado de Correa-Giannella e Vieira (2007). NADPH: nicotinamida adenina difosfato; GSSG: Glutaciona Oxidase; GSH: Glutaciona Redutase; UDP-GlcNAc: UDP-N-acetilglicosamina; PKC: Proteína Kinase C; GAPDH: D-gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; AGEs: Produtos de glicação avançada; O_2^- : ânion superóxido.

Outro foco de estudo tem sido a relação entre diabetes e inflamação, pois todas as complicações reconhecidas no diabetes possuem componentes inflamatórios. Sabe-se que os mecanismos de defesa estão comprometidos nessa patologia, e há uma ativação anormal de neutrófilos séricos. Os neutrófilos representam a primeira linha de defesa celular no organismo contra microrganismos. Esta função baseia-se em parte na capacidade destas células em gerarem grandes quantidades de O_2^- (Karima *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2007; Omori *et al.*, 2008).

Assim, no diabetes, a NADPH oxidase, presente em neutrófilos, torna-se importante fonte de produção de ERO. Citocinas inflamatórias são conhecidas por modularem a atividade da NADPH oxidase através da ativação de neutrófilos, o que aumenta a sua ação bactericida (Dang *et al.*, 2006). Entretanto a ativação da NADPH oxidase é regulada para evitar danos teciduais e vasculares em neutrófilos de indivíduos saudáveis. Neutrófilos de indivíduos diabéticos, com baixo controle da glicemia, geram quantidades superiores de superóxido em relação a indivíduos não diabéticos e exibem uma atividade anormal de PKC e formação de diglicerídeos. Sabe-se que, durante a fagocitose, existe uma ativação da cascata fosfatidilinositol, o que produz inositoltrifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). DAG, por sua vez, é um ativador da PKC, que é uma das responsáveis pela fosforilação de p47 phox, subunidade da NADPH-oxidase, ativando a NADPH oxidase na membrana celular dos neutrófilos (Omori *et al.*, 2008; Karima *et al.*, 2005).

Assim, faz-se importante avaliarmos quais os efeitos do ferro sobre a atividade de neutrófilos, em um quadro de diabetes, já que esses estão relacionados ao desenvolvimento de várias complicações associadas e um aumento da morbimortalidade dos pacientes.

2.2- Diabetes e tecido cardíaco

A miocardiopatia diabética é uma doença do músculo cardíaco causada pelo diabetes *mellitus* e não relacionada às patologias vascular e valvular ou à hipertensão arterial sistêmica. Observações experimentais e clínicas demonstram hipertrofia, necrose, apoptose e aumento do tecido intersticial miocárdico. Acredita-se que a miocardiopatia diabética seja decorrente de anormalidades metabólicas como hiperlipidemia, hiperinsulinemia e hiperglicemia e outras alterações do metabolismo cardíaco. Tais alterações podem causar aumento do estresse oxidativo, fibrose intersticial, perda celular e comprometimento do trânsito intracelular de íons e da homeostase do cálcio (Okoshi *et al.*, 2007).

Os pacientes diabéticos desenvolvem uma cardiomiopatia característica de hipertrofia ventricular esquerda e disfunção diastólica. No estado crônico, a

hiperlipidemia, a hiperinsulinemia, a hiperglicemia e o aumento do estresse oxidativo causam danos cardíacos, disfunção ou apoptose, e, eventualmente, conduzem ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca. Tem-se demonstrado que citocinas inflamatórias são anormalmente expressas no miocárdio diabético e contribuem para a fibrose miocárdica (Goyal *et al.*, 1998; Boyer *et al.*, 2004; Suys *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2011).

Os ácidos graxos livres, em excesso, alteram a transdução do sinal mediado pela insulina devido a um aumento de ERO, nas células- β , que leva à ativação da via *c-Jun Nterminal kinase* (JNK) (Kaneto *et al.* 2010). No diabetes há aumento da oxidação de ácidos graxos e acúmulo mitocondrial de acil carnitina, levando a uma deficiência na fosforilação oxidativa, o que promove aumento de ERO, causando dano celular e induzindo a apoptose (Ding e Rodrigues 2006).

A hiperglicemia potencializa a oxidação da glicose e geração mitocondrial de superóxido. O estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia viabiliza uma maior formação de AGEs, promovendo a formação de ligações irreversíveis com várias macromoléculas. Por exemplo, a ligação de AGEs ao colágeno induz fibrose intersticial. A ligação de AGEs à enzima SERCA-2a (enzima responsável pela captação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático) leva à inativação desta enzima e reduz as contrações cardíacas (Ding e Rodrigues 2006). Estes dados fornecem evidências para a associação entre hiperglicemia e alteração da função cardíaca, com consequente diminuição da eficácia no relaxamento, da contratilidade e da rigidez miocárdica (Poornima, Parikh e Shannon, 2006). Logo, o tecido muscular cardíaco é afetado pela hiperglicemia crônica e é susceptível aos danos oxidativos. Estudos sobre complicações cardíacas são necessários para se esclarecerem melhor os mecanismos pelos quais elas acontecem e se sugerirem possíveis mecanismos que revertam ou atenuem esses danos celulares.

2.3 – Diabetes e tecido pancreático

A hiperglicemia provoca efeitos tóxicos sobre as ilhotas pancreáticas. Múltiplas vias bioquímicas e mecanismos de ação foram sugeridos para

esclarecer a toxicidade da hiperglicemia. Estes incluem a auto-oxidação da glicose, a ativação da PKC, a formação e glicação de metilglicoxal, o metabolismo da hexosamina, a formação do sorbitol, pela via dos polióis, e fosforilação oxidativa. Muitos desses mecanismos podem causar danos às células- β (Brownlee, 2001).

Finalmente, os níveis de expressão de enzimas antioxidantes, nas ilhotas pancreáticas, são baixos se comparados com outros tecidos, tornando essas células mais suscetíveis aos efeitos deletérios causados por ERO com consequente deterioração das células- β (Lenzen, 2008; Harmon *et al.*, 2009).

Todas essas vias têm em comum a formação ERO que, em excesso, causa estresse oxidativo, e, por sua vez, faz com que ocorra uma alteração na expressão no gene promotor da síntese de insulina que afeta a função e viabilidade das células- β . Há uma diminuição expressão da síntese de insulina que altera o seu conteúdo e a sua secreção. Essa anormalidade é devida à perda de pelo menos dois fatores de transcrição - PDX-1 e MafA- (Robertson e Harmon, 2006).

O estado clínico de diabetes *mellitus* é, muitas vezes, acompanhado de níveis séricos elevados de colesterol, triacilgliceróis (TAG) e ácidos graxos livres que deterioram as células- β , um conceito chamado de lipotoxicidade. A exposição prolongada das células- β pancreáticas aos ácidos graxos foi relacionada à inibição da expressão de insulina e provoca um acúmulo de citrato citosólico, o precursor de malonil-CoA, que inibe a carnitina palmitoyltransferase-1, a enzima responsável pelo transporte de ácidos graxos na mitocôndria. Assim, altas concentrações de glicose e de ácidos graxos que não são prontamente oxidados, na mitocôndria, são desviadas por vias que promovem a esterificação. Sabe-se que a lipotoxicidade está envolvida na deterioração da função das células- β . Quando as células- β são expostas a um excesso de ácidos graxos livres, há uma maior indução de ERO que leva à redução da secreção de insulina, disfunção e apoptose dessas (Robertson, 2004).

Kaneto *et al.*(2010 p.3) sugerem que o aumento de ERO provocado pela hiperglicemia e / ou hiperlipidemia diabética leva à ativação da via *c-Jun*

Nterminal kinase (JNK) em células- β pancreáticas. A produção de ERO e subsequente ativação da via da JNK induzem a translocação de PDX-1, que leva à redução da sua atividade e à supressão da síntese de insulina, promovendo uma disfunção das células- β como pode ser esquematizado na Fig. 2.

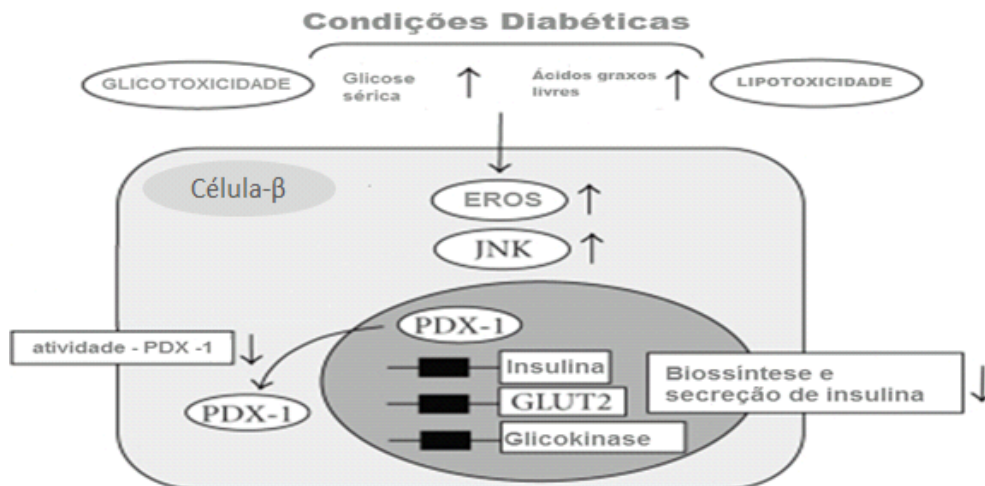


Figura 2: Papel de ERO na progressão da disfunção das células- β no pâncreas. ERO são provocadas pela hiperglicemia e / ou hiperlipidemia em condições diabéticas, o que leva a ativação da via JNK no pâncreas. ERO e subsequente ativação da via JNK induzem a translocação do PDX-1, que leva à redução do PDX-1 e a biossíntese e secreção da insulina. Adaptado de Kaneto et al. (2010).

Assim, estados de sobrecarga de compostos que agravam a produção de ERO, como a suplementação com Ferro, podem acentuar a toxicidade das células- β . Entende-se que o tecido pancreático também é afetado pela lipotoxicidade e pela glicotoxicidade, presentes no diabetes, e modelos experimentais eficientes, que reproduzam esses efeitos metabólicos, são necessários para se proporem possíveis intervenções que atenuem esses danos celulares.

2.4– Ferro

O ferro (Fe) é classificado como um elemento traço essencial no organismo e está presente em várias moléculas, atuando como cofator de diversas proteínas e enzimas. As diferentes formas de ferro apresentam absorção na mucosa intestinal por vias distintas. O ferro heme é solúvel no intestino delgado, sendo facilmente absorvido pela mucosa intestinal sem a interferência de fatores químicos e/ou alimentares, ao contrário do não-heme cuja absorção é bem menor, cerca de 1 a 5%, e oscila substancialmente em função da presença de fatores químicos e alimentares. A concentração desse metal no organismo é de aproximadamente de 30 - 40 mg / kg (Carpenter, Mahoney, 1992; Mckie, Barrow e Latunde-Dada, 2001; Jones *et al.*, 2007; Atanasiu, 2007).

No entanto, essa concentração varia em função da idade e sexo do indivíduo e os tecidos específicos. Os estoques de ferro são mantidos no corpo e aproximadamente 90% são reutilizados diariamente. O restante é excretado, principalmente na bile, sendo necessária a ingestão diária de 10%, para se manterem as concentrações normais; caso contrário, resultará em deficiência (Beard, 2001).

O fator determinante na absorção do ferro pelas células é a sua biodisponibilidade. O íon solúvel (Fe^{+2}) é facilmente oxidado em meio aquoso para o hidróxido férrico, insolúvel. Em adultos normais que ingerem uma dieta equilibrada, o conteúdo de ferro no corpo é bastante equilibrado entre os compostos funcionais, complexos de armazenagem, quelatos, transporte, ingestão e excreção. Os principais locais de armazenagem de ferro são o fígado, o baço e a medula óssea (Grotto, 2010).

Anteriormente, acreditava-se ocorrer uma alta taxa de deficiência de ferro e uma baixa taxa de sobrecarga de ferro. No entanto, a deficiência de ferro resulta, sobretudo, de excesso de sangramento provocado por parasitoses, principalmente em crianças. Em contrapartida, cada vez mais, há causas múltiplas de prevalência de sobrecarga de ferro que estão sendo reconhecidas, especialmente em lugares onde há uma variedade de práticas

culturais que incentivam o consumo de fontes inorgânicas. As principais causas da sobrecarga de ferro incluem: (1) ingestão excessiva de ferro através de dietas ricas em suas fontes; (2) administração de ferro via parenteral, normalmente utilizada em casos de anemia grave, quando o paciente apresenta intolerância à suplementação oral ou apresenta hemorragias gastrointestinais; (3) inalação de ferro (4), deslocamento de ferro a partir de estoques intracelulares para o plasma e (5) redução da excreção menstruais de ferro em mulheres pré-menopausa (Puntarulo, 2005; Cançado, Lobo e Friedrich, 2010).

A distribuição deste ferro armazenado não é uniforme, o fígado contém aproximadamente 60% dos estoques de ferro, no organismo. Os 40% restantes são encontrados nos tecidos musculares e nas demais células. Nos hepatócitos, 95% estão ligados à ferritina e o restante se encontra ligado à hemossiderina. No entanto, durante a sobrecarga de ferro, a massa de hemossiderina no fígado acumula dez vezes mais que a de ferritina (Beard, 2001).

No sangue, o ferro apresenta-se na forma de um complexo ferro-transferrina que, ligado ao receptor, entra na célula por endocitose. A mobilização do ferro da transferrina, requer a ação de agentes quelantes e redutores como ácido ascórbico, glutathione e cisteína, que penetram no interior da molécula através dos canais de transferrina, atingindo o seu núcleo onde reduzem o ferro para seu estado ferroso e é armazenado na forma de ferritina (Cançado e Chiattoni, 2001; Aisen, Enns e Wessling-Resnick 2001; Grotto, 2010).

As funções do ferro relacionam-se à suas habilidades de participar das reações de oxirredução. Como é um elemento altamente reativo, pode ser tóxico quando em excesso, devido à sua capacidade de gerar ERO (reações de Fenton e de Haber-Weiss). Apesar do organismo possuir vários mecanismos de regulação da absorção de ferro, uma sobrecarga desse metal pode ocorrer. A sobrecarga de ferro denota um excesso de estoques de ferro no corpo. Além das formas patológicas de sobrecarga de ferro, estoques

moderadamente elevados de ferro podem ser um motivo de preocupação (Fleming e Bacon 2005).

Em estudos com ratos e suplementação de ferro, Turbino-Ribeiro *et al.* (2003) observaram que o excesso de ferro não alterou os níveis de lipídeos séricos e a pressão arterial nas ratas controle e hipercolesterolêmicas. Nesse estudo, foram utilizadas ratas Fischer, hipercolesterolêmicas (1g colesterol /100g dieta) com sobrecarga de ferro dextran (25 mg) durante seis semanas.

Ainda em estudos experimentais, Silva *et al.* (2008) avaliaram se a sobrecarga de ferro altera a homeostase da glicose e triacilgliceróis, utilizando ratos Fischer machos, dieta hipercolesterolêmica (1g colesterol /100g dieta) e 50 mg de ferro dextran por 16 semanas. O excesso de ferro aumentou os níveis de triacilgliceróis no soro mas não afetou a concentração de colesterol sérico. Os autores sugerem que o excesso de ferro, em ratos, provavelmente modifica o metabolismo lipídico, altera a homeostase da glicose e aumenta o nível de triacilgliceróis.

Bonomo (2010) estudou o efeito do excesso de ferro sobre o *status* oxidativo, a homeostase de macromoléculas e a expressão de PPAR- α em hamsters. Nesse estudo foram utilizados dieta hipercolesterolêmica e ferro dextran (50 mg) por oito semanas e observou que o tratamento com ferro aumentou os estoques de ferro no fígado. A atividade antioxidante mensurada pelos níveis das enzimas catalase e superóxido dismutase e pela atividade do complexo glutatona aumentaram com o tratamento com ferro. Metabólitos que indicam danos oxidativo como a glicação de proteínas, dosado através dos níveis de hemoglobina glicada, e a peroxidação de lipídios, dosado através da determinação das substâncias reativas ao ácido tiobartitúrido (TBARS), também foram aumentados em ratos suplementados com ferro.

Logo, estudos com sobrecarga de ferro ainda são limitados quanto aos efeitos metabólicos que o excesso desse metal provoca, sendo necessários mais estudos que aproximam a ingestão máxima recomendada para humanos e sua ação em outros tecidos além do fígado e sangue.

2.5- Ferro e Espécies Reativas de Oxigênio

O oxigênio é aceptor final de elétrons utilizados na cadeia respiratória; contudo, a transferência de quatro elétrons produzindo H₂O reduz parcialmente compostos instáveis que são nocivos ao organismo (H₂O₂ e OH⁻). Em particular, a transferência de um único elétron ao O₂ forma o ânion superóxido (O₂⁻), enquanto a transferência de dois elétrons origina o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Ambos os compostos são potencialmente destrutivos e denominados ERO (Halliwell e Gutteridge, 1989; Ferreira, 1997).

ERO são átomos, íons ou moléculas que contêm oxigênio com um elétron não-pareado (radical livre) ou substâncias capazes de gerarem esses radicais. Os radicais de oxigênio representam a classe mais importante de radicais gerados no organismo e podemos citar: o ânion superóxido (O₂⁻); radical hidroxila (OH⁻); peroxila (ROO^o); óxido nítrico (NO^o); alcoxila (RO^o) (Halliwell e Gutteridge, 1989).

A superprodução de ERO resulta em estresse oxidativo, um processo deletério que pode ser um importante mediador de danos a estruturas celulares, incluindo os lipídios e membranas, proteínas e DNA. Em contraste, ERO, em concentrações moderadas, apresentam efeitos benéficos que envolvem funções fisiológicas, como por exemplo, na defesa contra agentes infecciosos, na função de vias de sinalização e a indução de uma resposta mitogênica (Ha e Kim, 1999; Valko *et al.*, 2007).

Em nosso organismo, os metais de transição como cobre e ferro contribuem para a formação de ERO. Nesse sistema, o ferro é mais pronunciado devido à sua maior biodisponibilidade no organismo. A reação do Fe²⁺ com o H₂O₂ (reação de Fenton) pode ser representada pelas equações 1 e 2 (Barreiros, 2006).



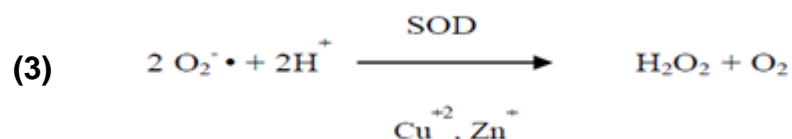
O radical hidroxil é muito reativo e causa danos ao DNA, ao RNA, às proteínas, aos lipídios e às membranas celulares do núcleo e mitocondrial. No DNA, esse radical danifica tanto as bases nitrogenadas quanto a desoxirribose.

A presença das ERO na membrana celular pode provocar a oxidação de lipídios, interferir nos transportes ativo e passivo através da membrana ou ocasionar a ruptura desta, levando à morte celular. Na circulação, essa oxidação danifica as paredes dos vasos sanguíneos, facilitando o acúmulo de lipídios (Reis et al., 2008).

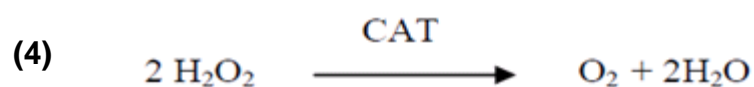
O organismo dispõe de mecanismos de proteção contra ERO e abrangem a proteção enzimática ou não-enzimática. No sistema enzimático incluem-se, também, vários minerais essenciais como Selênio, Cobre, Manganês e Zinco, necessários para a formação ou atividade destas enzimas, e, em caso de privação nutricional, há comprometimento da função enzimática (McCord, 2000, Valko *et al.*, 2007).

Dentre o sistema enzimático estão incluídos:

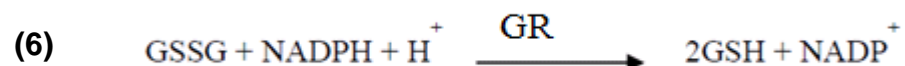
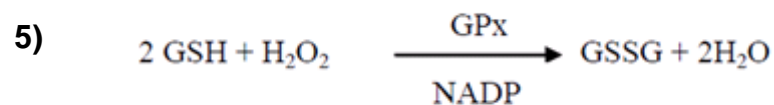
- a) **Superóxido dismutase (SOD):** responsável pela conversão de duas moléculas de ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2) (reação 3).



- b) **Catalase (CAT):** é responsável pela conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em água e O_2 . É encontrada, em sua maioria, nos peroxissomos, e, em humanos, os níveis mais altos estão no fígado, nos rins e nos eritrócitos, onde a maioria do H_2O_2 é decomposto (reação 4).



- c) **Complexo Glutaciona:** converte o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) formado pela ação da SOD, liberando água. A glutaciona reduzida (GSH, L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) está presente na maioria das células e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular. Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH, presente na cisteína. Após exposição da GSH ao agente oxidante, ocorre sua oxidação a GSSG. A GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis às custas da conversão da GSH a GSSG. A recuperação da GSH é feita pela enzima GR, uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular (reações 5 e 6).



GSH: glutaciona reduzida; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; GPx: glutaciona peroxidase; GSSG: glutaciona oxidada; GR: glutaciona redutase; NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada; NADP: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida.

Os sistemas antioxidantes não-enzimáticos são compostos por moléculas estáveis o bastante para doarem um elétron a um radical livre e neutralizá-lo, reduzindo sua capacidade de dano oxidativo. Estão incluídos

neste grupo: α -tocoferol, β -caroteno, ubiquinol-10, bilirrubina, licopeno, flavonóides, urato, ascorbato entre outros. Esses podem ser adquiridos através da dieta ou suplementação alimentar. Há evidências de sua eficiência neutralizando o estresse oxidativo, particularmente, o provocado por causas exógenas (Sies e Jones, 2007).

2.6- Ferro e Diabetes

2.6.1- Estudos Epidemiológicos

O metabolismo anormal de Fe pode levar a complicações diabéticas através da reação de Fenton potencializando a formação de radicais livres (Ward *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2008; Prata *et al.*, 2009).

Para pacientes com hemocromatoses, os mecanismos que podem contribuir para o desenvolvimento do diabetes são uma sobrecarga de ferro no fígado, levando a resistência à insulina com consequente acúmulo de ferro nas células- β do pâncreas, resultando em danos nessas células e em redução na secreção de insulina (Mendler *et al.*, 1999; McClain *et al.*, 2006).

Em estudos clínicos, há uma associação positiva entre o aumento da ingestão de alimentos, fontes de ferro-heme e a patogênese da diabetes tipo 2 (Jiang *et al.*, 2004). O aumento dos estoques de ferro corporal tem uma relação direta com o risco de diabetes tipo 2 e a resistência à insulina (Salonen *et al.*, 1998; Swaminathan *et al.*, 2007; Rajpathak *et al.*, 2009). Por outro lado, níveis normais de ferro tem sido demonstrado como benéfico para a secreção e ação da insulina e para o controle metabólico no diabetes (Wei *et al.*, 2009; Fernandez-Real *et al.*, 2009).

2.6.2- Estudos Experimentais

A sobrecarga de ferro altera o metabolismo de lipídios, de carboidratos e o *status* oxidante/antioxidante dependendo da formulação de ferro utilizada e do tempo de tratamento do modelo experimental.

Silva *et al* (2011a), ao avaliarem a interação de diabetes, suplementação de ferro e marcadores de estresse oxidativo, em tecidos hepáticos e

pancreáticos, em hamsters, utilizando estreptozitocina (STZ) (50mg) para induzir diabetes e ferro carbonílico (0,83%) observaram um aumento nos níveis de glicose e uma redução dos TAG para os grupos tratados com STZ. O ferro ativou a expressão de PPAR- α (fatores de transcrição que regulam a expressão gênica), atenuou os níveis de proteína carbonilada, os níveis de glutathione e a atividade da catalase em relação aos grupos tratados com STZ. Análises histológicas mostram que a suplementação com ferro causou um aumento no tamanho das ilhotas pancreáticas. Os resultados desse estudo mostram que o ferro altera o estado oxidante / antioxidante e a ativação de PPAR- α no fígado de hamsters diabéticos.

Em um modelo de hemocromatose hereditária, observou-se que a captação de glicose é aumentada no músculo esquelético, mas sua oxidação é reduzida alterando a proporção de ácidos graxos, o que pode contribuir para o risco de diabetes devido a um excesso de ferro (Huang, Jones e Luo, 2011).

Estudos que envolvem essa relação entre ferro e diabetes são importantes para melhorar o entendimento das possíveis complicações quando há a associação entre diabetes e sobrecarga de ferro. Modelos experimentais de sobrecarga de ferro e diabetes serão úteis para verificarmos esta interação e analisarmos quais as vias metabólicas são alteradas.

Excesso nos níveis de ferro é um fator de risco para o diabetes, mas os mecanismos subjacentes e quais as lesões acometidas a diversos órgãos a essa associação ainda são controversos. A importância deste estudo é a de desvendar alguns dos mecanismos envolvidos na relação entre diabetes e ferro, para posterior determinação de medidas preventivas em relação às complicações desencadeadas pelo diabetes. Além disso, estudos que correlacionam excesso de ferro, diabetes, e órgãos como o coração e pâncreas são escassos e necessários, visto que esses órgãos possuem uma atividade de biomarcadores antioxidante reduzida e são mais susceptíveis a danos oxidativos. Assim, estudamos em ratos submetidos a uma sobrecarga de ferro injetável e em diabéticos, se esta interação promove alterações na atividade oxidante/antioxidante, no metabolismo de ferro e na glicemia no coração e no pâncreas.

3- OBJETIVOS

Descrever os efeitos da suplementação com ferro injetável (ferro dextran) em ratos diabéticos e controle sobre parâmetros do estado oxidativo e danos teciduais.

3.1- Objetivos Específicos

Em ratos controles e apresentando diabetes, induzidos por STZ, tratados e não tratados com Ferro Dextran:

- a. Avaliar alterações no peso final, no perfil glicêmico e proteínas glicadas no soro;
- b. Avaliar o *status* de ferro através da determinação de ferro sérico, capacidade de ligação de ferro, transferrina e ferro tecidual em fígado;
- c. Isolar granulócitos dos animais e, em seguida, mensurar a formação de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos;
- d. Avaliar danos oxidativos às biomoléculas através dos níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e proteínas carboniladas no coração e no pâncreas;
- e. Avaliar atividade antioxidante através da determinação dos níveis da glutathione, catalase e SOD no coração e no pâncreas.
- f. Determinar as concentrações de ferro e danos teciduais no coração e no pâncreas através de alterações histológicas e de marcadores bioquímicos séricos;

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Animais e Divisão dos Grupos

Foram utilizados ratos machos Fischer albinos com aproximadamente oito semanas de idade, pesando, em média, 200g provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Alimentos da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto.

Para execução do projeto foram realizados dois experimentos; em cada um utilizaram-se 48 ratos, divididos em quatro grupos. No primeiro experimento, foram feitas as análises bioquímicas séricas e atividade oxidante/antioxidante nos tecidos cardíaco e pancreático. As dosagens de atividade de neutrófilos e análise histológica foram realizadas com o segundo experimento. Durante os experimentos, para os grupos controle (C) utilizou-se dieta padrão (AIN93M); os grupos controle e ferro dextran (CF) dieta padrão e injeções de ferro dextran; os grupos diabetes (D) receberam dieta padrão e injeção de STZ e os grupos diabetes e ferro dextran (DF) receberam dieta padrão, injeção de STZ e injeções de ferro dextran.

No início do primeiro experimento, os grupos C e CF tinham sete animais por grupo experimental e os grupos D e DF 17 animais. No início do segundo experimento, os grupos C e CF tinham oito animais por grupo experimental e os grupos D e DF 16 animais por grupo. Cada experimento teve duração de 21 dias. A aplicação de STZ e a primeira aplicação de ferro foram realizadas no primeiro dia de experimento, outras três aplicações de ferro foram intercaladas a cada cinco dias e após cinco dias da última aplicação de ferro os animais foram mortos (Figura 3)

Durante a realização do experimento, os animais foram mantidos em ambiente arejado, com controle de temperatura, umidade e ventilação, e receberam ração padrão e água *ad libitum*. O manejo dos animais foi feito em conformidade com as normas internacionais de proteção animal e com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade

Federal de Ouro Preto, Protocolo nº2010/24.



Figura 3: Linha cronológica dos experimentos considerando a aplicação das injeções de STZ e ferro dextran.

4.2 - Dieta

A dieta foi confeccionada no Laboratório de Nutrição Experimental da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto (Tabela 1) e foi acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em freezer a 20°C negativos.

Tabela 1: Dieta AIN modificada* (g/1000g de dieta).

Composição	Dieta Padrão
Caseína	140
Amido de Milho	722
Óleo de Soja	40
Colina	2,5
Mistura de Minerais	35
Mistura de Vitaminas	10
Celulose	50

* A diferença da nossa dieta para a AIN-93M é a ausência de sacarose. Mistura de sais (expresso por g/kg da mistura): NaCl – 139,3 / KI- 0,79 / MgSO4.7H2O- 57,3 / CaCO3- 381,4 / MnSO4.H2O – 4,01 / FeSO4.7H2O – 0,548 / CuSO4. 5H2O – 0,477 / CoCl2.6H2O – 0,023 /

KH_2PO_4 – 389,0. Os sais foram adquiridos do Reagen, Rio de Janeiro, Brasil. Mistura de vitaminas (expresso por em mg/kg da mistura): Acetato de retinol – 690; colecalciferol – 5; ácido p-amino benzóico – 10 000; inositol – 10 000; niacina – 4000; riboflavina – 800; tiamina HCL – 500; ácido fólico – 200; botina – 40; cianocobalamina – 3; dl- α - tocoferol – 6 700; sacarose – q.s.p. 1000. As vitaminas foram adquiridas da Merk, Darmstadt, Alemanha.

4.3- Reagentes e Dosagens Bioquímicas

Os reagentes químicos, incluindo STZ (Estreptozotocina), DTNB (Ácido 5,5'-Ditio-bis-(2-nitrobenzóico), luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-phthalazinedione), ácido tiobarbitúrico (TBA) e Ferro dextran foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Luois, MO, USA). Os gradientes Leukopaque e Monopaque foram obtidos na Bion LTDA.

Foram utilizados *kits* comerciais Easy Path para as dosagens histológicas de Hematoxilina & Eosina (H&E), Picrosírius-Hematoxilina e Coloração de Perls.

Foram utilizados *kits* comerciais Labtest Diagnóstica S.A. para as dosagens séricas de Ferro, Capacidade Latente de Ligação de Ferro (CLLF), Frutosamina, Glicose e Insulina.

Para a determinação da Capacidade Total de Ligação de Ferro (CTLF), Índice de Saturação de Transferrina (IST) e Transferrina, estimamos os valores utilizando as seguintes fórmulas recomendadas pelos fabricantes do *kit* comercial Labtest Diagnóstica S.A para a dosagem de CLLF:

- $CTLF = CLLF + \text{Ferro sérico}$;
- $IST = (\text{Ferro sérico}/CTLF) \times 100$
- $\text{Transferrina} = CTLF \times 0,7$

4.4- Indução do Diabetes

Para indução do diabetes utilizou-se a dose de 35mg/kg de STZ dissolvida em 0,2ml de tampão citrato (0,01M pH 4.5) administrada via intraperitoneal. Amostras de sangue foram coletadas para a confirmação do diabetes 72 horas após a administração do STZ. Ratos com glicemia acima de

320mg/dL foram considerados diabéticos. Os níveis de glicose foram determinados usando o aparelho Accu- Chek® Active da Roche. Em cada experimento, houve perda de cinco animais dos grupos D e DF, por não apresentarem os valores de glicemia pré-estabelecidos e um animal dos grupos D e DF por não sobreviver (Figura 4).

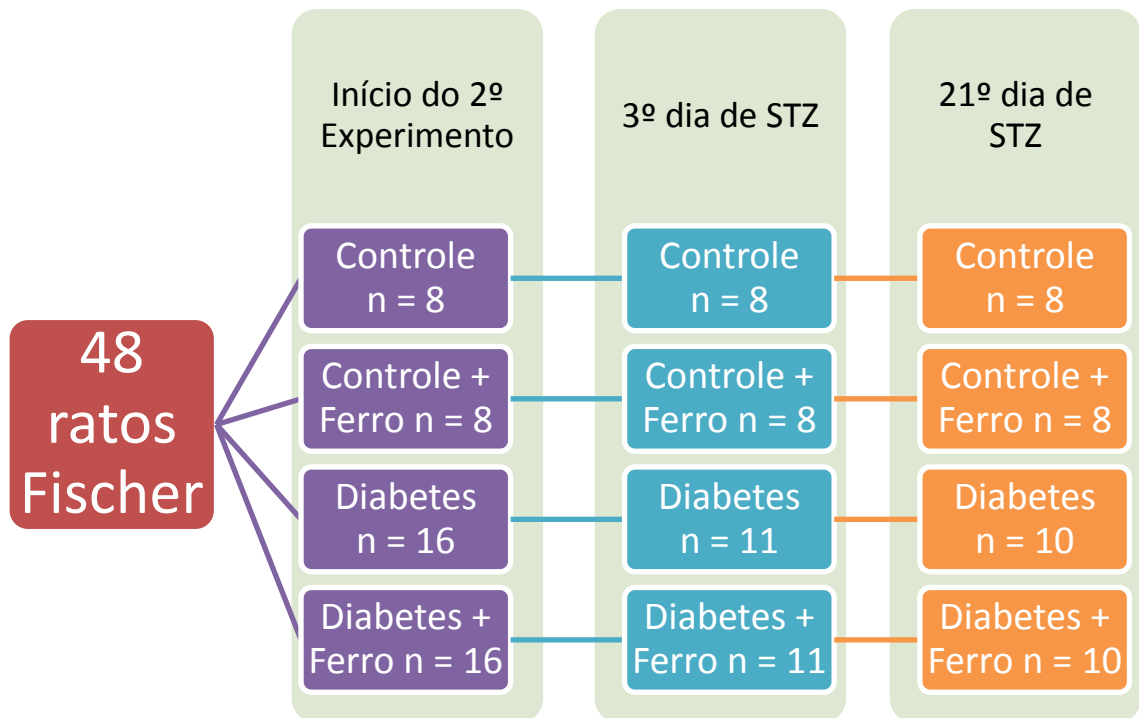


Figura 4: Delineamento amostral dos experimentos de ratos que receberam dieta padrão (AIN93M), ferro dextran (CF e DF) e STZ (D e DF) no início do experimento, após três dias da aplicação de STZ e no final de experimento.

4.5- Indução da Sobrecarga de Ferro

Para a indução da sobrecarga de ferro nos grupos CF e DF, utilizaram-se quatro doses de 0,1ml de ferro dextran (100g Fe²⁺/L), totalizando 40mg de ferro dextran administrados via intraperitoneal em intervalos de cinco dias. Esse modelo experimental foi adaptado de Turbino-Ribeiro *et al.* (2003).

4.6- Coleta do sangue e tecido

Ao fim do experimento, os ratos foram deixados oito horas em jejum e anestesiados com isopropano. O sangue foi coletado através do plexo braquial até sangria total e armazenado em tubos heparinizados para a separação dos leucócitos polimorfonucleares e de polipropileno sem anticoagulante para obtenção do soro. Em seguida o sangue sem anticoagulante foi centrifugado a 13000g por 10 minutos e o soro guardado a 80°C negativos para as dosagens bioquímicas.

Os órgãos fígado, coração e pâncreas foram extraídos, posteriormente pesados e fragmentados para as respectivas dosagens e mantidos a 80°C negativos. Fragmentos desses órgãos foram coletados para análise histopatológica e conservados em formol tamponado.

4.7- Isolamento dos leucócitos polimorfonucleares

Os leucócitos polimorfonucleares foram obtidos a partir do sangue periférico, segundo a técnica descrita por Bicalho *et al.*, 1981.

Resumidamente, quatro ml de sangue periférico heparinado foram adicionados sobre seis ml de gradiente duplo de Leukopaque e Monopaque (densidade = 1,08 e 1,12, respectivamente) em tubos siliconizados. Após centrifugação a 3000 G por 20 minutos foram obtidas duas fases distintas separadas por dois anéis interfásicos, sendo o anel superior formado por células mononucleares e o inferior por polimorfonucleares. O anel de polimorfonucleares foi colocado em tubo siliconizado, com o auxílio de uma pipeta. Em seguida, esse anel foi lavado uma vez por 30 minutos e a segunda vez por 10 minutos em solução de Hank's pH 7,35. Após as duas lavagens, as células foram ressuspensas em um ml de Hank's pH 7,35. Os granulócitos foram usados para o ensaio de quimioluminescência.

4.7.1- Ensaio de quimioluminescência

Para avaliar a geração de ERO foi realizado por ensaio de quimioluminescência, como descrito por Chaves *et al.*, 2000. Esta técnica baseia-se na reação entre luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4phthalozinedione) e

as espécies reativas geradas. A reação ocorre no interior de um sistema de catodo e anodo, o que permite a captação e registro dos fótons emitidos pelo α -aminofitalato. Para a realização do procedimento experimental, os granulócitos (1×10^6 células em solução Hank's pH 7,35) foram incubados com 500 μ l de luminol (10^{-4} M) por 30 minutos, em tubos siliconizados. Os fótons emitidos neste intervalo foram registrados de um em um minuto pela impressora interna do luminômetro. Os valores foram expressos em RLU/min.

4.8- Determinação de insulina sérica

Para determinação da concentração de insulina sérica foi utilizado o kit comercial da Crystal Chem Inc. Este kit é sensível para determinação de insulina de ratos e utiliza-se o método de "ELISA sanduíche". Nesta técnica, o anticorpo (anti-insulina) é imobilizado na microplaca. A amostra contendo a insulina é adicionada e reage com o anti-insulina imobilizado. Após a lavagem de poços, um segundo anti-anticorpo insulina ligado à peroxidase é adicionado, permitindo-se a reação com o complexo anticorpo/insulina presente na microplaca. Após o segundo anticorpo livre ser removido por lavagem, o substrato 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB) é adicionado, e o produto da reação colorido é medido no leitor de microplacas.

4.9- Determinação de Ferro Tecidual

Usando o método de orto-fenantrolina, determinou-se o ferro nos tecidos, que se baseia na redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} pela hidroxilamina, o qual é associado com orto-fenantrolina que dá cor à amostra correspondente à concentração de ferro.

Uma amostra de 100mg de tecido foi colocada em tubos de ensaio, juntamente com 0,5 ml de ácido nítrico concentrado. Em seguida, os tubos foram colocados no digestor Kieldahl a 110°C de modo que ocorressem a digestão dos tecidos e a evaporação total do ácido. Posteriormente, o resíduo foi ressuspendido com 2 ml de ácido clorídrico concentrado e transferido esse

material para um balão volumétrico, com capacidade para 10 ml e o volume foi completado com água deionizada.

A 0,5 ml da solução obtida foram adicionados 0,2µl de solução de hidroxilamina 10%, 4,1 ml de tampão acetato de sódio 4M pH 3,5 e 0,2 ml de orto-fenantrolina 0,1%. Foi feito um branco para leitura no espectrofotômetro contendo 0,5 ml de água deionizada, 0,2 ml de hidroxilamina, 4,1 ml de tampão acetato pH 3,5 e 0,2 ml de orto-fenantrolina. A leitura da absorbância foi realizada a 510nm. A concentração de ferro nas amostras foi obtida a partir de uma curva padrão feita com solução padrão de ferro 500 µg/ml. Os valores obtidos em unidades convencionais (µg/dl) foram transformados em unidades internacionais (µmol/l), pela multiplicação por 0,179.

4.10- Proteínas Totais em Tecido – método de Lowry

O método de dosar proteína Lowry é um ensaio confiável e amplamente utilizado. Esse método foi descrito pela primeira vez por Lowry *et al.* (1951). O método se baseia nas ligações das proteínas, que um meio alcalino, com os íons de cobre, formando uma cor azul que é dependente, em partes, do índice de tirosina e triptofano da amostra, visto que os íons de cobre catalisam a oxidação de aminoácidos aromáticos.

4.11- Dosagem dos Biomarcadores do Estresse Oxidativo

4.11.1- Determinação de Proteína Carbonilada

Amostras de coração e pâncreas foram homogeneizados em tampão fosfato 50mM, pH: 6,7 (1:10) O conteúdo de proteína carbonilada nestes homogenatos foi determinado pelo método de Levine *et al.* (1994) modificado. Primeiramente, 0,5ml de amostra foi precipitado usando 0,5ml de TCA 10%e centrifugado a 5000g por dez minutos, descartando-se o sobrenadante. Foram adicionados a esse precipitado 0,5ml de difenilhidrazina (DNPH) a 10mM e 0,5ml HCl a 2M e incubados à temperatura ambiente por 30 minutos. Durante a incubação, as amostras foram vigorosamente misturadas a cada 15 minutos.

Depois da incubação, 0,5ml de TCA 10% foram adicionados e as proteínas foram precipitadas e centrifugadas a 5000g por dez minutos. Depois de descartar o sobrenadante, o precipitado foi lavado duas vezes com uma mistura de acetato de etila e etanol (1:1), centrifugado e o sobrenadante descartado. O precipitado foi dissolvido em SDS 6% e centrifugado a 10.000g por dez minutos. O sobrenadante foi utilizado para leitura a 370 nm. Os níveis de proteínas carboniladas foram expressos em nanomoles por ml usando a coeficiente de extinção molar do DNPH ($22000 \text{ mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

4.11.2- Determinação de TBARS

Amostras de coração e de pâncreas foram homogeneizadas com tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,4 (1:10). Brevemente, 250 μ l de tricloroacético (TCA) a 28% foram adicionados a 500 μ l de amostra, 250 μ l de ácido tiobarbitúrico (TBA) (1% em ácido acético 1:1) e 125 μ l de hidroxibutiltolueno (BHT) (5mm dissolvido em etanol) e incubados a 95°C por 15 minutos. Subsequentemente, a mistura foi centrifugada a 10.000g por 15 minutos. O sobrenadante foi usado para determinação da absorbância a 535nm usando espectrofotômetro. O conteúdo de lipídio peroxidado foi calculado usando o coeficiente de extinção molar do complexo TBA-MDA $1,56 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

4.12- Dosagem dos biomarcadores antioxidantes

4.12.1- Catalase

Determinação da atividade da enzima catalase, baseado na sua capacidade de converter o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular, conforme descrito por Aebi, (1984). Os níveis de catalase foram expressos em U/mg de proteína.

4.12.2- Glutathiona Total

A concentração de glutathiona total (GSH e GSSH) em homogenatos dos órgãos foi determinada usando o Kit Sigma CS0260 (EUA). Este kit utiliza um método cinético para mensurar os níveis de glutathiona; através da redução do

DTNB (Ácido 5,5'-Ditio-bis-(2-nitrobenzóico) a TNB, que é determinado espectrofotometricamente a 412 nm. Foi utilizado um padrão de glutatona reduzida Sigma G4251. Os níveis de glutatona total foram expressos em nmol/ml.

4.12.3- Superóxido Dismutase

Este método é baseado na habilidade da superóxido dismutase consumir o O₂⁻, diminuindo, assim, a razão de auto-oxidação do pirogalol. A atividade da SOD é determinada espectrofotometricamente a 570nm. Os níveis de superóxido dismutase foram expressos em U/mg de proteína.

Os protocolos detalhados e reagentes utilizados seguem em anexo.

4.13- Análises histológicas

O coração e o pâncreas dos ratos foram removidos, no final do segundo experimento e fixados em formol tamponado a 4%. Os órgãos foram cortados, transversalmente e processados em série decrescente de álcoois e, posteriormente, embebidos em parafina. Secções parafinadas de aproximadamente quatro micrômetros de espessura foram obtidas em micrótomo semiautomático, montadas em lâminas de vidro previamente limpas e desengorduradas. As técnicas de coloração utilizadas foram Hematoxilina & Eosina (H&E): identificam as principais lesões teciduais; Picrosírius-Hematoxilina: identifica o aumento de colágeno tecidual e coloração de Perls: identifica os estoques de ferro no tecido.

As quantificações morfométricas e possíveis alterações foram realizadas no Laboratório Multiusuários do NUPEB. Para cada coloração, foram capturadas 16 imagens por animal. As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Leica DM5000 acoplado à câmera digital. As análises foram realizadas com auxílio do Software Leica QWin Plus Versão 3.0, sendo avaliadas a celularidade total, a presença ou ausência de necrose, a infiltração conjuntiva e o aumento dos estoques de ferro do tecido muscular cardíaco e tecido pancreático.

4.14- Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo teste de normalidade Kolmogorov–Smirnov. Os dados que seguiram uma distribuição normal foram avaliados pela análise de variância univariada (ANOVA- *one way*) com o pós-teste de Bonferroni para determinar as diferenças entre os grupos. Os dados que não apresentaram uma distribuição normal foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns para determinar as diferenças entre os grupos. Os dados foram expressos em média desvio padrão. Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes.

As análises histológicas de ferro no pâncreas e no coração foram analisadas pelo teste t de Student's.

5- RESULTADOS

5.1 - Peso Corporal Final e Níveis Plasmáticos de Glicose, Frutosamina, e Insulina em Ratos Controle e Diabéticos

5.1.1- Peso Corporal Final

O modelo experimental estudado foi caracterizado, inicialmente, pela análise do peso corporal final, após a eutanásia dos animais. Observamos uma redução de até 34,6% no peso final dos animais dos grupos diabéticos (D, DF) quando comparados aos animais dos grupos controles (C e CF), porém sem diferença no tratamento com ferro (Figura 5).

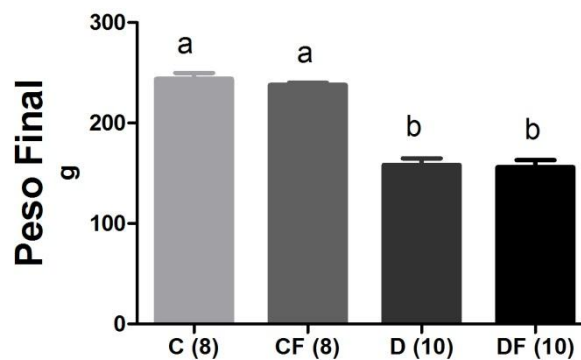


Figura 5: Efeito do peso corporal final no primeiro experimento. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão representadas por letras diferentes. C: Controle; CF: Controle e ferro dextran; D: Diabetes; DF: Diabetes e ferro dextran; entre parênteses: número de animais por grupo.

5.1.2- Glicemia Final

Ao analisarmos os dados de glicose sérica, notamos que a glicemia dos animais diabéticos é significativamente maior do que nos animais controles. Os animais diabéticos, no final do experimento, apresentaram valores de glicose 86,72% maiores que os animais não tratados. O tratamento com ferro não alterou os valores de glicemia (Figura 6).

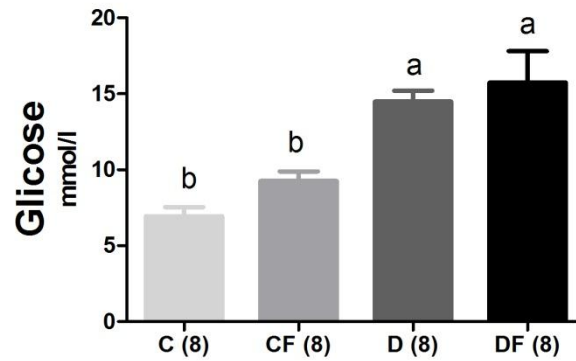


Figura 6: Efeito do tratamento com ferro dextran sobre a glicemia de ratos controle e diabéticos. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão representadas por letras diferentes. C: Controle; CF: Controle e ferro dextran; D: Diabetes; DF: Diabetes e ferro dextran; entre parênteses: número de animais por grupo.

5.1.3- Níveis de Frutosamina

Aumento da glicemia gera produtos de glicação avançada que têm como intermediários os produtos das ligações da glicose com proteínas plasmáticas. No nosso estudo, esses intermediários foram avaliados pela determinação dos níveis de frutosamina, os quais apresentaram aumento, quando comparamos os grupos diabéticos com os não diabéticos. Os grupos diabéticos aumentaram os níveis de frutosamina em 84,62% quando comparados com os grupos não tratados (Figura 7).

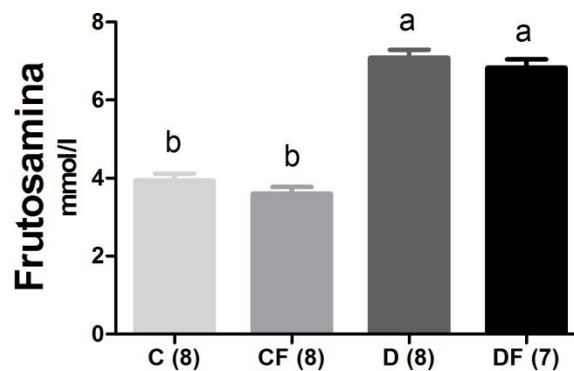


Figura 7: Níveis de frutosamina de ratos controle e diabéticos tratados com ferro dextran. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão representadas por letras diferentes. C: Controle; CF: Controle e ferro dextran; D: Diabetes; DF: Diabetes e ferro dextran; entre parênteses: número de animais por grupo.

5.1.4- Níveis de Insulina

Os níveis de insulina dos animais não diabéticos permaneceram com médias de $20,8 \pm 8,40$ e $28,06 \pm 10,17$ pmol/l para os grupos C e CF, respectivamente. Os grupos D e DF apresentaram níveis de insulina 3,36 vezes menores com os comparados com os grupos C e CF com médias de $20,80 \pm 8,40$; $28,06 \pm 10,17$; $8,54 \pm 5,03$ e $6,20 \pm 1,33$ pmol/l para os grupos C, CF, D e DF, respectivamente (Figura 8).

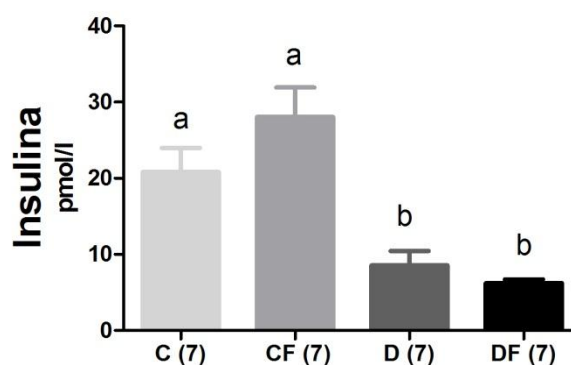


Figura 8: Níveis de insulina de ratos controles e diabéticos tratados com ferro dextran. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão representadas por letras diferentes. C: Controle; CF: Controle e ferro dextran; D: Diabetes; DF: Diabetes e ferro dextran; entre parênteses: número de animais por grupo.

5.2 - Níveis de Ferro Sérico, Capacidade Latente de Ligação de Ferro, Capacidade Total de Ligação de Ferro, Transferrina, Índice de Saturação de Transferrina e Ferro Tecidual (no Fígado) de Ratos Controle e Diabéticos Submetidos ao Tratamento com Ferro Dextran.

Para avaliarmos a homeostase de ferro utilizamos os parâmetros: ferro sérico; capacidade latente de ligação do ferro; capacidade total de ligação do ferro; transferrina e índice de saturação de transferrina. Apenas a capacidade latente de ligação de ferro, que representa os sítios de ligação da transferrina, se modificou. Os grupos tratados com ferro dextran diminuíram em 28,91% os sítios de ligação, em relação aos grupos não tratados com ferro. Os estoques

de ferro, no fígado, aumentaram 145,7% do grupo CF em relação ao grupo C e 155,7% do grupo DF em relação ao grupo D (Tabela 2).

Tabela 2: Avaliação dos níveis de Ferro Sérico, Capacidade Total de Ligação do Ferro (CTLF), Transferrina, Índice de Saturação de Transferrina (IST %), Capacidade Latente de Ligação de Ferro (CLLF) e Ferro no Fígado de ratos.

Grupos	Ferro sérico ($\mu\text{g/dl}$)	CTLF ($\mu\text{g/dl}$)	Transferrina ($\mu\text{g/dl}$)
C	216,90 \pm 50,14 (7)	325,90 \pm 51,63 (7)	228,10 \pm 36,14 (7)
CF	238,70 \pm 53,21 (7)	323,70 \pm 50,28 (7)	226,60 \pm 35,12 (8)
D	222,10 \pm 56,61 (5)	348,10 \pm 47,98 (5)	243,70 \pm 33,59 (5)
DF	262,60 \pm 81,88 (5)	345,90 \pm 83,62 (5)	242,20 \pm 58,53 (5)

Grupos	IST %	CLLF ($\mu\text{g/dl}$)	Ferro no Fígado ($\text{mg}/100\text{mg}$ proteína)
C	65,98 \pm 7,27 (7)	113,30 \pm 12,31 ^a (7)	0,07 \pm 0,02 ^b (7)
CF	72,99 \pm 6,85 (7)	85,00 \pm 11,31 ^b (7)	1,02 \pm 0,21 ^a (7)
D	63,18 \pm 7,84 (5)	123,50 \pm 17,02 ^a (5)	0,07 \pm 0,04 ^b (7)
DF	75,21 \pm 8,95 (5)	83,30 \pm 25,67 ^b (5)	1,09 \pm 0,15 ^a (7)

Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão representadas por letras diferentes. C: Controle; CF: Controle e ferro dextran; D: Diabetes; DF: Diabetes e ferro dextran; entre parênteses: número de animais por grupo.

5.3 - Geração de Espécies Reativas de Oxigênio em Granulócitos de Ratos Controle e Diabéticos Submetidos ao Tratamento com Ferro Dextran.

Avaliamos a produção de ERO por granulócitos, de ratos não diabéticos e diabéticos, submetidos a um tratamento com ferro dextran. Os granulócitos dos grupos D e DF apresentam um aumento quatro vezes maior na produção

de EROS quando comparados aos grupos C e CF. O tratamento com ferro (CF e DF) também alterou a produção de ERO potencializando a sua produção em três vezes em relação aos grupos C e D (Figura 9).

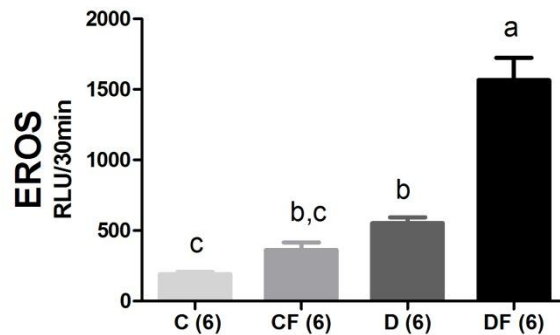


Figura 9: Produção de ERO, por granulócitos, de ratos controle e diabéticos tratados com ferro dextran. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão representadas por letras diferentes. C: Controle; CF: Controle e ferro dextran; D: Diabetes; DF: Diabetes e ferro dextran; entre parênteses: número de animais por grupo.

5.4 - Efeito da Suplementação com Ferro sobre o Peso, Processos Inflamatórios, Status Oxidante e Antioxidante no Coração

5.4.1- Peso Final em Coração

No coração, inicialmente observamos que os grupos diabéticos modificaram o peso do coração. O peso deste órgão aumentou, 71,8%, quando comparamos os animais do grupo controle (C) com os diabéticos (D e DF) (Figura 10).

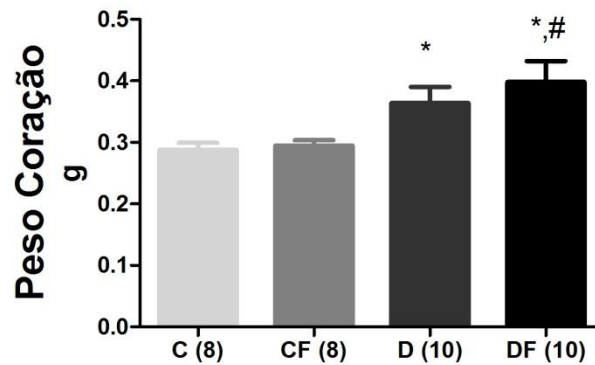


Figura 10: Peso final, do coração, de ratos controle e diabéticos tratados com ferro dextran. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. C: Controle; CF: Controle e ferro dextran; D: Diabetes; DF: Diabetes e ferro dextran; * diferença em relação ao grupo C pelo teste de Dunns; # diferença em relação ao grupo CF pelo teste de Dunns; entre parênteses: número de animais por grupo.

5.4.2- Níveis de Ferro no Coração

Observamos um aumento significativo, 81,53%, de ferro tecidual para os grupos tratados com ferro dextran comparando com os grupos não tratados (Figura 11). Ao analisarmos histologicamente somente os grupos tratados com ferro, observamos que o grupo DF aumenta significativamente, 190,43%, os teores de ferro comparados com CF (Figura 12).

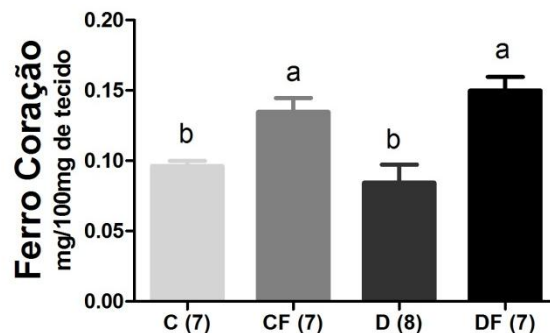


Figura 11: Determinação bioquímica dos níveis de ferro em coração de ratos controle e diabéticos tratados com ferro dextran. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão representadas por letras diferentes. C: Controle; CF: Controle e ferro dextran; D: Diabetes; DF: Diabetes e ferro dextran; entre parênteses: número de animais por grupo.

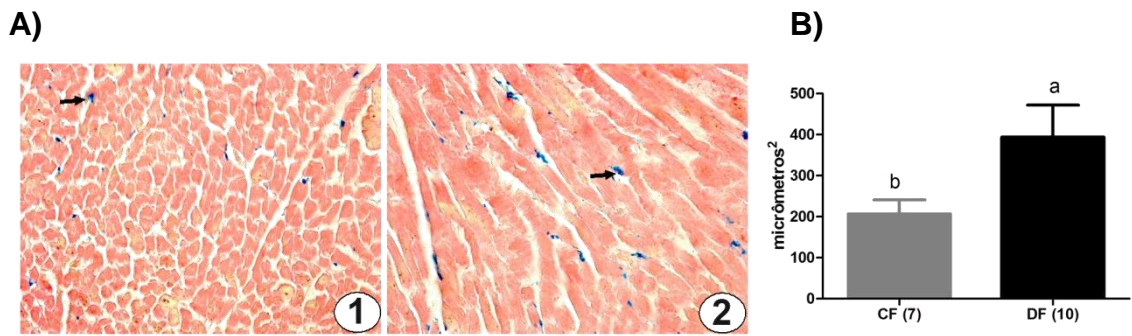


Figura 12: **A)** Fotomicrografias de cortes histológicos do coração. Coloração de Perls. 1) Grupo Controle e ferro dextran; 2) Grupo Diabetes e ferro dextran. Notar presença de depósitos de ferro (→). **B)** Área ocupada pelos depósitos de ferro no coração de ratos controle e diabéticos tratados com ferro dextran. CF: Controle e ferro dextran; DF: Diabetes e ferro dextran. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão representadas por letras diferentes; entre parênteses: número de animais por grupo.

5.4.3- Avaliação histológica no coração

O coração dos animais não apresentou alterações macroscópicas entre os grupos, mas apenas um aumento no peso relativo desse órgão. A avaliação microscópica primária não evidenciou edema, processo degenerativo ou necrose no tecido muscular cardíaco. A quantificação celular desse tecido evidenciou um aumento no número de células e focos inflamatórios, nos grupos D e DF (Figura 13). O quadro histológico geral, para os grupos C e CF, apresentou tecido muscular cardíaco intacto quanto à morfologia nuclear e celular e quantidade normal de células inflamatórias residentes.

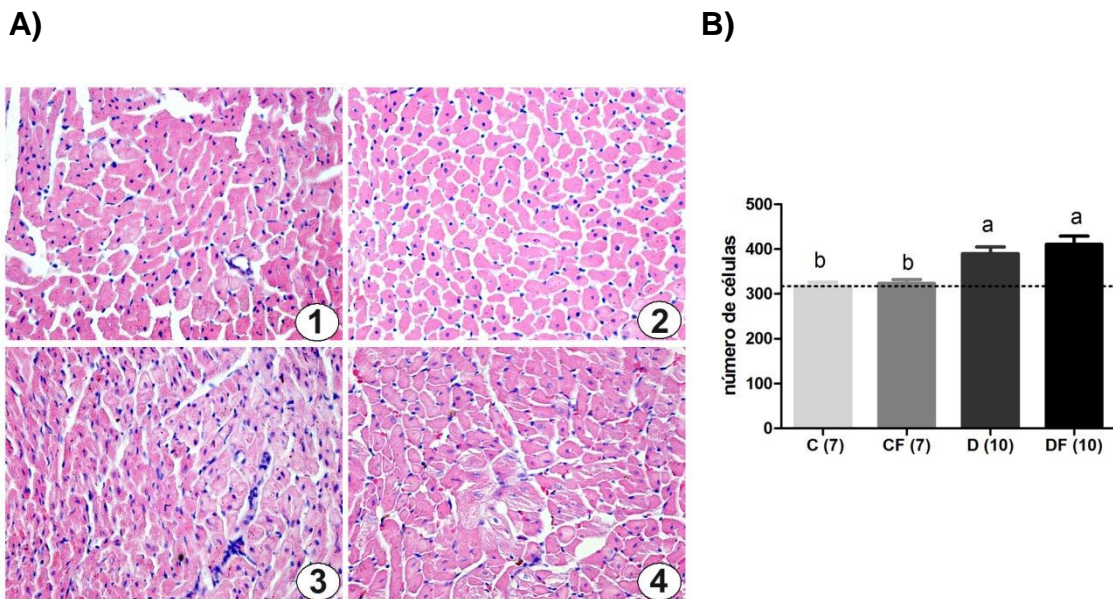


Figura 13: A) Fotomicrografias de cortes histológicos do coração. Hematoxilina e Eosina. 1) Grupo Controle; 2) Grupo Controle e ferro dextran; 3) Grupo Diabetes e 4) Grupo Diabetes e ferro dextran. **B)** Número de células, no coração, de ratos controles e diabéticos tratados com ferro dextran. C: Controle; CF: Controle e ferro dextran; D: Diabetes; DF: Diabetes e ferro dextran. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão representadas por letras diferentes; entre parênteses: número de animais por grupo; (****): limite de normalidade no número de células, em relação ao grupo C, no tecido muscular cardíaco.

Ao analisarmos os cortes histológicos com Picrosírus-Hematoxilina, uma coloração especial para demonstração de colágeno, observamos um aumento de 33,41% no tecido conjuntivo dos grupos diabéticos, evidenciando a presença de fibrose para esses grupos (Figura 14).

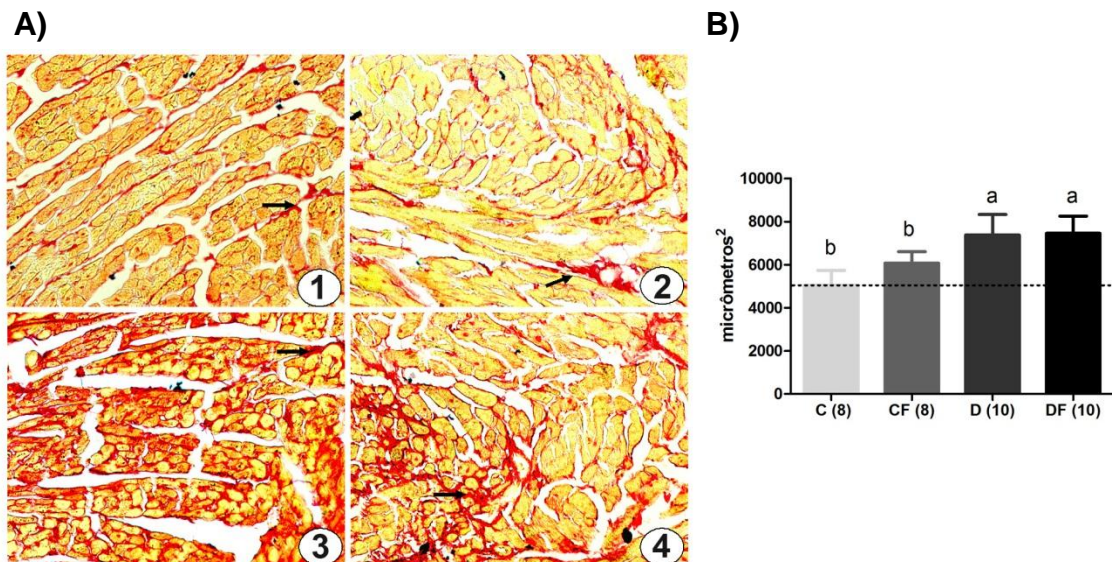


Figura 14: A) Fotomicrografias de cortes histológicos do coração. Picosírius - Hematoxilina. 1) Grupo Controle; 2) Grupo Controle e ferro dextran; 3) Grupo Diabetes e 4) Grupo Diabetes e ferro dextran. Notar presença de tecido conjuntivo (→). B) Área ocupada pelos depósitos de colágeno, no coração, de ratos controle e diabéticos tratados com ferro dextran. C: Controle; CF: Controle e ferro dextran; D: Diabetes; DF: Diabetes e ferro dextran. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão representadas por letras diferentes; entre parêntese: número de animais por grupo; (.....): limite de normalidade entre o depósito de tecido conjuntivo em relação ao grupo C, no coração.

5.4.4- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em coração

A dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) são um biomarcador que mede a peroxidação lipídica, revelando danos oxidativo no tecido. No coração, os grupos diabéticos e tratados com ferro dextran por 21 dias não foram capazes de alterar os níveis de TBARS. As médias dos grupos C, CF, D e DF foram de $5,39 \pm 1,761$; $5,93 \pm 1,30$; $5,71 \pm 1,52$; $5,63 \pm 0,76$ U/ml/mg proteína respectivamente (Figura 15).

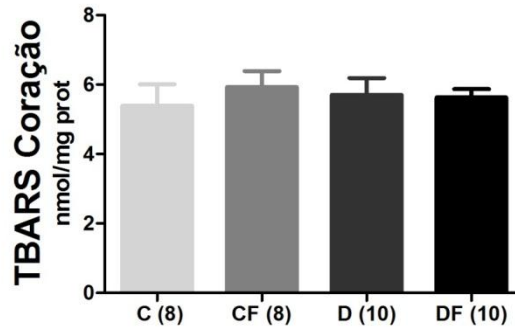


Figura 15: Níveis de TBARS, no coração, de ratos controle e diabéticos tratados com ferro dextran. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. C: Controle; CF: Controle e ferro dextran; D: Diabetes; DF: Diabetes e ferro dextran; entre parênteses: número de animais por grupo.

5.4.5- Proteína Carbonilada em Coração

Na figura 16, analisamos um marcador da oxidação de proteína por ERO, a proteína carbonilada, no coração dos animais. Observamos um aumento significativo, 157,85%, na concentração da proteína carbonilada nos animais do grupo DF em comparação com os animais do grupo C. Com médias de $18,27 \pm 2,73$; $16,67 \pm 3,89$; $18,59 \pm 1,26$; $28,84 \pm 7,66$ U/ml/mg proteína para os grupos C, CF, D e DF respectivamente.

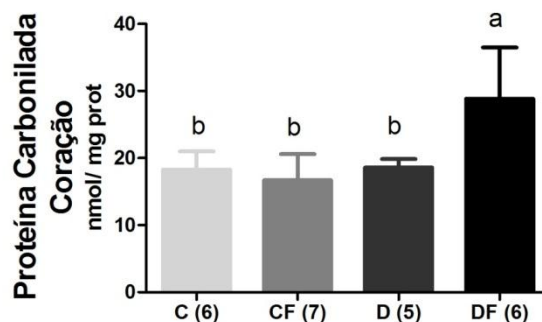


Figura 16: Níveis de proteína carbonilada, no coração, de ratos controle e diabéticos tratados com ferro dextran. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão representadas por letras diferentes. C: Controle; CF: Controle e ferro dextran; D: Diabetes; DF: Diabetes e ferro dextran; entre parênteses: número de animais por grupo.

5.4.6- Atividade Antioxidante em coração

Ao analisarmos a atividade de biomarcadores antioxidantes, Catalase e Superóxido Dismutase e Glutaciona Total, não encontramos diferença estatística entre os grupos analisados (Tabela 3).

Tabela 3: Avaliação dos níveis de Glutaciona Total, Catalase e Superóxido Dismutase em coração de ratos.

Grupos	Glutaciona Total (nmol/ml)	Catalase (U/mg proteína)	Superóxido Dismutase (U/mg proteína)
C (n)	56,88 ± 4,39 (8)	12,28 ± 1,90 (8)	0,34 ± 0,05 (8)
CF (n)	59,08 ± 2,96 (8)	11,57 ± 2,71 (8)	0,35 ± 0,04 (8)
D (n)	62,71 ± 6,95 (10)	9,47 ± 3,88 (10)	0,30 ± 0,03 (10)
DF (n)	59,89 ± 5,05 (10)	10,74 ± 4,01 (10)	0,35 ± 0,13 (10)

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. C: Controle; CF: Controle e ferro dextran; D: Diabetes; DF: Diabetes e ferro dextran; entre parênteses: número de animais por grupo.

5.5- Efeito da suplementação com ferro sobre o peso, processos inflamatórios, *status* oxidante e antioxidante no pâncreas.

5.5.1- Peso final no Pâncreas

No pâncreas, inicialmente observamos que os grupos diabéticos modificaram o peso final deste órgão, com uma diminuição de 66,7%, quando comparamos os animais do grupo controle (C) com os do grupo DF (Figura 10).

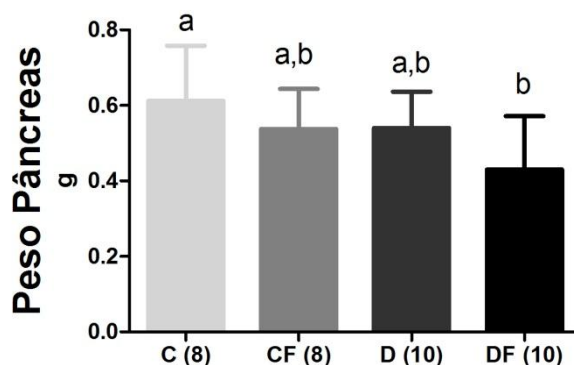


Figura 17: Peso final, do pâncreas, de ratos controle e diabéticos tratados com ferro dextran. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão representadas por letras diferentes. C: Controle; CF: Controle e ferro dextran; D: Diabetes; DF: Diabetes e ferro dextran; entre parênteses: número de animais por grupo.

5.5.2- Níveis de ferro no pâncreas

O teor de ferro no pâncreas foi avaliado pela redução dos íons Fe^{3+} a Fe^{2+} pela hidroxilamina e por avaliação histológica específica para ferro, coloração de Perls. Observamos um aumento significativo, 822,74%, de ferro no pâncreas para os grupos tratados com ferro dextran (CF e DF) comparando com os grupos não tratados (C e D) (Figura 18). Na análise histológica observamos que para os grupos tratados com ferro houve um aumento significativo, 164,15%, no teor de ferro do grupo DF, se comparado com CF (Figura 19).

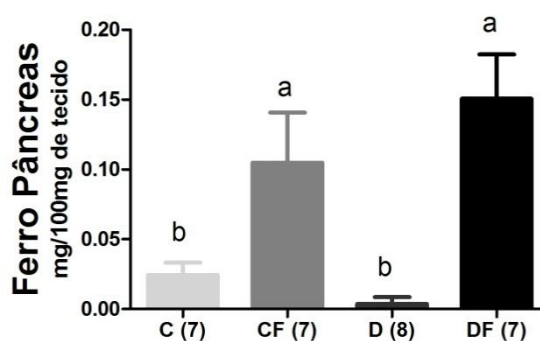


Figura 18: Níveis de ferro tecidual, em pâncreas, de ratos controles e diabéticos tratados com ferro dextran. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão representadas por letras diferentes. C: Controle; CF: Controle e ferro dextran; D: Diabetes; DF: Diabetes e ferro dextran; entre parênteses: número de animais por grupo.

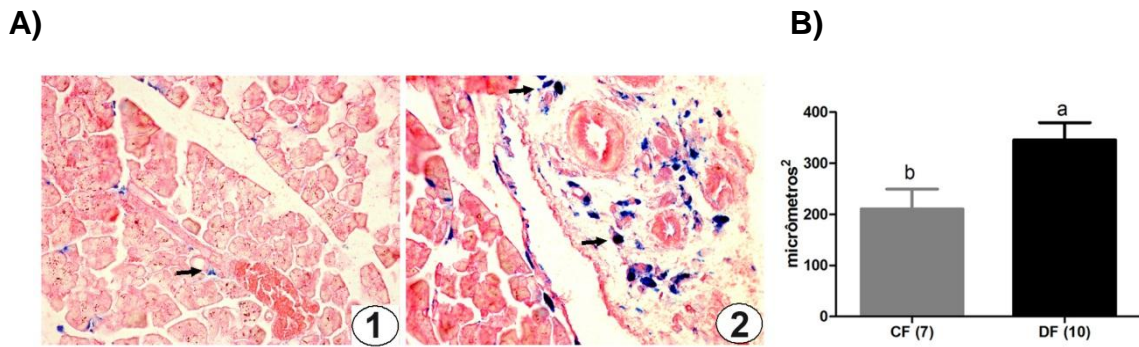


Figura 19: A) Fotomicrografias de cortes histológicos no pâncreas. Coloração de Perls. 1) Grupo Controle e ferro dextran; 2) Grupo Diabetes e ferro dextran. Notar presença de depósitos de ferro (→). **B)** Área ocupada pelos depósitos de ferro, no pâncreas, de ratos controle e diabéticos tratados com ferro dextran. CF: Controle e ferro dextran; DF: Diabetes e ferro dextran. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão representadas por letras diferentes; entre parênteses: número de animais por grupo.

5.5.3- Avaliação histológica no pâncreas

O pâncreas dos animais não apresentou alterações macroscópicas entre os grupos estudados, mas apenas uma diminuição no peso desse órgão. A avaliação microscópica primária não evidenciou edema, processo degenerativo ou necrose no tecido pancreático. A determinação do número de células nesse tecido evidenciou um aumento de 49,8% no número de células no pâncreas nos grupos CF e DF quando comparados com C e D (Figura 20).

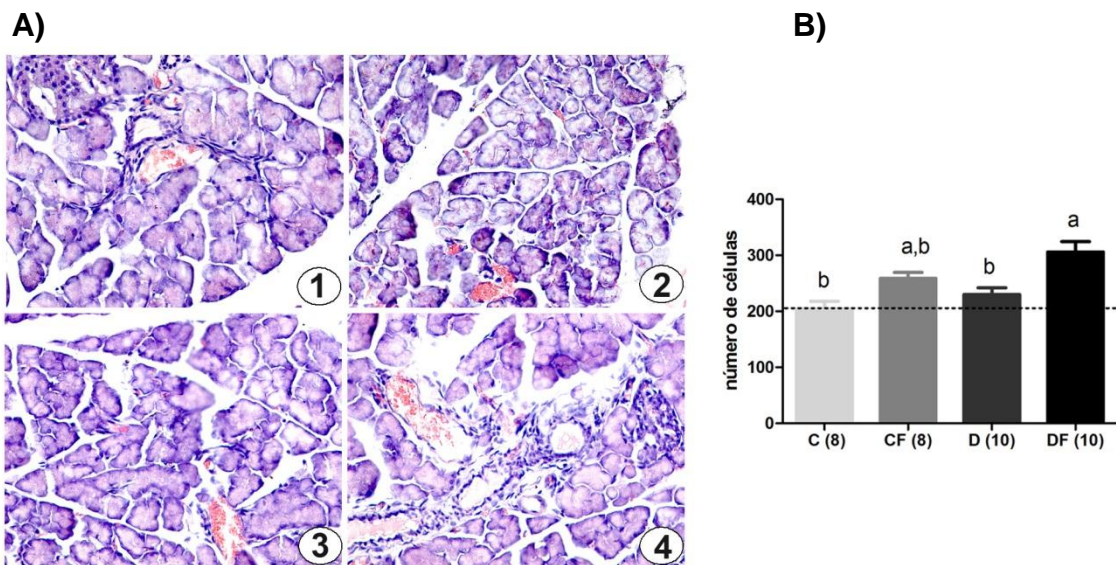


Figura 20: A) Fotomicrografias de cortes histológicos no pâncreas. Hematoxilina e Eosina 1) Grupo Controle; 2) Grupo Controle e ferro dextran; 3) Grupo Diabetes e 4) Grupo Diabetes e ferro dextran. **B)** Número de células, no pâncreas, de ratos controles e diabéticos tratados com ferro dextran. C: Controle; CF: Controle e ferro dextran; D: Diabetes; DF: Diabetes e ferro dextran. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão representadas por letras diferentes; entre parênteses: número de animais por grupo. (): limite de normalidade do número de células no tecido pancreático em relação ao grupo C.

Ao analisarmos os cortes histológicos com uma coloração especial para demonstração de colágeno não encontramos diferença estatística entre os grupos analisados (Figura 21).

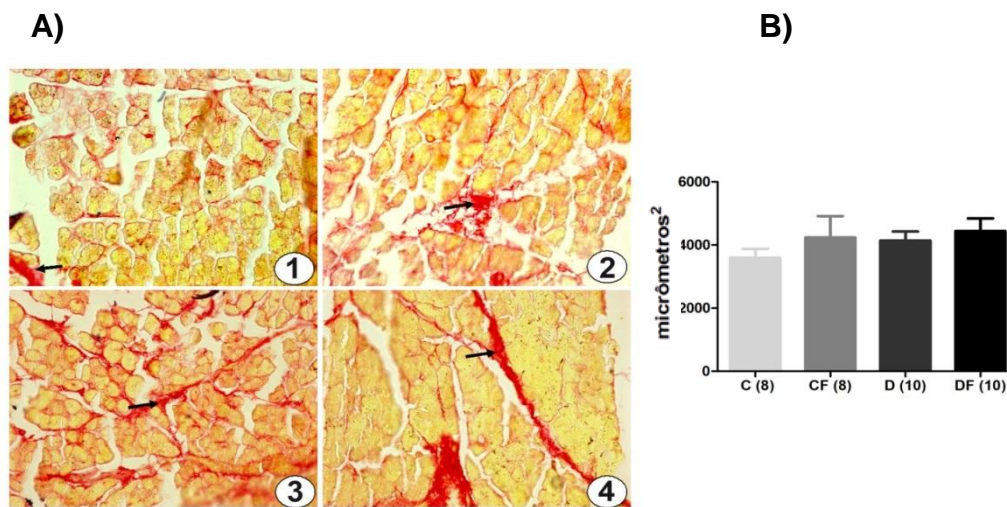


Figura 21: **A)** Fotomicrografias de cortes histológicos no pâncreas. Picrosirius - Hematoxilina 1) Grupo Controle; 2) Grupo Controle e ferro dextran; 3) Grupo Diabetes (D) e 4) Grupo Diabetes e ferro dextran (DF). Notar presença de tecido conjuntivo (→). **B)** Área ocupada pelos depósitos de ferro, no pâncreas de ratos controle e diabéticos tratados com ferro dextran. C: Controle; CF: Controle e ferro dextran; D: Diabetes; DF: Diabetes e ferro dextran; entre parênteses: número de animais por grupo.

5.5.4-Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no pâncreas

Na Figura 22, investigamos os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), no pâncreas dos animais não diabéticos e diabéticos, submetidos ou não ao tratamento com ferro dextran. Observamos um aumento significativo, 190,24% na concentração de TBARS em animais dos grupos diabetes (D e DF) em comparação aos animais dos grupos controle (C e CF), o tratamento com ferro não foi capaz alterar significativamente as concentrações de TBARS.

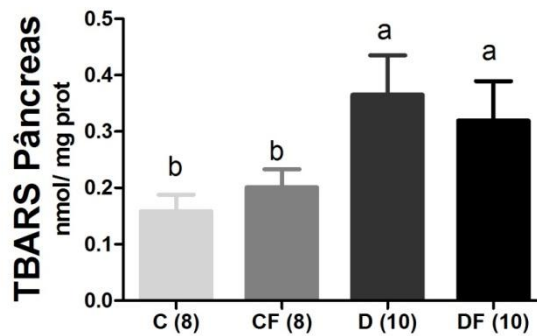


Figura 22: Níveis de TBARS, no pâncreas, de ratos controle e diabéticos tratados com ferro dextran. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão representadas letras diferentes. C: Controle; CF: Controle e ferro dextran; D: Diabetes; DF: Diabetes e ferro dextran; entre parênteses: número de animais por grupo.

5.5.5- Proteína Carbonilada no Pâncreas

Outro parâmetro bioquímico utilizado para verificar se os grupos diabéticos e tratados com ferro alteraram o balanço oxidativo foi a carbonilação de proteínas. Na Figura 23, analisamos a carbonilação de proteínas, no pâncreas dos animais diabéticos e tratados ou não com ferro. Verificamos um aumento significativo, 188,42%, na concentração da proteína carbonilada nos animais dos grupos D e DF em comparação com os animais dos grupos C e CF. Os grupos tratados com ferro (CF e DF) também aumentaram significativamente, 141,37%, os níveis de proteína carbonilada comparado com os grupos não tratados (C e D). Os dois tratamentos concomitantemente potencializaram a carbonilação de proteínas, o grupo DF apresentou um aumento, 315,16%, em relação ao grupo C.

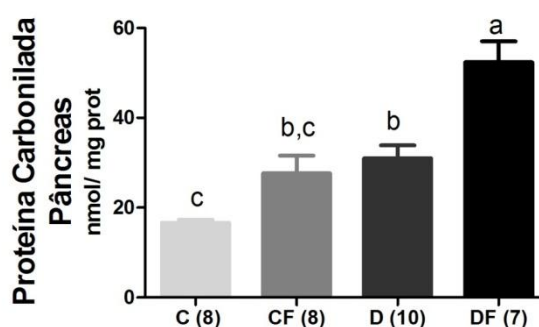


Figura 23: Avaliação dos níveis de Proteína Carbonilada, no pâncreas, de ratos controles e diabéticos tratados com ferro dextran. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão representadas por letras diferentes. C: Controle; CF: Controle e ferro dextran; D: Diabetes; DF: Diabetes e ferro dextran; entre par: número de animais por grupo.

5.5.6- Atividade Antioxidante no pâncreas

Ao analisarmos a atividade dos biomarcadores antioxidantes, Catalase, Superóxido Dismutase e Glutathiona Total não encontramos diferença estatística entre os grupos analisados (Tabela 4).

Tabela 4: Avaliação dos níveis de Glutathiona Total, Catalase e Superóxido Dismutase em ratos.

Grupos	Glutathiona Total (nmol/ml)	Catalase (U/mg proteína)	Superóxido Dismutase (U/mg proteína)
C (n)	0,08 \pm 0,07 (8)	2,88 \pm 1,40 (8)	0,24 \pm 0,04 (8)
CF (n)	0,11 \pm 0,07 (8)	3,14 \pm 1,14 (8)	0,27 \pm 0,04(8)
D (n)	0,05 \pm 0,06 (10)	2,23 \pm 0,66 (10)	0,31 \pm 0,06(8)
DF (n)	0,04 \pm 0,03 (10)	2,00 \pm 0,53 (10)	0,27 \pm 0,04 (10)

Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. C: Controle; CF: Controle e ferro dextran; D: Diabetes; DF: Diabetes e ferro dextran; entre parênteses: número de animais por grupo.

6- DISCUSSÃO

A streptozotocina (STZ) é uma nitrosoamida que nas células do pâncreas é convertida em metabólitos, um dos quais: o óxido nítrico (NO). O NO reage com o oxigênio para produzir N_2O_3 e outros óxidos de nitrogênio, que danificam o DNA e proteínas. Lesões no DNA ativam a enzima de reparo chamada poli (ADP-ribose) polimerase I (PARP I), que utiliza grandes quantidades de NAD^+ como substrato e, eventualmente, o ATP, causando necrose e resistência à insulina (Lenzen, 2008; Dyke *et al.*, 2010). Observamos uma diminuição para os ratos tratados com STZ dos níveis de insulina confirmando o que é descrito pela literatura sobre a ação desse fármaco. A diferença nos níveis de glicose dos ratos diabéticos encontrada no presente estudo está de acordo com o trabalho de SILVA *et al.* (2011c), que encontrou um aumento para os níveis de glicose em ratos Fischer com diabetes induzida com STZ durante 10 dias em comparação com ratos controle.

Níveis elevados de frutossamina em pacientes diabéticos correspondem a uma maior glicação de albumina devido às concentrações elevadas de glicose. A hiperglicemia e um quadro de glicação de proteínas elevado têm sido sugeridos como indutores da formação de radicais livres. Estudos associam o aumento do conteúdo de frutossamina sérica com danos oxidativos em animais diabéticos (Roy, Sem e Chakraborti, 2008).

Estudos indicam o aumento dos estoques de ferro, em modelos experimentais, a partir da suplementação de ferro via oral, em dietas como ferro carbonílico, ou por fármacos intravenosos ou intraperitoniais, como ferro dextran, ferro gluconato, ferro sacarato. Para aumentar os estoques de ferro em ratos neste estudo utilizamos injeções intraperitoniais de ferro dextran. O ferro dextran é uma solução colóide de óxido-hidróxido férrico com dextran polimerizado utilizado em suplementação intravenosa em humanos em caso de anemia ferropriva (Cançado, Lobo e Friedrich, 2010).

Com relação às formulações injetáveis, o ferro dextran e sulfato ferroso são os mais utilizados. No modelo de diabetes, Miron *et al.* (2007) para avaliar a atividade das enzimas NTPDase e 5'-nucleotidase em animais diabéticos

com sobrecarga de ferro, confirmaram essa sobrecarga com ferro dextran. Anteriormente, Holbein (1980) estudou o metabolismo de ferro dextran em camundongos. O ferro dextran - ferro ligado a um polímero de glicose - é rapidamente removido da circulação pelas células do sistema retículo endotelial. Nas primeiras seis horas, o conteúdo sérico de ferro encontra-se elevado; depois de 24 horas da injeção, há diminuição do ferro no soro e aumento nas células do sistema retículo endotelial do fígado e baço; o ferro ligado ao dextran é processado pelas células do sistema retículo endotelial antes de ser liberado para o *pool* de transferrina, sendo distribuído aos demais tecidos.

Nossos dados demonstram que o tratamento com as injeções de ferro dextran foram eficazes em promover o excesso de ferro no coração e pâncreas com um aumento médio de cerca de duas e dez vezes, respectivamente. Esses resultados corroboram com estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa que avaliaram fígados tratados com ferro dextran (Turbino Ribeiro *et al.*, 2003, Silva *et al.*, 2011a). Observamos também que os animais diabéticos captaram mais ferro, no coração e pâncreas, que os não diabéticos demonstrando que em um quadro de diabetes há um maior acúmulo de ferro potencializando danos oxidativo.

Os parâmetros séricos referentes ao ferro não se alteraram, como previsto, pois os ratos estudados foram eutanasiados cinco dias após a última dose de ferro dextran, ultrapassando o tempo de meia-vida descrito pela literatura para o ferro dextran no soro (Holbein, 1980; Cançado, Lobo e Friedrich, 2010). Não há relatos, na literatura, de modelos experimentais que aumente os estoques de ferro tecidual, mantendo os níveis séricos de ferro dentro da normalidade. Esse modelo caracteriza-se como uma sobrecarga de ferro e torna-se importante para futuras investigações que correlacionam exposição excessiva ao ferro, observando que a fortificação de ferro indiscriminada em alimentos tem sido uma estratégia para aumentar a ingestão desse mineral (Salim *et al.*, 2010).

Estudos indicam que a sobrecarga de ferro no pâncreas, comum em patologias como a talassemia, é um forte preditor de toxicidade das células

beta, os níveis de saturação da transferrina e idade do indivíduo também influenciam a regulação da glicose (Chu *et al.*, 2007; Noetzli *et al.*, 2011).

O que também agrava o diabetes é aumento de AGEs em um quadro de hiperglicemia, resultando em uma maior ativação de neutrófilos (Gawlowski *et al.*, 2007). A relação entre diabetes e inflamação tem sido muito estudada, componentes inflamatórios ativam, em um quadro de diabetes descompensado, o sistema imune, tornando-o mais susceptível aos danos oxidativos, visto que células do sistema imunológico produzem ERO como mecanismo de defesa (Marin *et al.*, 2011; Romagnoli *et al.*, 2010).

Neste estudo com ferro dextran e STZ aumentou gradualmente a produção de ERO, via ativação de neutrófilos, nos grupos tratados somente com ferro, diabético e diabético tratado com ferro em relação ao grupo controle. A hiperglicemia pode ativar neutrófilos e monócitos, resultando em um aumento da resposta inflamatória e dano tecidual. ERO é essencialmente produzido através da ativação de neutrófilos periféricos, o que pode causar danos em componentes celulares essenciais, o que pode causar complicações vasculares em pacientes diabéticos (Marin *et al.*, 2011). Estudos que avaliam o efeito dos danos oxidativos da suplementação de ferro associado com diabetes são escassos. Nossos resultados são relevantes, visto que o diabetes já é capaz de aumentar os estoques de ferro e a produção de ERO (Roy, Sen e Chakraborti, 2008) e que uma suplementação indiscriminada desse mineral pode potencializar os efeitos oxidativos quando estudamos a ativação de ERO em neutrófilos. Assim, podemos sugerir que no diabetes há um aumento na produção de ERO em granulócitos e que esse aumento pode ser potencializado através do tratamento com ferro dextran.

Os efeitos oxidantes sobre o coração foram mensurados através da determinação da peroxidação lipídica e da carbonilação de proteínas. Os níveis de TBARS não se alteraram provavelmente porque o tempo de tratamento não foi eficiente para alterar a peroxidação de lipídios. Quando avaliamos a carbonilação de proteínas, observamos um aumento em seus níveis. Esse parâmetro tem sido correlacionado, no diabetes, com disfunção cardíaca devido à perda da atividade de proteínas que participam da contração e ou relaxamento do músculo cardíaco (Shao *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011 a).

Para avaliarmos um possível efeito do ferro no coração, de ratos controle e diabéticos, determinamos os estoques de ferro e suas possíveis alterações teciduais, com uma análise histológica. Os nossos resultados demonstraram que o coração de animais tratados com ferro dextran apresentaram um aumento nas concentrações de ferro em relação aos grupos não tratados. A análise histológica demonstra que o diabetes foi capaz de potencializar o acúmulo de ferro; ratos diabéticos apresentaram valores maiores nos depósitos de ferro quando comparamos os grupos DF com CF.

O aumento dos depósitos de ferro em hepatócitos de animais diabéticos foi observado em estudos anteriores afirmando que a homeostase do ferro é alterada em um quadro de diabetes (Roy, Sen e Chakraborti, 2008). Zhao *et al.* (2010) ao estudarem ratos diabéticos tratados com STZ e receptores de transferrina observaram que houve um aumento nos depósitos de ferro em cardiomiócitos induzidos, pelo menos em parte, pelo aumento dos receptores de transferrina corroborando com os nossos resultados para o coração.

Ao avaliarmos as alterações histológicas no coração, observamos um aumento no número de células e de tecido conjuntivo, sugerindo um aumento de infiltrado inflamatório e fibrose nos animais tratados com STZ. Na literatura, observamos que a cardiomiopatia diabética tem como uma das possíveis alterações morfológicas do tecido muscular cardíaco a deposição de tecido conjuntivo e maior recrutamento de células inflamatórias. Estudos associam fibrose com vias de sinalização de PPAR- γ e ECA-2 potencializando os danos oxidativos em cardiomiócitos (Shu-mei *et al.*, 2010; Aguilar, Ventura e Rodríguez, 2011).

Estudos demonstram que o aumento nos depósitos de ferro, no coração, pode levar ao desenvolvimento de lesão cardíaca induzida pela angiotensina II com consequente desenvolvimento de fibrose (Ishizaka *et al.*, 2002) e que um aumento da produção de radicais livres é dose dependente da concentração de ferro (Bartfay e Bartfay, 2000).

Outra alteração observada foi a peroxidação de lipídios e de carbonilação de proteínas no pâncreas. Os níveis de TBARS e proteínas carboniladas aumentaram nos grupos diabéticos. A suplementação com ferro também aumentou a carbonilação de proteínas, confirmando um maior dano

oxidativo no nosso modelo experimental. O aumento do estresse oxidativo é um fator amplamente aceito no desenvolvimento e progressão da diabetes e as células pancreáticas de animais diabéticos também estão propensas ao aumento dos efeitos oxidantes (Yazdanparast, Ardestani e Jamshidi, 2007; Ardestani, 2008; Sefi *et al.*, 2011).

Dados histológicos no pâncreas, obtidos no presente estudo, indicam que o nosso modelo de suplementação de ferro causou um aumento nos depósitos de ferro nos animais do grupo DF quando comparados com CF, sem causar fibrose, sugerindo, assim, um modelo experimental seguro para avaliar as funções metabólicas de sobrecarga de ferro e diabetes induzida por STZ. Ao avaliarmos o número de células desse órgão, observamos um aumento no número de células no grupo DF em relação ao grupo C, sugerindo um aumento do infiltrado inflamatório.

Ehnes *et al.* (2007), ao investigarem o número de macrófagos nas ilhotas de pacientes com diabetes tipo 2, observaram um aumento dessas células inflamatórias devido a uma desregulação de fatores inflamatórios (interleucina 6 e 8). No presente estudo, observamos que nas ilhotas pancreáticas também há um aumento na migração de neutrófilos.

Danos oxidativos são determinados através da geração de radicais livres de oxigênio e também pela capacidade antioxidante das células. Os órgãos podem apresentar diferenças consideráveis na sua susceptibilidade para danos oxidativos. Ao avaliarmos a capacidade antioxidante, pela determinação da atividade da glutathione total e das enzimas: catalase e superóxido dismutase, observamos que tanto o coração quanto o pâncreas não alteraram os valores dos biomarcadores antioxidantes, o que nos leva a sugerir que, nesse modelo, no coração e no pâncreas, não há uma resposta imediata que reverta o quadro de estresse oxidativo.

Em conjunto, os dados sugerem que a suplementação com ferro favorece o equilíbrio a favor do estado pró-oxidante, mas, no período avaliado, não intensificou os danos histológicos causados pelo diabetes. Os dados também sugerem maior captação de ferro pelo coração e pâncreas induzido pelo diabetes e maior ativação de neutrófilos, no sangue periférico, de ratos suplementados com ferro.

7- CONCLUSÕES

A dose de ferro dextran utilizada promoveu aumento de estoques de ferro no coração e pâncreas sendo o aumento maior no grupo diabético.

Houve um aumento na formação de ERO por neutrófilos em ratos diabéticos, sendo potencializado no grupo Diabetes Ferro.

A suplementação com ferro potencializou o dano oxidativo em proteínas no coração e no pâncreas de ratos diabéticos. Peroxidação de lipídios só se observou no pâncreas.

O tratamento com ferro dextran e diabetes não alterou a atividade antioxidante determinada por glutathione total, catalase e superóxido dismutase, nesse modelo experimental.

Dados histológicos mostraram que o diabetes promove aumento de infiltrado inflamatório no coração e no pâncreas, sem alterações microscópicas como edema, processo degenerativo e necrose. No coração foi observado um quadro de fibrose nos ratos dos grupos D e DF. Com relação à suplementação não houve alterações do quadro histológico nos dois órgãos.

Em resumo, este estudo demonstra que a suplementação com ferro promove um aumento da produção de ERO por neutrófilos, um aumento de danos oxidativo em coração e pâncreas sem alterações histológicas importantes como: processo degenerativo, fibrose e necrose. Além disso, mostrou que no diabetes ocorre um maior depósito de ferro sugerindo uma alteração no processo de captação desse metal.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI H. *Catalase in vitro*. *Methods Enzymol.* 105:121-6,1984.

AISEN. P.; ENNS C.; WESSLING-RESNICK M. *Chemistry and Biology of Eukaryotic Iron Metabolism*. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 33: 940–59, 2001.

AGUILAR, C.; VENTURA, F.; RODRÍGUEZ, L.D. *El Aumento de La Expresión del Arnm de la Enzima Convertidora de Angiotensina i Homóloga (Eca-2) Inducido por Atorvastatina se Asocia a Menor Fibrosis e Hipertrofia Ventricular Izquierda en un Modelo de Cardiomiopatía Diabética*. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 28(2): 264-72, 2011.

ARDESTANI A.; YAZDANPARAST R.; JAMSHIDI S.H. *Therapeutic Effects of Teucrium Polium Extract on Oxidative Stress in Pancreas of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats*. *J Med Food.* 11(3):525-32, 2008.

ATANASIU, V.; MANOLESCU, B.; STOIAN, I. *Hepcidin – Central Regulator of Iron Metabolism*. *Eur J Haematol.* 78: 1–10, 2007.

BARTFAY, W.J.; BARTFAY E. *Iron-overload Cardiomyopathy: evidence for a free radical--mediated mechanism of injury and dysfunction in a murine model*. *Biol. Res. Nurs.* 2(1):49-59, 2000.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. *Estresse Oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo*. *Quim. Nova* 29(1): 113-23, 2006.

BEARD J.L. *Iron Biology in Immune Function, Muscle Metabolism, and Neural Functioning*. *J. Nutr.* 131: 568, 2001.

BICALHO, H.M.S; GONTIJO, M.C.; NOGUEIRA-MACHADO, J.A. *A Simple Techinique for Simultaneous Human Leuckocytes Separation*. *Journal of Imunology* 40:115-16, 1981.

BONOMO, L.F. *Excesso de Ferro Altera o Status Oxidativo, a Homeostase de Colesterol e Glicose e a Expressão de PPAR- α em Hamsteres*. *Ouro Preto: UFOP*, 2010. 134f. Dissertação (Mestrado) – Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, 2010.

BOYER J.K. *et al.* *Prevalence of Ventricular Diastolic Dysfunction in Asymptomatic, Normotensive Patients with Diabetes Mellitus.* Am. J. Cardiol. 93: 870–75, 2004.

BROWNLEE M. *Biochemistry and Molecular Cell Biology of Diabetic Complications.* Nature 414: 813-20, 2001.

CANÇADO R.D.; LOBO C.; FRIEDRICH J.R. *Tratamento da Anemia Ferropriva com Ferro por Via Parenteral.* Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 32(2):121-28, 2010.

CANÇADO R.D.; CHIATTONE C.S. *Aspectos Atuais do Metabolismo do Ferro.* Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo 46:10-6, 2001.

CARPENTER C.E.; MAHONEY A.W. *Contributions of Heme and Non-heme Iron to Human Nutrition.* Crit. Rev. Food. Sci. Nutr. 31:333–67, 1992.

CHAVES, M.M. *et al.* *Increase of Reactive Oxygen (ROS) and Nitrogen (RNS) Species Gene Rated by Phagocytosing Granulocytes Related to Age.* Mech Envelhecimento Dev. 119:1-8, 2000.

CHU PY *et al.* *Sesamol Attenuates Oxidative Stress-Mediated Experimental acute Pancreatitis in Rats.* Hum. Exp. Toxicol. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>>, Acesso em: 12/12/2011.

CNOP, M. *et al.* *Mechanisms of Pancreatic β -Cell Death in Type 1 and Type 2 Diabetes Many Differences, Few Similarities.* Diabetes 54 (Supl. 2):97–107, 2005.

CORREA-GIANNELLA, M.L.; VIEIRA, S.M. *A Predisposição Genética para o Desenvolvimento da Microangiopatia no DM1.* Arq. Bras. Endocrinol. Metab. [online].52(2): 375-386, 2007.

DANG, P. M. *et al.* *A Specific p47phox-serine Phosphorylated by Convergent MAPKs Mediates Neutrophil NADPH oxidase Priming at Inflammatory Sites.* J. Clin. Invest. 116: 2033–2043. 2006.

DATASUS. *Indicadores de Saúde.* Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0201>> Acesso em: 18/03/11.

DING A.; RODRIGUES B. *Role of Changes in Cardiac Metabolism in Development of Diabetic Cardiomyopathy.* Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 291:1489-506, 2006.

DYKE, K. V. *et al.* Oxidative/nitrosative Stresses trigger type I Diabetes: preventable in streptozotocin rats and detectable in human disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1203: 138–45, 2010.

EHSES J.A. *et al.* *Increased Number of Islet-Associated Macrophages in Type 2 Diabetes.* *Diabetes* 56:2356–70, 2007.

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

FERNANDEZ-REAL J.M. *et al.* *Study of Circulating Prohepcidin in Association with Insulin Sensitivity and Changing Iron Stores.* *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94:982-8, 2009.

FLEMING R.E.; BACON B.R. *Orchestration of Iron Homeostasis.* *N. Engl. J. Med.*, 352:1741-4, 2005.

GAWLOWSKI, T. *et al.* *AGEs and Methylglyoxal Induce Apoptosis and Expression of Mac-1 on Neutrophils Resulting in Platelet-Neutrophil Aggregation.* *Thromb Res.*121(1):117-26, 2007.

GIUGLIANO D., CERIELLO A., PAOGLISSO G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19:257-65, 1996.

GU K., COWIE C.C., HARRIS M.L. Diabetes and decline in heart disease mortality in U.S. adults. *JAMA* 281:1291-7, 1999.

GOYAL R.K.; *et al.* *Effect of Longterm Treatment with Enalapril in Streptozotocin Diabetic and DOCA Hypertensive rats.* *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 32: 317-322. 1998.

GROTTO, H.Z.W. *Fisiologia e Metabolismo do Ferro.* *Rev. Bras. Hematol. Hemot-er.* 32(2): 08-17, 2010.

GROSS, J.L.; *et al.* *Diabetes Melitos: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico.* *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 46(1): 16-26, 2002.

GUPTA A., *et al.* *Advanced Glycosylated end Products Mediated Activation of Polymorphonuclear Neutrophils in Diabetes Mellitus and Associated Oxidative Stress.* *Indian J. Biochem. Biophys.* 44:373 378, 2007.

HA H.; KIM K.H. *Pathogenesis of Diabetic Nephropathy: the role of oxidative stress and protein kinase C*. Diabetes Research and Clinical Practice 45:147–51, 1999.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J.M.C. *Free radical in biology and medicine*. 2. ed. New York: Oxford University Press; 1989.

HARMON, J.S.; *et al.* *β -Cell-Specific Over expression of Glutathione Peroxidase Preserves Intranuclear MafA and Reverses Diabetes in db/db Mice*. Endocrinology 150: 4855– 4862, 2009.

HOLBEIN, B.E. *Iron-controlled infection with Neisseria meningitidis in Mice*. Infect. Immun. 29 (3): 886-91, 1980.

HUANG J.; JONES D.; LUO B. *Iron overload and diabetes risk: a shift from glucose to Fatty Acid oxidation and increased hepatic glucose production in a mouse model of hereditary hemochromatosis*. Diabetes 60:80–7, 2011.

IDF- International Diabetes Federation - Diabetes e-Atlas. 2009. Disponível em: <http://www.eatlas.idf.org>. Acesso em 10/12/ 2011.

ISHIZAKA N.; *et al.* *Iron overload augments angiotensin II-induced cardiac fibrosis and promotes neointima formation*. Circulation. 106(14): 1840-6, 2002.

JEHN, M.; CLARK, J.M.; GUALLAR, E. *Serum Ferritin and Risk of the Metabolic Syndrome in U.S. Adults*. Diabetes Care 27(10), 2004.

JIANG R.; *et al.* *Dietary Iron intake and Blood Donations in Relation to risk of type 2 Diabetes in Men: a prospective cohort study*. Am.J.Clin.Nutr. 79: 70-5, 2004.

JONES, B.C., *et al.* *Systemsgenetic Analysis of Peripheral Iron Parameters in the Mouse*. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 293: 116-24, 2007.

KANNEL W.B.; HJORTLAND M.; CASTELLI W.P. *Role of Diabetes in Congestive Heart Failure: the Framingham study*. Am J Cardiol 34:29-34, 1974.

KARIMA M.; *et al.* *Enhanced Superoxide release and elevated Protein Kinase C Activity in Neutrophils from Diabetic Patients: association with periodontitis*. J. Leukoc. Biol. 78:862–870. 2005.

LENZEN S.; DRINKGERN J.; TIEDGE M. *Low Antioxidant Enzyme gene Expression in Pancreatic Islets Compared with Various other Mouse Tissues*. Free. Radic. Biol. Med. 20:463–66, 1996.

KANETO H.; et al. *Role of Reactive Oxygen Species in the Progression of type 2 Diabetes and Atherosclerosis*. Mediators Inflamm. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2825658/?tool=pubme>; Acesso em: 01/04/2011.

LENZEN S. *Oxidative Stress: the vulnerable beta-cell*. Biochem. Soc. Trans. 36:343–347, 2008.

LEVINE R.L.; et al. *Carbonyl Assays for determination of Oxidatively Modified Proteins*. Methods Enzymol. 233:346–357. 1994.

MARIN, D.P.; et al. *ROS Production in Neutrophils from alloxan-induced Diabetic Rats treated in vivo with astaxanthin*. International Immunopharmacology. 11 (1):103-9, 2011.

MIRON, V.R.; et al. *Enhanced NTPDase and 5'-nucleotidase activities in Diabetes Mellitus and Iron-Overload Model*. Mol Cell Biochem. 298:101–7, 2007.

McCLAIN D.A.; et al. *High Prevalence of Abnormal Glucose Homeostasis Secondary to Decreased Insulin Secretion in Individuals with Hereditary Haemochromatosis*. Diabetologia 49: 1661-9, 2006.

McCORD JM. *The evolution of free radicals and oxidative stress*. Am J Med 108(8):652-9, 2000.

MCKIE A.T.; BARROW D.; LATUNDE-DADA G.O. *An Iron Regulated Ferric Reductase Associated with the Absorption of Dietary Iron*. Science 291:1755–9, 2001.

MENDLER M.H.; et al. *Insulin resistance-associated hepatic iron overload*. Gastroenterology 117: 1155-63, 1999.

MOIRAND R.; et al. *Clinical features of genetic hemochromatosis in women compared with men*. Ann.Intern.Med. 127: 105-10, 1997.

NEGRE-SALVAYRE, A.; et al. *Hyperglycemia and glycation in diabetic complications*. Antioxid. Redox Signal. 11: 3071–109, 2009.

NOETZLI L.J.; et al. *Pancreatic iron and glucose dysregulation in thalassemia major*. Am. J. Hematol. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com> Acesso em: 10/04/2011.

OMORI K.; *et al.* *Priming of neutrophil oxidative burst in diabetes requires preassembly of the NADPH oxidase.* J. Leukoc. Biol; 84:292–01. 2008.

OKOSHI, K; *et al.* *Miocardiópatia Diabética.* Arq. Bras. Endocrinol. Metab. 51(2): 160-7, 2007.

POORNIMA I.G.; PARIKH P.; SHANNON R.P. *Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis.* Circ. Res. 98:596-605, 2006.

PRATA, M.L.; *et al.* *Ultrasound-assisted extraction for rapid determination of Zn, Cu, Fe, Mg and Mn in liver of diabetic rats under different antioxidant treatments.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 49:1040–4, 2009.

PUNTARULO, S. *Iron oxidative stress and human health.* Molecular Aspects of Medicine, 26:299-312, 2005.

RAJPATHAK S.N.; *et al.* *The role of iron in type 2 diabetes in humans.* Biochim Biophys Acta 1790:671-81, 2009.

REIS J.S.; *et al.* *Estresse Oxidativo: Revisão da Sinalização Metabólica no Diabetes Tipo 1.* Arq. Bras. Endocrinol. Metab., 52(7):1096-105, 2008.

ROBERTSON R.P. *Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes.* J. Biol. Chem. 279:42351–4, 2004.

ROBERTSON R.P; HARMON J.S. *Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: a case of double jeopardy for the pancreatic islet β -cell.* Free Radic Biol Med 41:177–84, 2006.

ROMAGNOLI M.; *et al.* *Xanthine oxidase-induced oxidative stress causes activation of NF-kappaB and inflammation in the liver of type I diabetic rats.* Free Radic Biol Med. 49(2):171-7, 2010.

ROY M.; SEN S.; CHAKRABORTI A.S. *Action of pelargonidin on hyperglycemia and oxidative damage in diabetic rats: implication for glycation-induced hemoglobin modification.* Life Sci. 82(21-22):1102-10, 2008.

TIEDGE M. *et al.* *Complementary action of antioxidant enzymes in the protection of bioengineered insulin-producing RINm5F cells against the toxicity of reactive oxygen species.* Diabetes 47:1578–85, 1998.

SALIM U.R. *et al.* Efficacy of non-heme iron fortified diets: a review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr 50(5):403-13, 2010.

SALONEN J.T. *et al.* Relation between iron stores and non-insulin dependent diabetes in men: case-control study. B. M.J. 317:727, 1998.

SHAO C.H. *et al.* Carbonylation contributes to SERCA2a activity loss and diastolic dysfunction in a rat model of type 1 diabetes. Diabetes. 60(3):947-59, 2011.

SHU-MEI Z. *et al.* Cardiac Fibrosis in Diabetic Rats: Regulation and Mechanism of Activation of the PPAR γ Signal Pathway. Chin J Physiol.53(4): 262-7, 2010.

SIES, H.; JONES, D.P. An imbalance between oxidants and antioxidants in favor of the oxidants, leading to a disruption of redox signaling and control and/or molecular damage. Encyclopedia of stress. 3: 45-8, 2007.

SEFI M. *et al.* Centaurium erythraea (Gentianaceae) leaf extract alleviates streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas. J. Ethnopharmacol. 135(2): 243-50, 2011.

SILVA M. *et al.* Iron overload alters glucose homeostasis, causes liver steatosis, and increases serum triacylglycerols in rats. Nutr. Res. 28 (6): 391-8, 2008.

SILVA M.; *et al.* Effects of the interaction of diabetes and iron supplementation on hepatic and pancreatic tissues, oxidative stress markers, and liver peroxisome proliferator-activated receptor- α expression. J. Clin. Biochem. Nutr. 49(2): 102-8, 2011a.

SILVA M. *et al.* Differential expression of iron metabolism proteins in diabetic and diabetic iron-supplemented rat liver. J Biochem Mol Toxicol. Disponível em: <<<http://onlinelibrary.wiley.com>>>. Acesso em 12/01/2012. 2011b.

SILVA, M. *et al.* Efeito da estreptozotocina sobre os perfis glicêmico e lipídico e o estresse oxidativo em hamsters. Arq. Bras. Endocrinol. Metab. 55(1):46-53, 2011c.

SUN L. *et al.* Ferritin Concentrations, Metabolic Syndrome, and Type 2 Diabetes in Middle-Aged and Elderly Chinese. J. of Clinical Endocrinology & Metabolism. 93(12):4690-6, 2008.

SUYS B.E. *et al.* Female children and adolescents with type 1 diabetes have more pronounced early echocardiographic signs of diabetic cardiomyopathy. Diabetes Care 27:1947–53, 2004.

SWAMINATHAN, S. *et al.* *The Role of Iron in Diabetes and its Complications.* Diabetes Care 30(7):1926-33, 2007.

TURBINO-RIBEIRO S.M. *et al.* *Iron overload in hypercholesterolemic rats affects iron homeostasis and serum lipids but not blood pressure.* J. Nutr. 133(1):15-20, 2003.

VALKO, M. *et al.* *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.* Int. J. Biochem. Cell. Biol. 39:44–84, 2007.

YAZDANPARAST R.; ARDESTANI A.; JAMSHIDI S. *Experimental diabetes treated with Achillea santolina: effect on pancreatic oxidative parameters.* J. Ethnopharmacol 112(1):13-8, 2007.

YU X-Y. *et al.* *Hyperglycemic Myocardial Damage is Mediated by Proinflammatory Cytokine: macrophage migration inhibitory factor.* PLoS ONE 6(1): e16239, 2011.

WARD D.T. *et al.* *Altered expression of iron transport proteins in streptozotocin-induced diabetic rat kidney.* Biochimica et Biophysica Acta 1740:79– 84, 2005.

WEI W. *et al.* *Oxidative stress, diabetes, and diabetic complications.* Hemoglobin. 33:370-77, 2009.

ZHENG Y. *et al.* *The role of zinc, copper and iron in the pathogenesis of diabetes and diabetic complications: therapeutic effects by chelators.* Hemoglobin. 32:135-45, 2008.

ZHAO N. *et al.* *Myocardial iron metabolism in the regulation of cardiovascular diseases in rats.* Cell. Physiol. Biochem. 25: 587-94, 2010.

9 - ANEXOS

CATALASE

PRINCÍPIO DO MÉTODO:

O método baseia-se na quantificação da velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela catalase observada durante três minutos por espectrofotômetro a 240nm.

REAGENTES E PRODUTOS UTILIZADOS NA DOSAGEM:

- Fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$): PM = 268,07g; marca Isofar, ref: 314
- Fosfato de sódio monobásico ($\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$): PM = 137,99g; marca Reagen, 10037
- Peróxido de hidrogênio (H_2O_2): PM = 34,01g

PREPARO DO TAMPÃO:

Tampão fosfato 0,1M, pH=7,2, pKa = 6,86

- Pesar 4,14 g de $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- Pesar 18,76g de $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- Colocar os reagentes em béquer e adicionar 700 ml de água mili-Q
- Colocar no agitador e acertar o pH para 7,2 com hidróxido de potássio
- Transferir o tampão para proveta e completar o volume para 1L com água mili-Q

$$(I) \text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]}{[\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}]}$$

$$\log \frac{[\text{Sal}]}{[\text{Ácido}]} = 0,34$$

$$\log \frac{[\text{Sal}]}{[\text{Ácido}]} = 10^{0,34}$$

$$\frac{[\text{Sal}]}{[\text{Ácido}]} = 2,19$$

$$[\text{Sal}] = 2,19 [\text{Ácido}]$$

$$[\text{Sal}] = 0,1 [\text{Ácido}]$$

$$(III) [\text{Sal}] = 0,1 [\text{Ácido}]$$

$$[\text{Sal}] = 0,1 - 0,03$$

$$[\text{Sal}] = 0,07$$

$$1 \text{ mol ácido} \text{ ----- } 137,99\text{g}$$

$$0,03 \text{ mol} \text{ ----- } x$$

$$x = 4,14 \text{ g de } \text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} \text{ para } 1 \text{ L}$$

$$(II) 2,19 [\text{Ácido}] = 0,1 [\text{Ácido}]$$

$$3,19 [\text{Ácido}] = 0,1$$

$$[\text{Ácido}] = \frac{0,1}{3,19}$$

$$[\text{Ácido}] = 0,03 \text{ M}$$

$$(IV) 1 \text{ mol sal} \text{ ----- } 268,07\text{g}$$

$$0,07 \text{ mol} \text{ ----- } x$$

$$x = 18,76\text{g de } \text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \text{ para } 1 \text{ L}$$

HOMOGENEIZAÇÃO DO TECIDO:

Utilizar 100mg de tecido para 1000 μ l de tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,2, fazendo proporção para os diferentes pesos de tecido. Centrifugar a 4°C por 10 minutos a 10000rpm. Retirar o sobrenadante, armazenar a -80°C.

PREPARO DA SOLUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO:

- Pipetar 5 μ l de H₂O₂ e adicionar 4995 μ L de água mili-Q
- Então:
 - 5mM: 5 μ l de H₂O₂ + 9995 de água mili-Q
 - 10mM: 5 μ l de H₂O₂ + 4995 de água mili-Q
 - 20mM: 10 μ l de H₂O₂ + 4990 de água mili-Q
 - 40mM: 20 μ l de H₂O₂ + 4980 de água mili-Q
- Manter todos os reagentes no gelo
- Preparar 5ml de H₂O₂ por vez, pois a mesma evapora com facilidade

$$\begin{array}{l} \text{(I) Inicialmente: H}_2\text{O}_2 \text{ a 30\%} \\ 1 \text{ mol H}_2\text{O}_2 \text{ ----- } 34,01\text{g} \\ 0,010 \text{ mol ----- } x \\ x = 0,34\text{g} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} \text{(II) } 0,34\text{g ----- } 1000\text{ml} \\ x \text{ ----- } 5\text{ml} \\ x = 1,7 \times 10^{-3}\text{g} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} \text{(III) } d = 1,130\text{Kg/l} \\ 1\text{ml ----- } 1,130\text{g} \\ x \text{ ----- } 1,7 \times 10^{-3}\text{g} \\ x = 0,0015\text{ml} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} \text{(IV) } 1,5 \mu\text{l ----- H}_2\text{O}_2 \text{ 30\%} \\ x \text{ ----- } 100\% \\ x = 5\mu\text{L para 5mL água mili-Q} \rightarrow 10\text{mM} \\ \text{H}_2\text{O}_2 \text{ a } 100\% \end{array}$$

- Observação: Todos os reagentes e as amostras devem ficar no gelo durante a realização da dosagem.

DOSAGEM:

- Zerar o espectrofotômetro com água destilada a 240 nm.
- Preparar os espendorffs de duas em duas amostras seguindo a ordem abaixo e acionando o cronômetro assim que colocar o peróxido de hidrogênio. Dar um intervalo de 30 segundos entre as amostras e ler de um em um minuto três vezes cada amostra.
 - 1) 50 μ l de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,2
 - 2) 40 μ l de água mili-Q
 - 3) 10 μ l de amostra (sobrenadante)
 - 4) 900 μ l de H₂O₂ a 10mM
- Usar a cubeta de quartzo em espectrofotômetro com luz U.V.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS:

Para o cálculo da atividade da catalase, utilizar a seguinte equação:

$$\text{Atividade (U/mg de proteína)} = \frac{\Delta \text{abs} \times \text{fd}}{V \times \epsilon \times P}$$

Onde: Δabs é a diferença das absorvâncias do 3º e 1º minutos, fd é o fato de diluição empregado para o H_2O_2 , V é o volume da amostra teste em mL, ϵ é o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 ($0,071 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) e P é a quantidade de proteína em mg.

ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)**PRINCÍPIO DO MÉTODO:**

Este método é baseado na habilidade da superóxido dismutase limpar o O_2^- , diminuindo assim a razão de autooxidação do pirogalol.

REAGENTES E PRODUTOS UTILIZADOS NA DOSAGEM:

- Dihidrogenofosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)
- Monoidrogenofosfato de sódio (Na_2HPO_4)
- Pirogalol a 15mM (PM = 126,11)
- MTT (brometo de (3-[4,5-dimetiltiazol-2H]-2,5-difeniltetrazolium) a 1,25mM (PM = 414,3)
- Dimethyl sulfoxide – DMSO ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$): Marca Sigma-Aldrich.
Lote:#BCBC8998. 500 ml.

PREPARO DO TAMPÃO:

Tampão fosfato 50mM, pH=7,0.

- Solução A: pesar 6,81g de KH_2PO_4 e completar com água mili-Q até completar 1000ml.
- Solução B: pesar 8,90g de Na_2HPO_4 e completar com água mili-Q até completar 1000ml.
- Misturar as soluções A e B na proporção de 1:1,5 (v/v).
- Fazer o ajuste de pH para 7,0.

HOMOGENEIZAÇÃO DO TECIDO:

Utilizar 100mg de tecido para 1000 μl de tampão fosfato (50 mM), fazendo proporção para os diferentes pesos de tecido. Centrifugar a 4°C por 10 minutos a 10.000 rpm. Retirar o sobrenadante, armazenar a -80°C.

PREPARO DO PIROGALOL:

$$\begin{array}{r}
 1M \text{ ----- } 414,3 \text{ ----- } 1l \\
 0,00125M \text{ ----- } x \text{ ----- } 1l \\
 \quad \quad \quad x=0,517g \\
 0,517g \text{ ----- } 1l \\
 x \text{ ----- } 10ml \rightarrow \text{Mínimo de reagente a ser preparado.} \\
 \quad \quad \quad x=0,0051g
 \end{array}$$

- Pesar 0,0051g e completar com água mili-Q para 10ml.

PREPARO DO MTT:

$$\begin{array}{r}
 1M \text{ ----- } 126,11g \text{ ----- } 1l \\
 0,015M \text{ ----- } x \text{ ----- } 1l \\
 \quad \quad \quad x=1,89g \\
 1,89g \text{ ----- } 1l \\
 x \text{ ----- } 10ml \rightarrow \text{Mínimo de reagente a ser preparado.} \\
 \quad \quad \quad x=0,018g
 \end{array}$$

- Pesar 0,018g e completar com água mili-Q para 10ml.

→ **OBS.: o pirogalol e o MTT são fotossensíveis.**

DOSAGEM:

- Utilizar uma placa de Elisa para colocar os volumes indicados na tabela abaixo:

	Amostra - μL	Tampão - μL	MTT (1,25mM) - μL	Pirogalol (100 μM) - μL
Branco	-----	144	6	-----
Padrão	-----	129	6	15
Amostra	30	99	6	15

- Em uma folha, montar o desenho da placa de Elisa para facilitar o preenchimento da mesma.
- Incubar por 5 minutos em estufa a 37°C. Depois da incubação, parar a reação com 150 μl de DMSO (em todos os poços).
- Ler no Leitor de Elisa em um comprimento de onda de 570nm, por isso deve-se utilizar o leitor de Elisa do laboratório de Imunologia.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS:

- Diminuir as absorbâncias das amostras e dos padrões pela média de absorbância do branco.

- Calcular a atividade enzimática:
Abs padrão ----- 1 U SOD
Abs amostra ----- x
→ 1 unidade (U) é responsável pela oxidação de 50% do pirogalol.
- Dosar as proteínas do homogenato e expressar o resultado em U/mg de proteína.

CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA TOTAL

PRINCÍPIO DO MÉTODO:

Este ensaio utiliza um método cinético baseado na redução do DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico)) a TNB (ácido 5-tio-2-nitrobenzóico) que pode ser detectado espectrofotometricamente a 412nm.

REAGENTES E PRODUTOS UTILIZADOS NA DOSAGEM:

- NADPH ($C_{21}H_{26}N_7Na_4O_{17}P_3$): β -nicotinamida adenine dinucleotide 2' – fosfate reduced tetrasodium salt hydrate. Marca Sigma. Lote: #110M5162V. 25mg.
- DTNB ($C_{14}H_8N_2O_8S_2$): 5,5'-Dithiobis 2-nitrobenzoic. Peso molecular 396,35. Massa Sigma. Lote 065K0170. 8mg.
- Glutathione Reductase from Bakers Yeast: pH 7,0. Marca Sigma. Lote: 069K7420. Volume 100UN.
- L-Glutathione reduced, minimum 99% ($C_{10}H_{17}N_3O_6S$): Peso molecular 307,33. Marca Sigma. Lote: 077k1801. 1g.
- 5-Sulfosalicylic acid dihydrate, minimum 99% ($C_7H_6O_6S$): Peso molecular 254,22. Marca Sigma. Lote: 019K01621. 100g.
- DMSO: dimethyl sulfoxide (C_2H_6OS): Marca Sigma-Aldrich. Lote:#BCBC8998. 500 ml.
- EDTA disodium salt dihydrate ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$): Peso molecular 372,24. Marca AMRESCO. Lote: # 2749B486. 500g.
- Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)
- Hidróxido de potássio (KOH): peso molecular 56,11.

PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUES:

1) Ácido Sulfossalicílico (SSA) 5%:

Pesar 10g do ácido sulfossalicílico ($C_7H_6O_6S$) e completar o volume para 200 ml com água destilada. Acondicionar em frasco tampado e colocar na geladeira.

2) NADPH estoque:

Dissolver o conteúdo do frasco de NADPH (25 mg) em 0,625 ml de água destilada para obter uma solução estoque a 40 mg/ml. A solução deve ser armazenada a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ por menos de 6 meses.

3) DTNB estoque:

Dissolver o conteúdo do frasco de DTNB (8mg) com 5,33 ml de DMSO para fazer uma solução a 1,5 mg/ml. A solução deve ser armazenada em alíquotas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ por menos de três meses.

4) Glutathione (GSH) padrão (10mM):

Pesar 0,003g de glutathione reduzida ($C_{10}H_{17}N_3O_6S$) e adicionar 1ml de água destilada. Acondicionar em eppendorf a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ por menos de três meses.

5) Tampão fosfato de potássio 5x: pH 7,0 a 500mM, contendo 5mM EDTA

Pesar 6,8g de KH_2PO_4 (fosfato de potássio monobásico) e misturar com 80 mL de água destilada. Colocar hidróxido de potássio aos poucos até obter pH igual a 7,0. Colocar 0,18g de EDTA na solução para obter o tampão com 5mM de EDTA. Completar para 100mL com água destilada. Acondicionar em frasco tampado e colocar na geladeira.

KH_2PO_4 1000 mL ----- 1M----- 136,09g KH_2PO_4
 1000 mL ----500mM---- 68,0g → 6,8g ----- 100mL

1000mM ----- 372,24g EDTA

5 mM ----- x

x= 1,86g ----- 1000mL

x ----- 100 mL

x=0,18g EDTA

HOMOGENEIZAÇÃO DO TECIDO:

Utilizar 100mg de tecido para 1000 μL de SSA 5% (ácido sulfossalicílico), fazendo proporção para os diferentes pesos de tecido. Centrifugar a $4\text{ }^\circ\text{C}$ por 10 minutos a 10000g. Retirar o sobrenadante, colocar a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ por até 10 dias.

PREPARO DA MISTURA DE TRABALHO:

A mistura de trabalho é composta pelo tampão 1x, enzima diluída (glutathione reductase) e DTNB estoque. Abaixo tem-se o cálculo para 100 amostras.

- Tampão 1x:
 18,4mL de H_2O destilada ----- 4,6mL tampão 5x
- Enzima diluída:
 11,76 μL glutathione reductase ----- 427,5 μL tampão 1x
- DTNB estoque: preparado previamente
- Mistura de trabalho:

15 ml de tampão 1x ----- 427,5 µl da enzima diluída ----- 427,5 µl de DTNB

PREPARO DA SOLUÇÃO NADPH:

20µl de NADPH estoque ----- 5 ml de tampão 1x

→ **OBS.:** As amostras, a mistura de trabalho e a solução de NADPH devem ficar no gelo ao realizar a dosagem.

PREPARO DA CURVA:

Começar a preparação da curva diluindo 10 µl de glutatona padrão (10mM) em 240 µl de SSA 5% (Solução:400 µM), colocar em um eppendorf. A partir daí, colocar em outros 5 eppendorfs as diluições sucessivas indicadas na tabela abaixo:

Eppendorf	1	2	3	4	5
[GSH] µM	400	200	100	50	25
Solução de GSH µl	50 (do eppendorf)	25 (do 1)	25 (do 2)	25 (do 3)	25 (do 4)
SSA 5% µl	-	25	25	25	25
nmoles de GSH em 10 µl de amostra	4	2	1	0,5	0,25

DOSAGEM:

Utilizar uma placa de Elisa para colocar os volumes indicados na tabela abaixo.

Medida da amostra	Volume da amostra	SSA 5%	Mistura de trabalho	NADPH (final)
Branco	-	10 µl	150 µl	50 µl
Curva Padrão	10 µl	-	150 µl	50 µl
Amostra desconhecida	10 µl	-	150 µl	50 µl

Em uma folha, montar o desenho da placa de Elisa para facilitar o preenchimento da mesma. Colocar primeiro a mistura de trabalho e depois colocar as amostras, curva padrão e branco, misturando 4 vezes bem devagar. Incubar 5 minutos em temperatura ambiente. Depois da incubação, colocar o NADPH com a pipeta multicanal e disparar o cronômetro marcando 1 minuto. Quando o cronômetro mostrar os 10 últimos segundos acionar o aparelho de Elisa para leitura. Ler a 412 nm a cada minuto por 5 minutos.

Como utilizar o Elisa: ligar o aparelho a 220V. Ligar o computador e clicar no programa Gen 5 1.10. Clicar em Experiment → Glutaciona.prt → ok → read plate → read → cancelar. A partir desse momento, esperar dar os 10 segundos e acionar o aparelho. Cabe lembrar que o Elisa lê a 405nm (que é o mais próximo de 412).

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS:

Achar o delta das absorbâncias através da fórmula: $\Delta = \frac{\text{abs } 5 - \text{abs } 1}{4}$

Construir uma curva com os pontos obtidos no padrão. Descobrir a equação da reta e por meio dessa equação transformar os valores de delta encontrados em concentrações. É necessário multiplicar os valores encontrados por 100, uma vez que o resultado será expresso em nmoles/mL e não nmoles/10 μL .

PROTEÍNA CARBONILADA

PRINCÍPIO DO MÉTODO:

A oxidação de proteínas por espécies reativas de oxigênio (ERO) leva à formação de derivados carbonilados. O 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) reage com os grupos carbonílicos gerando a hidrazona correspondente, a qual pode ser analisada espectrofotometricamente.

REAGENTES E PRODUTOS UTILIZADOS NA DOSAGEM:

- Fosfato de potássio (KH_2PO_4)
- Hidróxido de potássio (KOH)
- Ácido etilenoamino tetracético – ETDA: 416,21PM
- Ácido clorídrico (HCl)
- Ácido tricloroacético (TCA)
- 2,4-dinitrofenil hydrazine – DNPH ($\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_4\text{O}_4$): Marca Vetec. Lote: 0505542. Código 566
- Etanol
- Acetato de etila
- Sodium dodecyl sulfate – SDS ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$). Lote: 637341

PREPARO DO TAMPÃO

Tampão fosfato 50 mM; pH 6,7; contendo 1mM de EDTA

- 1) Pesar 6,8g de fosfato de potássio
- 2) Misturar o fosfato com 700mL de água destilada.
- 3) Acertar o pH para 6,7 com hidróxido de potássio.
- 4) Adicionar 0,372g de EDTA
- 5) Completar para 1L de água.
- 6) Guardar em tubo fechado na geladeira.

HOMOGENEIZAÇÃO DO TECIDO:

1) Homogeneizar 400mg de tecido com 2 mL de tampão. Se for coração 200mg/1mL. Fazer uma regra de três para cada amostra como no exemplo:

400 mg de fígado ----- 2mL tampão
405 mg de fígado ----- 2,025mL tampão

2) Centrifugar por 10 minutos, 4°C, 10000g.

3) Pipetar o sobrenadante e armazenar à -80°C.

OBS.: Lavar os tecidos com solução salina para retirar as hemácias.

PREPARO DOS REAGENTES:

- **TCA 10%**

O TCA encontra-se diluído a 50%. Sendo assim, deve-se medir 20 mL de TCA 50% e completar o volume para 100 mL com água mili-Q (80mL).

- **HCl 2mol/L**

HCl 37% ----- 100g ----- 37g HCl
 $D = \frac{m}{V} \rightarrow 1,2 = \frac{100}{V} \rightarrow V = 83,3 \text{ mL}$

1mol HCl ----- 36,46g
x ----- 37g
x = 1,01 mol

83,3 mL ----- 1,01 mol
x ----- 2 mol
x = 164,95 mL de HCl

HCl 2mol/L

164,95 mL HCl 37% ----- 1L de H₂O destilada

100 amostras (branco + teste) ---- 50 mL (25 mL branco / 25 mL DNPH teste)

Medir 8,25 mL de HCl puro e completar o volume para 50 mL com H₂O destilada.

- **DNPH**

1mol ----- 198,14g
0,01 mol ----- x
x = 1,98 g DNPH ----- 1L de solução (HCl 2 mol/L)

1,98g DNPH ----- 1000 mL de solução
x ----- 25mL (50 amostras) teste
x = 0,0495 = 0,050g DNPH

Pesar 0,050g de DNPH e completar o volume para 25mL com HCl 2 mol/L.

- **Mistura de etanol: acetato de etila (1:1)**

1mL mistura ----- 1 amostra

x ----- 100 amostras (branco e teste)

x= 100mL da mistura → como são 2 lavagens = 200 mL da mistura

Medir 100 mL de etanol e acrescentar mais 100 mL de acetato de etila

- **SDS 6%**

1 mL SDS ----- 1 amostra

x ----- 100 amostras (branco + teste)

x= 100 mL SDS

Pesar 6g de SDS e completar o volume 100 mL com H₂O destilada.

DOSAGEM:

- 1) Preparar 2 tubos (1,5 mL) uma para o teste e outro para o branco (para cada amostra). Usar o tubo marrom para a amostra.
- 2) Colocar 500 µL de amostra (se for coração 400 µL) no tubo de teste e no branco e precipitar com 500 µL de TCA 10%.
- 3) Passar no vórtex; centrifugar a 5000g por 10 min, 4°C.
- 4) Descartar o sobrenadante
- 5) Nas amostras colocar 500 µL de DNPH preparado (fotossensível) e 500 µL de HCl 2mol/L nos brancos.
- 6) Incubar à temperatura ambiente por 30 minutos. Os testes devem ser incubados no escuro. Misturar no vórtex a cada 15 minutos (0, 15, 30).
- 7) Colocar 500 µL de TCA 10%
- 8) Passar no vórtex
- 9) Centrifugar a 5000g por 10 min, 4°C.
- 10) Descartar o sobrenadante
- 11) O precipitado é lavado 2 vezes com 1mL da mistura etanol: acetato de etila.
- 12) A cada lavagem, passar no vórtex e em seguida centrifugar por 10 minutos a 5000g, 4°C. Descartar o sobrenadante.
- 13) Depois das 2 lavagens com a mistura de etanol: acetato de etila o precipitado é dissolvido em 1mL de solução de SDS 6%.
- 14) Passar no vórtex
- 15) Centrifugar por 10 minutos 10.000g, 4°C.
- 16) Utilizar o sobrenadante para leitura.
- 17) Zerar o espectrofotômetro com o branco de cada amostra e ler as amostras a 370nm (ler o sobrenadante). Usar a cubeta de quartzo.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS:

O resultado é expresso em nmoles por mL, assim, temos que multiplicar por 1000000 para transformar a concentração que é de mol/L.

$$C = \frac{Abs}{\epsilon b} \times \frac{1000000}{VA}$$

$$C = \frac{Abs}{22000} \times \frac{1000000}{0,5}$$

$$C = Abs \times \frac{1000000}{11000}$$

$$C = Abs \times 90,90 \text{ nmol/mL}$$

Para finalizar, deve-se corrigir a concentração em nmoles/mL pela proteína total expressa em mg/mL, dessa forma, o resultado final será expresso em nmoles/mg de proteína.

TBARS**PRINCÍPIO DO MÉTODO:**

A determinação da concentração de TBARS se baseia na capacidade do ácido tiobarbitúrico (TBA) em se ligar a lipídeos oxidados.

REAGENTES E PRODUTOS UTILIZADOS NA DOSAGEM:

- Tris (hidroximetil) aminometano - Tris (C₄H₁₁NO₃)
- Ácido clorídrico (HCl)
- Ácido tricloroacético (TCA)
- Ácido 2-tiobarbitúrico (TBA)
- Butilidroxitolueno (BHT)
- Ácido acético (CH₃COOH)

PREPARO DO TAMPÃO:

Tampão Tris-HCl 20 mmol, pH= 7,4

1 mol de Tris ----- 121,14g

0,020 mol ----- x

x= 2,42g de Tris

Pesar 2,42g de Tris, completar o volume para 1000 mL com água mili-Q. Ajustar o pH para 7,4 com HCl.

HOMOGENEIZAÇÃO DO TECIDO:

Utilizar 100mg de tecido para 1000 μL do tampão Tris-HCl, fazendo proporção para os diferentes pesos de tecido. Centrifugar a 4°C por 10 minutos a 10000g. Retirar o sobrenadante, colocar a -80°C .

PREPARO DO SOBRENADANTE:

Pipetar 200 μL do homogenato em 400 μL do tampão Tris-HCl. Passar no vórtex e retirar 500 μL que será utilizado para a dosagem.

PREPARO DOS REAGENTES:

1) HCl 0,25 mol

$$\begin{array}{l} \text{(I) HCl 37\% - Densidade = 1,2} \\ 100\text{g} \text{ ----- } 37\text{g de HCl} \\ 1,2 = \frac{100}{V} \rightarrow V = 83,3 \text{ mL} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} \text{(II) 1mol HCl ----- 36,46g} \\ x \text{ ----- } 37,00\text{g} \\ x = 1,01\text{mol HCl} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} \text{(III) 83,3 mL ----- 1,01 mol} \\ x \text{ ----- } 0,25 \text{ mol} \\ x = 20,61 \text{ mL de HCl} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} \text{(IV) 20,61 mL HCl ----- 1000 mL} \\ x \text{ ----- } 10 \text{ mL} * \\ x = 0,206 \text{ mL de HCl} \end{array}$$

* Para efeito de cálculo

Tendo em vista os cálculos, deve-se medir 0,206 mL de HCl e completar o volume para 10 mL de água destilada. Esse cálculo deve ser utilizado para calcular a quantidade necessária de acordo com o número de amostras.

2) TCA – 28% em HCl 0,25mol

$$\begin{array}{l} \text{(I) 28g TCA ----- 100 mL} \\ x \text{ ----- } 3 \text{ mL} * \\ x = 0,84\text{g TCA} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} \text{(II) 1 amostra ----- 0,25 mL de TCA} \\ 28\% \\ 100 \text{ amostras ----- } x \\ x = 25 \text{ mL TCA } 28\% \text{ em HCl} \\ 0,25\text{mol} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} \text{(III) 0,84g TCA ----- 3 mL HCl 0,25} \\ \text{mol} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} x \text{ ----- } 25 \text{ mL HCl 0,25} \\ \text{mol} \\ x = 7\text{g TCA em 25 mL de HCl 0,25} \\ \text{mol} \end{array}$$

mol

* Para efeito de cálculo

Tendo em vista os cálculos, deve-se pesar 7g de TCA e diluir em 25 mL de HCl 0,25 mol para dosar 100 amostras.

3) TBA 1% em ácido acético diluído 1:1 com água destilada

(I) Ácido acético 100%
100g ----- 100 mL

(II) 1g TBA ----- 100mL ácido acético
x ----- 3 mL ácido acético*
x= 0,03g de TBA

(III) 1 amostra ----- 0,25 mL TBA 1%
100 amostras ----- x
x= 25 mL TBA 1% diluído em ácido acético

(IV) 0,03g TBA ----- 3mL ácido acético
x ----- 25mL ácido acético
x= 0,25g TBA

* Para efeito de cálculo

Tendo em vista os cálculos, deve-se pesar 0,25g de TBA e diluir em 25 mL de ácido acético diluído (12,5 mL de ácido acético puro + 12,5 mL de água destilada).

DOSAGEM:

1) No tubo criogênico colocar:

- 500 µL sobrenadante - 125 µL de BHT - 200 µL de TBA - 250 µL de TCA

Para fazer o branco, no lugar da amostra, colocar água destilada.

2) Passar no vórtex

3) Colocar no banho-maria à 95°C por 15 minutos

4) Retirar e colocar em uma bacia com gelo por aproximadamente 5 minutos (para parar a reação)

5) Depois de frio, passar novamente o tubo no vórtex e despejar o conteúdo em tubo de polipropileno (1,5 ou 2,0 mL)

6) Centrifugar por 10 minutos à 4°C à 13000g

7) Retirar o sobrenadante

8) Ler o sobrenadante em espectrofotômetro a 535 nm. Zerar o aparelho com o branco.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS:

O resultado é expresso em nmoles por mL, assim, temos que multiplicar por 1000000 para transformar a concentração que é de mol/L.

$$C = \frac{Abs}{\epsilon b} \times \frac{1000000}{VA}$$

$$C = \frac{Abs}{154000} \times \frac{1000000}{0,5}$$

$$C = Abs \times \frac{1000000}{77000}$$

$$C = Abs \times 12,98 \text{ nmol/mL}$$

Para finalizar, deve-se corrigir a concentração em nmoles/mL pela proteína total expressa em mg/mL, dessa forma, o resultado final será expresso em nmoles/mg de proteína.

PROTEÍNAS TOTAIS

PRINCÍPIO DO MÉTODO:

O método baseia-se na redução do reagente de Folin Ciocalteau, ao reagir com aminoácidos aromáticos, catalisada por íons cobre, em meio alcalino, formando uma coloração azul.

REAGENTES E PRODUTOS UTILIZADOS NA DOSAGEM:

- Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- Citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)
- Carbonato de sódio (Na_2CO_3)
- Hidróxido de sódio (NaOH)
- Folin Ciocalteau
- Padrão do Kit Labtest (Lagoa Santa, MG, Brasil) de albumina

PREPARO DE REAGENTES ESTOQUES:

1) Reagente A: Pesar 0,25g de sulfato de cobre e 0,5g de citrato de sódio. Completar o volume para 100 mL com água destilada e misturar. Acondicionar em vidro fechado e armazenar à temperatura ambiente.

2) Reagente B: Pesar 5g de carbonato de sódio e 1g de hidróxido de sódio, completar o volume para 250mL com água destilada e misturar. Acondicionar em vidro fechado e armazenar à temperatura ambiente.

PREPARO DE REAGENTES NO MOMENTO DA DOSAGEM:

1) Reagente C: Misturar os reagentes estoque nas proporções: 50 mL de reagente B e 1 mL do reagente A.

2) Reagente D: Misturar 1mL de Folin Ciocalteau com 1 mL de água destilada

PREPARO DA CURVA PADRÃO:

1) Preparo da solução 1 - [] 2mg/mL:

Concentração da albumina do Kit: 3,8g/dL

3,8g ----- 100 mL

3800 mg----- 100 mL

x----- 1 mL

x= 38mg/mL

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$38\text{mg/mL} \times V_1 = 2\text{mg/mL} \times 1000 \mu\text{L}$$

$$V_1 = 52,63 \mu\text{L}$$

Pipetar 52,63 μL do padrão do kit de albumina e completar para 1000 μL de água destilada (947,37 μL).

2) Preparo da solução 2 - [] 0,2mg/mL:

Pipetar 100 μL da solução 1 e completar o volume para 1000 μL com água destilada (900 μL).

3) Padrão da curva:

Pipetar em tubos de polipropileno cada padrão da curva de acordo com a tabela abaixo:

Padrão	Solução	μL da solução	μL de água destilada	Concentração mg/mL
1	2	25	75	0,05
2	1	7,5	92,5	0,15
3	1	15	85	0,30
4	1	25	75	0,50

PREPARO DA AMOSTRA:

Pipetar 10 μL da amostra e completar para 100 μL com água destilada (90 μL) em tubo de polipropileno.

Para o branco, deve-se utilizar 100 μL de água destilada.

DOSAGEM:

- Pipetar 1 mL do reagente C em todos os tubos (amostra, padrões e branco)
- Passar no vórtex e incubar a temperatura ambiente por 15 minutos
- Pipetar 100 μL do reagente D em todos os tubos
- Passar no vórtex e incubar a temperatura ambiente por 30 minutos no escuro
- Realizar a leitura em espectrofotômetro a 660nm, zerando o aparelho com o branco.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS:

Construir um gráfico de regressão linear com o valor das absorvâncias do padrão e das concentrações do padrão. Utilizar a equação da reta gerada pelo gráfico e atribuir os valores de concentração para as absorvâncias das amostras. Ao final, deve-se multiplicar os valores da concentração por 10 uma vez que as amostras foram diluídas 10x.