

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA ASSOCIAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO/SULFATO FERROSO COMPARADO COM O QUELATO DE BIS-GLICINATO FERROSO EM RATOS WISTAR

Data de aceite: 03/07/2023

Artur Bernardo Ribeiro Bellomi

<http://lattes.cnpq.br/1423321541372666>

Maria Eduarda Malpeli Presotto

<http://lattes.cnpq.br/3992951224427537>

Victor Hugo Elias de Oliveira

<http://lattes.cnpq.br/5252622814704385>

Wilson Roberto Malfará

<http://lattes.cnpq.br/1349279406406034>

Jose Norberto Bazon

<http://lattes.cnpq.br/1477289078926701>

Ana Rosa Crisci

<http://lattes.cnpq.br/9014827292091396>

RESUMO: As anemias compreendem um distúrbio sanguíneo que se manifesta em decorrência de diversos fatores. Dentre eles, a ausência parcial ou total de ferro que constata um dos distúrbios anêmicos de maior incidência, denominado anemia ferropriva, causando uma diminuição na formação de hemoglobina, portanto, sua ausência induz o aparecimento de sintomas como fadiga, fraqueza, indisposição, sonolência, tontura, dispneia e entre outros. Tendo em vista a necessidade de controle

da doença, foi instituído programas para monitorização e diminuição da anemia ferropriva, promovidos pelo governo brasileiro. Dentre as terapias instituídas para tratamento da população afetada, foi recomendado sulfato ferroso associado a vitamina C, pois esta interação mostrou-se uma maior absorção do ferro no intestino delgado, entretanto, existe formação de ions de ascorbato que são potencialmente tóxicos ao organismo, sendo capazes de induzir estresse oxidativo. O presente estudo, teve o objetivo de avaliar a interação entre a vitamina C com sulfato ferroso em comparação com o quelato bis-glicinato para identificar qual dos tratamentos se mostra mais danoso ao organismo. Foram utilizados 24 ratos machos *Wistar Hannover*, divididos em 3 grupos, os grupos submetidos aos respectivos tratamentos, por 40 dias, foram os animais que obtiveram a menor dosagem de hemoglobina e hematócrito. As alterações foram controladas pela dosagem de hemoglobina, hematócrito, TGO, TGP, ureia e creatinina, e com análise histopatológica do fígado e rim, após a eutanásia. Houve diferença nos componentes sanguíneos dos animais tratados com bis-glicinato comparado ao grupo controle, e uma diminuição de TGO

em ambos os grupos tratados comparado ao grupo controle. Na histopatologia evidenciou que o bis-glicinato apresentou observou-se a presença de macronúcleo e de infiltrado inflamatório no fígado, enquanto na associação do sulfato ferroso com a vitamina C, o parênquima do córtex renal apresentou-se células com citoplasma acidófilo, células tubulares apresentando irregularidade na borda apical que, por vezes se apresenta solto na luz tubular. Concluiu-se que em ambos os tratamentos houveram alterações hepáticas e renais, entretanto, o tratamento com o bis-glicinato, mostrou alterações patológicas somente no fígado.

PALAVRAS-CHAVE: Anemia Ferropriva. Sulfato Ferroso. Ácido Ascórbico.

EVALUATION OF THE TOXICITY OF THE ASSOCIATION OF ASCORBIC ACID/ FERROUS SULPHATE COMPARED TO FERROUS BIS-GLYCINATE CHELATE IN WISTAR RATS

ABSTRACT: Anemia comprises a blood disorder that manifests itself as a result of several factors. Among them, the partial or total absence of iron, which confirms one of the most frequent anemic disorders, called iron deficiency anemia, causing a decrease in the formation of hemoglobin, therefore, its absence induces the appearance of symptoms such as fatigue, weakness, indisposition, drowsiness, dizziness, dyspnea and among others. In view of the need to control the disease, programs were instituted to monitor and reduce iron deficiency anemia, promoted by the Brazilian government. Among the therapies instituted for the treatment of the affected population, ferrous sulfate associated with vitamin C was recommended, since this interaction showed a greater absorption of iron in the small intestine, however, there is formation of ascorbate ions that are potentially toxic to the organism, being capable of inducing oxidative stress. The present study aimed to evaluate the interaction between vitamin C and ferrous sulfate in comparison with the bis-glycinate chelate to identify which of the treatments is more harmful to the body. 24 male Wistar Hannover rats were used, divided into 3 groups, the groups submitted to the respective treatments, for 40 days, were the animals that obtained the lowest dosage of hemoglobin and hematocrit. Alterations were controlled by measuring hemoglobin, hematocrit, TGO, TGP, urea and creatinine, and with histopathological analysis of the liver and kidney, after euthanasia. There was a difference in the blood components of animals treated with bis-glycinate compared to the control group, and a decrease in TGO in both treated groups compared to the control group. Histopathology showed that bis-glycinate presented the presence of macronucleus and inflammatory infiltrate in the liver, while in the association of ferrous sulfate with vitamin C, the parenchyma of the renal cortex presented cells with acidophilic cytoplasm, tubular cells presenting irregularity at the apical edge, which sometimes appears loose in the tubular lumen. It was concluded that in both treatments there were liver and kidney changes, however, the treatment with bis-glycinate showed pathological changes only in the liver..

KEYWORDS: Anemia Iron-Deficiency. Ferrous Sulfate. Ascorbico

1 | INTRODUÇÃO

As anemias se encontram dentro de uma classe de distúrbio sanguíneo relacionado com os glóbulos vermelhos, desde a redução no número de hemácias, bem como as concentrações de hemoglobina dentro da célula. Tendo em vista que uma das principais

funções das hemácias é transportar a hemoglobina e, a mesma carrega oxigênio até os tecidos, em casos de diminuição desses elementos, será induzido um déficit de oxigenação tecidual, induzindo o organismo a responder para manter a homeostasia. Entretanto, a diminuição de oxigênio nos tecidos compromete intensamente o indivíduo, podendo fazer com que surjam sintomas como fraqueza, fadiga, cansaço, tontura, dispneia, indisposição, sono e entre outros. Porém, os sintomas podem variar de acordo com o tipo de anemia e sua intensidade (OMS, 2022).

Portanto, pode se originar em decorrência de diversos fatores, como por exemplo, a diminuição de vitamina B12 e folatos, elementos essenciais para produção das bases nitrogenadas, a ausência desses fatores induz ao aparecimento de hemácia com tamanho aumentado ou macrocítica. Esse evento pode surgir em detrimento carencial ou por disfunção da absorção desses compostos. Outras causas podem ser presenciadas em transfusões sanguíneas incompatíveis, induzindo a quadros de anemia hemolítica aguda, em que os anticorpos do doador destroem as hemácias do receptor, conseqüentemente, será proporcionada anemia de grau avançado em decorrência do baixo número de hemácias, devido à hemólise (VERRASTRO, 1996).

Levando em consideração a morfologia das hemácias, células anucleadas, com formato bicôncavo, medindo cerca de 7 a 8 µm (micrômetros) de comprimento, possuem em seu interior a hemoglobina, componente de grande importância para as funções da célula. São estruturas que possuem quatro cadeias polipeptídicas globínicas, apresentando um átomo de ferro no centro e unidas a quatro anéis porfirínicos (grupo heme). Uma de suas principais funções se pauta na ligação de modo fraco e reversível com o oxigênio, proporcionando uma capacidade de combinação nos pulmões e de dissociar de forma fácil a nível capilar nos tecidos, na qual a tensão de oxigênio é muito menor em comparação com os pulmões (GUYTON et al., 2017).

O ferro por sua vez, é absolutamente importante para a formação e função da hemoglobina, de forma que é um nutriente proveniente de fonte exógena, ao ser ingerido e absorvido no intestino delgado, combina-se com uma beta-globina, também denominada como transferrina. Tal molécula está envolvida com o transporte de ferro para diversas regiões do organismo. Contudo, boa parte do ferro é depositada nas células hepáticas, consistindo em cerca de 60%, sendo um local de armazenamento, sobre a forma de apoferritina ou, apenas, ferritina (GUYTON et al., 2017).

Posto isso, a ausência parcial ou incapacidade de utilizar ferro para produção de hemoglobina, induz um distúrbio anêmico com aparecimento de hemácias com tamanho diminuído ou microcíticas, junto da diminuição nos níveis de hemoglobina, compreendendo o fenômeno de hipocromia. Destacando que este tipo de anemia é uma das mais recorrentes entre os brasileiros, sendo um grande problema de saúde pública (VERRASTRO, 1996).

Considerando a realidade brasileira, a anemia é um problema de saúde pública para os governos. O PNDS (Programa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher)

apresentou dados em 2006 que constava uma prevalência de anemia em crianças, atingindo cerca de 20,9% dessa população, além de que as cerca de 29,4% das mulheres também eram portadoras de anemia. Dentro da prevalência de anemia em criança, foi apontado que o nordeste brasileiro é o mais afetado em relação as demais regiões, atingindo em torno de 25,5%, já no quesito de idade, são mais afetadas pelo distúrbio, crianças com idade inferior a 24 meses. Além disso, a população do gênero feminino apresenta cerca de 40% na região nordeste, em comparação com as demais, situação de domicílio e idade não foram associados (BRASIL, 2009).

Devido ao grande impacto que esta doença apresenta na sociedade, principalmente para os primeiros anos de vida e gestantes, mostrou-se a necessidade de estratégias para prevenção e controle das anemias, dos quais, o governo brasileiro criou o Programa Nacional de Suplementação de Ferro (PNSF) em 2005, instituído por meio da portaria 730, no dia 13 de maio, implementando a suplementação preventiva de ferro para crianças, gestantes e mulheres no pós-parto e pós-aborto. Sendo assim, o PNSF prevê a distribuição de ferro, para todos os cidadãos, sem incluir gastos, nas unidades básicas de saúde que conformam a rede SUS, estabelecendo estratégias voltadas para o controle e redução de anemia por deficiência de ferro no país (BRASIL, 2013).

Segundo uma pesquisa confiada pelo Ministério da Saúde, o Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil (ENANI-2019), com parceria da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), foi demonstrada que a prevalência de anemia no país foi reduzida pela metade nos últimos 13 anos. Em 2006, constava uma prevalência de 20,9%, contudo em 2019 encontra-se em 10%, dando destaque ao sudeste que obteve a menor redução, mantendo-se em 14,7%. Outros dados demonstraram que a prevalência de anemia ferropriva em crianças de até 5 anos é de 3,6%, cuja faixa etária mais afetada entre 6 à 23 meses, constituindo 8% da população infantil portadora do distúrbio (BRASIL, 2020).

Somado a isso, o PNSF realiza suplementação de ferro tanto para aqueles que já apresentam sinais e sintomas de anemia, como também, uma medida profilática, se pautando em uma estratégia para o combate à deficiência de ferro. O medicamento utilizado é o sulfato ferroso, tendo em vista que possui boa relação de efetividade e custo, sendo um método adotado desde 2005. O público alvo são as crianças de seis a 24 meses, gestantes próximas do pré-natal associado ao uso de ácido fólico. Enquanto os indivíduos com anemia diagnosticada, o protocolo é de acordo com o tipo de anemia, grau e qual a conduta adotada pelo profissional (BRASIL, 2013).

Sendo assim, o sulfato ferroso é um medicamento indicado tanto para tratamento de anemias por deficiência de ferro, como também, uma medida profilática. Esse medicamento é contraindicado para indivíduos que possuem hipersensibilidade aos sais de ferro, anemia por outras causas, como por exemplo, anemia falciforme, casos de hemossiderose e problemas hepáticos agudos. A posologia do medicamento, compreende em 1 comprimido ao dia, que equivale a 60 mg de ferro, utilizando 1 hora antes do almoço

Junto disso, o ferro proveniente da dieta, necessita estar na forma ferrosa para ser absorvido, dessa maneira, alguns compostos ajudam na redução do ferro, como por exemplo, o ácido ascórbico. Essa interação, reduz o ferro (Fe^{2+}), aumentando a sua absorção no intestino, desse modo, foi adotado essa associação na prescrição de diversos profissionais com o intuito de aumentar a absorção do composto. Todavia, essa interação tem um peso significativo para a vitamina C, pois a mesma é transformada em íons de ascorbato que é potencialmente tóxico ao organismo (SOUZA; LOCATELLI, 2012).

Outro medicamento indicado é o ferro quelato glicinato, para tratamento de anemia ferropriva, sendo administrado em prematuros, lactantes, crianças até 4 anos, gestantes, idosos, adolescentes e adultos. Tornando-se, contraindicado para pessoas que possuem hipersensibilidade com sais de ferro, anemias por outras causas, tais como, anemia hemolítica, acúmulo de ferro no organismo por incapacidade de utilização e entre outros. É um medicamento com alta estabilidade e não ionizado, portanto, é uma droga de baixa toxicidade, boa tolerabilidade, alta absorção e poucas interações com outros compostos.

Em suma, o sulfato ferroso é prescrito associado à vitamina C, contudo, existem indícios de que essa interação traz resultados negativos ao organismo devido ao comprometimento hepático. Enquanto o ferro quelato glicinato é um composto com alta estabilidade, e com interações reduzidas, porém, existe uma carência de artigos que explorem a interação deste medicamento com a vitamina C. Em virtude desses fatos, questiona-se qual o melhor tratamento para portadores de anemia ferropriva, assim objetiva-se comparar o melhor tratamento entre o ácido ascórbico e sulfato ferroso com o quelato de bis-glicinato ferroso, para portadores de anemia ferropriva.

2 | METODOLOGIA

O experimento teve duração de 40 dias, em torno de 5 semanas, os animais receberam ração padrão junto de água ad libitum, com os respectivos tratamentos para cada grupo. Portanto, foram divididos em 3 respectivos grupos, com 8 animais em cada: Grupo 1 (G1): Grupo controle, recebeu apenas água destilada 2 ml/Kg; Grupo 2 (G2): Grupo tratado, recebeu sulfato ferroso com ácido ascórbico (vitamina C); Grupo 3 (G3): Grupo tratado, recebeu ferro quelato glicinato. Esses compostos foram introduzidos por gavagem diariamente.

Antes do início do tratamento, os animais foram submetidos a coletas de sangue por punção caudal, retirada de sangue pelas veias laterais da cauda do animal (fig.1 A e B), para realização do hematócrito e dosagem de hemoglobina. Conforme realizado na primeira coleta (D1), os animais que obtinham menores níveis de hemoglobina e hematócrito, foram pré-selecionados para os respectivos tratamentos. Os resultados foram arquivados para análise comparativa após tratamento e eutanásia. Para este procedimento, foi utilizado: Cateter 24, tamanho G. Tubo roxo com EDTA (etilenodiaminotetracético),

13x75MM 3,5 mL.

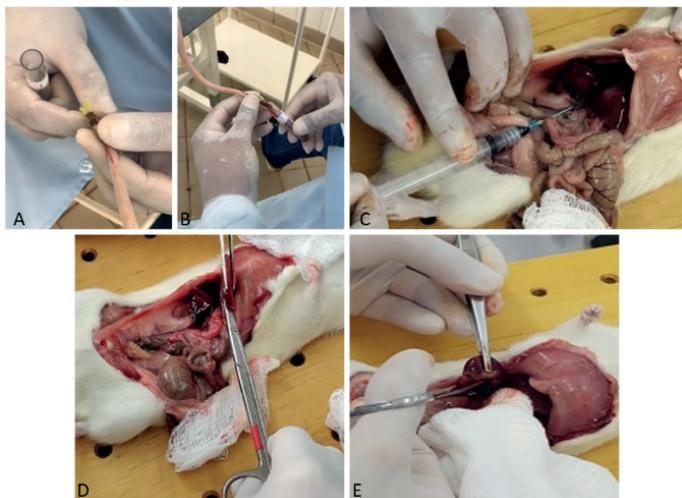


Fig. 1 Procedimentos Metodológicos: Em A e B: coleta de sangue da veia caudal, Em C: coleta de sangue da artéria aorta abdominal, Em D: coleta do fígado, Em E: coleta do rim

2.1 ANÁLISE HEMATOLÓGICA

Foi realizado o hematócrito (Ht), e a dosagem de hemoglobina, ambos os procedimentos foram realizados no laboratório de hematologia e líquidos corporais do Centro Universitário Barão de Mauá. Para o hematócrito, utilizou-se: Tubo capilar heparinizado; Bico de Bunsen; Centrífuga microhematócrito; Escala apropriada.

Após homogeneizar os tubos, encheu-se 2/3 do volume do capilar, selando na extremidade vazia, em chama de bico de Bunsen, na posição horizontal perpendicular a chama. Os tubos foram colocados na centrífuga específica a 1500 rpm por 5 minutos para sedimentação dos glóbulos vermelhos, e posterior análise com escala apropriada.

A dosagem de hemoglobina foi realizada pelo método da cianometa Hb, utilizando sangue total, padrão e o reagente Drabikin. A reação é realizada com auxílio do espectrofotômetro, com comprimento de onda entre 520 a 560 nm, e os valores obtidos foram convertidos em concentrações.

A análise hematológica ocorreu em 3 períodos distintos do experimento, sendo a primeira coleta no dia 1 (D1) antes do experimento, segunda coleta 32 dias após início do tratamento (D32) e a terceira coleta 40 dias depois experimento e eutanásia.

2.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

No presente estudo foi analisado as concentrações de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), ureia (URE), creatinina (CREA). Portanto, no

dia 40 os animais foram submetidos a eutanásia junto da retirada de sangue pela aorta abdominal para se obter as concentrações. Sendo assim, na coleta foi utilizado: Agulha azul descartável, tamanho 25mm X 0,6 mm, Seringa de 3 ml, Tubo amarelo ativador de coágulo + gel separador 13x75MM 3,5 mL, Tubo roxo com EDTA (etilenodiaminotetracético), 13x75MM 3,5 mL.

O tudo amarelo, após a retração do coágulo encaminhou-se para centrifugação (2.500 rpm por 5 minutos), pois o soro foi utilizado para fazer as dosagens bioquímicas de TGO/AST, TGP/ALT, ureia e creatinina.

As análises foram realizadas no laboratório de patologia clínica do Centro Universitário Barão de Mauá, utilizando o aparelho espectrofotômetro, que possui o método de análise através de um feixe de luz, que passa sobre amostra, captando a intensidade de cor que uma substância química consegue absorver. Portanto, o princípio básico é que os compostos absorvem e transmitem luz em amplitudes variadas, possuindo comprimentos de luz proporcionais, que serão captados e convertidos em concentrações.

Para que o evento anterior seja realizado, cada composto analisado necessita de um reagente específico, que são adquiridos através de kits fabricados industrialmente, logo, para cada elemento desse estudo, foi utilizado um kit diferente, sendo: Reagente AST (TGO), Analisa®, Reagente ALT (TGP), Analisa®, Reagente Ureia, Analisa®, Reagente Creatinina, Analisa®. A análise bioquímica ocorreu somente na terceira coleta, após 40 dias de experimento e eutanásia.

2.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Após 40 dias de experimento (D40), os animais foram submetidos a eutanásia, nesta etapa foi retirado sangue através da aorta abdominal (fig. 1C) para as análises bioquímicas e hematológicas, e a retirada do fígado e rim para os procedimentos histológicos de rotina (Fig. 1 D e E).

2.4 MEDICAMENTOS

2.4.1 Controle

No grupo 1 destinou-se tratamento placebo, cujo, foi utilizado 2ml/Kg de água destilada, equivalendo a 0,5ml por animal, em vista da média de peso em torno de 250g.

3.7.2 Sulfato ferroso

Para o grupo 2, foi administrado sulfato ferroso heptaidratado na concentração de 125mg de ferro elementar em gotas. Padronizou-se 2,6mg/kg, correspondendo a 0,65mg por animal, portanto, foi diluído 1 ml de sulfato para 100 ml de água destilada, sendo administrado 0,5ml a cada animal de 250g em média.

2.4.2 Ácido ascórbico

O grupo 2 associou-se o sulfato ferroso com vitamina C para avaliar o impacto da interação. Portanto, utilizou-se ácido ascórbico 200mg/ml fabricado pelo Laboratório Globo ©. Padronizou-se 28mg/kg equivalendo a 7mg por animal, portanto foi diluído 1 ml de vitamina C em 14ml de água destilada, administrando 0,5 ml da diluição para cada animal.

2.4.3 Ferro glicinato

Para o grupo 3, foi administrado glicinato Neurofer® na concentração de 250mg/ml de ferro. Em virtude, padronizou-se 10mg/kg, equivalente a 2,5mg por animal, diluindo-se 1ml de Neurofer em 50ml de água destilada, administrando 0,5ml a cada animal.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizamos variáveis quantitativas sobre análise estatística de um método não paramétrico, em razão dos resultados não respeitarem os parâmetros de distribuição, portanto, foi realizado teste Kruskal-Wallis, com pós-teste Dunn na comparação entre grupos.

Desta forma a significância estatística se mostrou presente quando os resultados expostos ao teste, apresentaram valores menores que $p < 0,05$.

2.6 EUTANÁSIA

A eutanásia foi realizada após 40 dias de experimento (D40), com sobredosagem de anestésico geral Thiopental sódico, garantindo inconsciência, com intuito de evitar sofrimento físico e mental do animal.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os tipos de anemia, a ferropênica possui a maiores incidências na clínica, portanto, a necessidade de conhecimento e tratamento são indispensáveis. É característico uma maior prevalência em crianças, gestantes e jovens, principalmente, aos que sofrem com baixo nível socioeconômico (VERRASTRO, 1996).

O ferro é amplamente distribuído no organismo, sendo 67% do total acoplado a molécula de hemoglobina, portanto, a maior parte esta presente dentro das hemácias. Sendo assim, a diminuição de ferro implica em uma diminuição de hemoglobina, que gera como consequência diminuição de oxigênio a nível tecidual. A intensidade da deficiência define a gravidade do quadro clínico do paciente, cursando com sintomas de palidez, fraqueza, desânimo, anorexia, dispneia aos esforços, taquicardia, palpitação, cefaleia, desmaio e entre outros (VERRASTRO, 1996).

Por conseguinte, a necessidade de tratamento tornou-se essencial para combate a doença. Deste modo, foi preconizado a utilização de sulfato ferroso associado a vitamina C, pois esta interação aumenta a absorção e os níveis de ferro do organismo. Entretanto, esta combinação colabora com a elevação do estresse oxidativo junto de lesões hepáticas, devido a formação de íons de ascorbato potencialmente tóxico ao organismo (SOUZA; LOCATELLI, 2012).

Com o intuito de verificar qual tratamento se mostra mais pejorativo ao organismo, utilizamos 24 ratos machos *Wistar* divididos em grupos, sendo submetidos ao tratamento com sulfato ferroso e vitamina C, como também, ao medicamento bis glicinato durante 40 dias.

Os resultados a nível plasmático, foram dispostos em tabelas e discutidos com base nos gráficos, os mesmos encaminharam-se a análise estatística Kruskal-Wallis com pós teste Dunn. Já a análise histopatológica, foi discutido com base nas imagens tiradas dos tecidos após toda preparação histológica.

GRUPO 1/	Média	DP	Teste Kruskal-wallis	S/NS	Teste Dunn vs G2	NS/S	Teste Dunn vs G3	S/NS
Hematócrito (Ht) - D1	41,62	0,5649	0,1866	NS	-	NS	-	NS
Hematócrito (Ht) - D32	46,25	0,5261	0,9683	NS	-	NS	-	NS
Hematócrito (Ht) - D40	42	1,2392	0,6233	NS	-	NS	-	NS
Hemoglobina (Hb) - D1	14,93	0,9389	0,0328	S	-	NS	0,03	S
Hemoglobina (Hb) - D32	9,04	0,3782	0,4033	NS	-	NS	-	NS
Hemoglobina (Hb) - D40	7,92	0,2769	0,5752	NS	-	NS	-	NS
Ureia (URE) - D40	48,28	2,18	0,5009	NS	-	NS	-	NS
Creatinina (CREA)	0,338	0,022	0,1594	NS	-	NS	-	NS
AST/TGO - D40	42,8	6,3098	0,005	S	0,0234	S	0,0348	S
ALT/TGP - D40	32,8	2,58	0,9743	NS	-	NS	-	NS

Tabela 1. Representação grupo 1

Fonte: os autores

A tabela 1 compreende os resultados do grupo controle (G1), representando os analitos e seus respectivos valores. As variáveis foram submetidas ao teste estatístico

ANOVA Kruskal-Wallis, não paramétrico com pós teste Dunn, em decorrência dos valores não respeitarem um parâmetro de distribuição e pelo estudo comportar 3 grupos.

GRUPO 2	Média	DP	Teste Kruskal-wallis	S/NS	Teste Dunn vs G1	S/NS	Teste Dunn vs G3	S/NS
Hematócrito (Ht) - D1	42,65	0,8438	0,1866	NS	-	NS	-	NS
Hematócrito (Ht) - D32	46,5	0,3273	0,9683	NS	-	NS	-	NS
Hematócrito (Ht) - D40	43,62	0,77	0,6233	NS	-	NS	-	NS
Hemoglobina (Hb) - D1	13,49	0,54	0,0328	S	>0,9999	NS	0,2373	NS
Hemoglobina (Hb) - D32	8,57	0,48	0,4033	NS	-	NS	-	NS
Hemoglobina (Hb) - D40	8,21	0,18	0,5752	NS	-	NS	-	NS
Ureia (URE) - D40	48	4,14	0,5009	NS	-	NS	-	NS
Creatinina (CREA)	0,31	0,03	0,1594	NS	-	NS	-	NS
AST/TGO - D40	18,03	4,29	0,005	S	0,0234	S	>0,9999	NS
ALT/TGP - D40	33,61	3,87	0,9743	NS	-	NS	-	NS

Tabela 2. Representação Grupo 2

Fonte: os autores

A tabela 2 compreende os resultados do grupo tratado com Sulfato Ferroso e Vitamina C (G2), representando os analitos e seus respectivos valores. As variáveis foram submetidas ao teste estatístico ANOVA Kruskal-Wallis, não paramétrico com pós teste Dunn, em decorrência dos valores não respeitarem um parâmetro de distribuição e pelo estudo comportar 3 grupos.

GRUPO 3	Média	DP	Teste Kruskal- wallis	S/NS	Teste Dunn vs G1	S/NS	Teste Dunn vs G2	S/NS
Hematócrito (Ht) - D1	43,57	0,56	0,1866	NS	-	NS	-	NS
Hematócrito (Ht) - D32	46,57	0,36	0,9683	NS	-	NS	-	NS
Hematócrito (Ht) - D40	42,71	0,68	0,6233	NS	-	NS	-	NS
Hemoglobina (Hb) - D1	11,68	0,55	0,0328	S	0,03	S	0,2373	NS
Hemoglobina (Hb) - D32	9,27	0,2	0,4033	NS	-	NS	-	NS
Hemoglobina (Hb) - D40	8,02	0,5	0,5752	NS	-	NS	-	NS
Ureia (URE) - D40	44,59	1,22	0,5009	NS	-	NS	-	NS
Creatinina (CREA)	0,42	0,04	0,1594	NS	-	NS	-	NS
AST/TGO - D40	18,21	2,91	0,005	S	0,0348	S	>0,9999	NS
ALT/TGP - D40	31,87	3,87	0,9743	NS	-	NS	-	NS

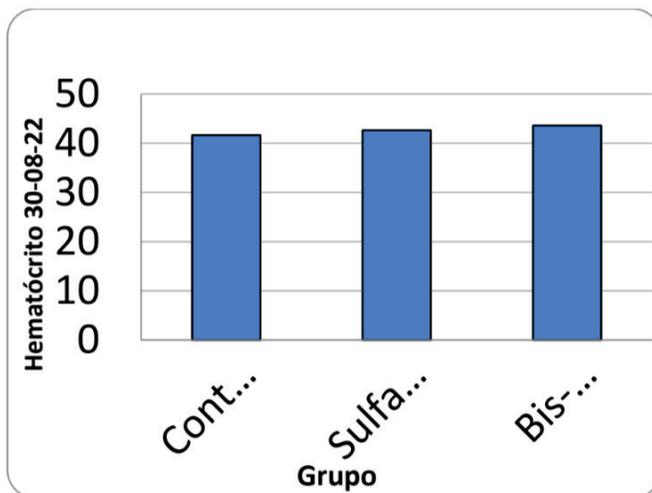
Tabela 3. Representação Grupo 3

Fonte: os autores

A tabela 3 compreende os resultados do grupo tratado com Ferro Bis-glicinato (G3), representando os analitos e seus respectivos valores. As variáveis foram submetidas ao teste estatístico ANOVA Kruskal-Wallis, não paramétrico com pós teste Dunn, em decorrência dos valores não respeitarem um parâmetro de distribuição e pelo estudo comportar 3 grupos.

3.1 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA

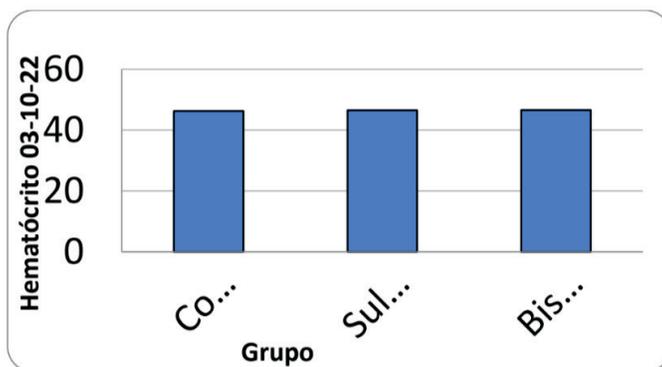
Foram realizadas dosagens de hemoglobina e hematócrito para avaliação hematológica. Quando se tratava do hematócrito, não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados e o grupo controle, obtendo $p > 0,05$ (teste de Kruskal-Wallis, não paramétrico). Estes dados concordam com os resultados encontrados por Souza e Locatelli (2012) em ratos *Wistar* submetido a tratamento crônico com sulfato ferroso e vitamina C. Tendo em vista que o hematócrito é um parâmetro percentual que indica o número de células no plasma, a oscilação discreta apresentada no experimento, compreende que não existiu um aumento no número de hemácias mediante os tratamentos introduzidos.



Dosagem de hematócrito realizada no D1 antes do início do tratamento. Resultados não significante de todo os grupos com $p=0,1866$ pelo teste de Kruskal-Wallis, não paramétrico.

Gráfico 1. 1ª dosagem do hematócrito antes do experimento.

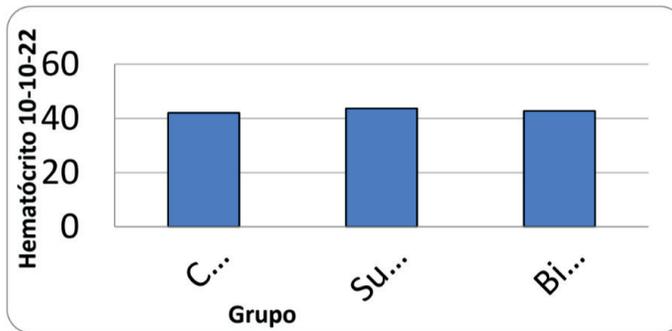
Fonte: Pessoal.



Dosagem de hematócrito realizada no D32 após início do tratamento. Resultados não significante de todos os grupos com $p=0,9683$ pelo teste de Kruskal-Wallis, não paramétrico.

Gráfico 2. 2ª dosagem do hematócrito 32 dias após início do experimento.

Fonte: Pessoal.



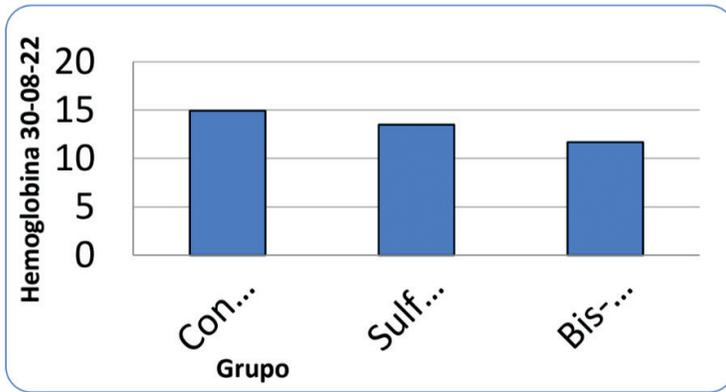
Dosagem de hematócrito realizada no D40 após tratamento e eutanásia. Resultados não significante de todos os grupos com $p=0,6233$ pelo teste de Kruskal-Wallis, não paramétrico.

Gráfico 3. 3ª dosagem do hematócrito 40 dias após início do experimento.

Fonte: Pessoal.

A hemoglobina, antes dos animais serem submetidos aos tratamentos, não houve significância estatística na avaliação entre sulfato ferroso associado a vitamina C com o grupo controle. Entretanto, quando comparado grupo que recebeu bis-glicinato com grupo controle, foi notado uma diferença significativa de $p=0,0328$ (Teste estatístico Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn).

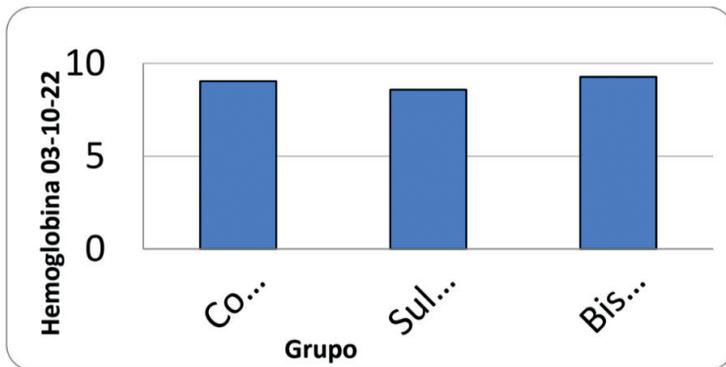
Após início dos tratamentos, não houve discrepância acentuada entre os valores de hemoglobina, portanto todos os grupos comparados não apresentaram diferença significativa estatisticamente. Possivelmente, o medicamento bis-glicinato aplicado ao G3 explica a equivalência dos valores após tratamento, tendo em vista o déficit apresentado no início do experimento antes dos animais serem submetidos a terapêutica. Vale ressaltar que as fezes dos animais que receberam tratamento tinham colorações mais escuras e textura pastosa, sendo indicativo de eliminação de ferro a partir do metabolismo animal.



Dosagem de hemoglobina realizada no D1 antes do início do tratamento. Resultado significativo de $p=0,03228$ pelo teste de Kruskal-Wallis, não paramétrico com pós teste Dunn significativo entre o grupo controle vs tratado com bis-glicinato.

Gráfico 4.1ª dosagem da hemoglobina, antes do experimento.

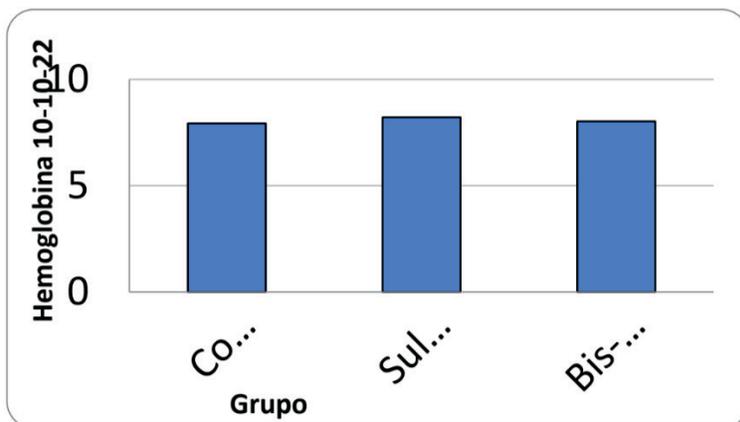
Fonte: pessoal



Dosagem de hemoglobina realizada no D32 após início do tratamento. Resultado não significativo entre todos os grupos de $p=0,4033$ pelo teste de Kruskal-wallis, não paramétrico.

Gráfico 5. 2ª dosagem da hemoglobina, 32 dias após início do experimento.

Fonte: Pessoal.



Dosagem de hemoglobina realizada no D40 após tratamento e eutanásia. Resultado não significativo de todos os grupos com $p=0,5752$ pelo teste de Kruskal-wallis, não paramétrico.

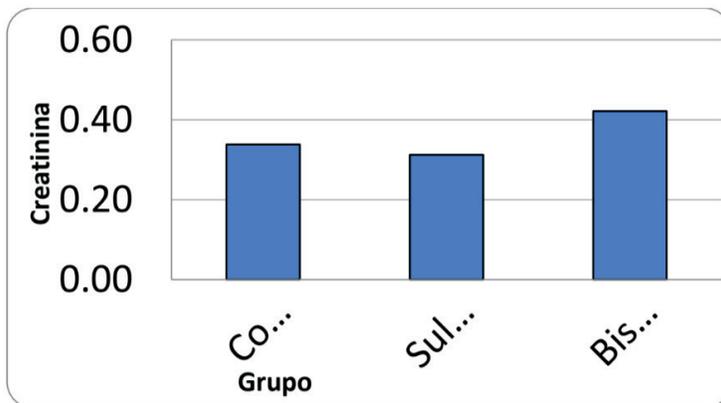
Gráfico 6. 3ª dosagem da hemoglobina, 40 dias após início do experimento.

Fonte: Pessoal.

3.2 ANÁLISE BIOQUÍMICA

Foram dosados ureia e creatinina para avaliação da função renal dos animais. Esses parâmetros podem aparecer aumentados em situações de afecção renais. (HAUSER, 2018). A creatinina é um composto derivado do metabolismo de creatina, o mesmo é eliminado continuamente na urina e seus valores podem aparecer aumentados no plasma na insuficiência renal aguda, como também, em outros eventos que não necessariamente se relacionam com alguma doença (HAUSER, 2018).

Quando examinado a creatinina (CREA), os valores não apresentaram diferenças acentuadas na comparação. Após os dados serem submetidos a teste de Kruskal-wallis, não foi evidenciado uma diferença significativa entre os grupos que receberam tratamento para o grupo controle.



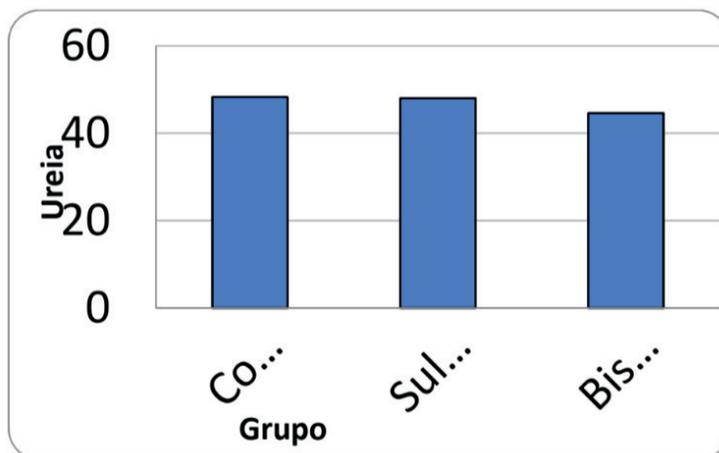
Dosagem de creatinina realizada no D40 após tratamento e eutanásia. Resultado não significativo de $p=0,1594$ pelo teste de Kruskal-wallis, não paramétrico.

Gráfico 7. Dosagem da creatinina, 40 dias após início do tratamento.

Fonte: Pessoal.

Já a ureia, é um composto formado a partir do metabolismo de proteínas, sendo derivado da conversão da amônia. Seus valores podem oscilar em decorrência dos hormônios que atinge diretamente o metabolismo de proteínas, como também em situações de insuficiência renal aguda (HAUSER, 2018).

Observado as concentrações de ureia (URE), os valores entre os grupos tratados e o grupo controle, também não apresentaram diferença estatística significativa quando submetidos ao teste. Estes resultados concordaram com o estudo de Souza e Locatelli (2012), em ratos *Wistar* submetido a tratamento crônico com sulfato ferroso e vitamina C, indicando que não houve comprometimento renal em decorrência da utilização das drogas.

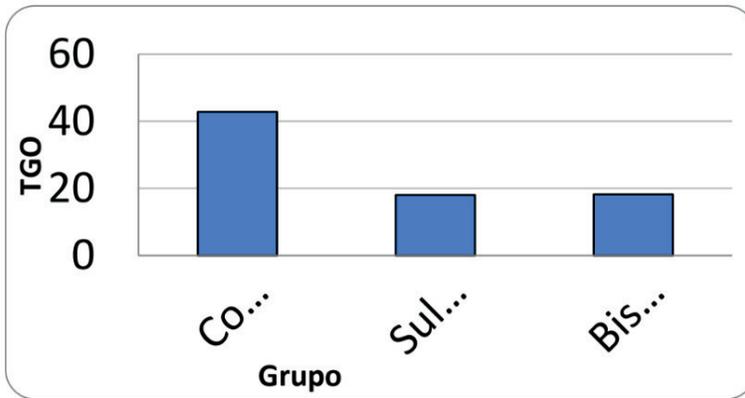


Dosagem de ureia realizada no D40 após tratamento e eutanásia. Resultado não significativo de $p=0,5009$ pelo teste de Kruskal-wallis, não paramétrico.

Gráfico 8. Dosagem da uréia 40 dias após início do tratamento.

Outros parâmetros avaliados foram AST/TGO e ALT/TGP, que são marcadores sensíveis de biossíntese hepática, essas enzimas estão correlacionadas com as atividades metabólicas do fígado. Seus valores alterados podem indicar lesões nos hepatócitos, como por exemplo, hepatite, cirrose, esteatose hepática e entre outros (SÁEZ-ALQUÉZAR, 2018).

Quando analisado AST/TGO, observou-se uma diferença estatística significativa entre os grupos tratados e o grupo controle, com $p=0,005$ (Teste estatístico Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn). Na análise entre grupos, o grupo controle vs sulfato ferroso, foi obtido $p=0,0234$ e quando observado controle vs bis-glicinato, atingiu $p=0,0348$. Já na avaliação comparativa entre os grupos tratados, não obteve diferença estatística significativa. Essas alterações estão possivelmente atreladas aos efeitos colaterais medicamentosos.

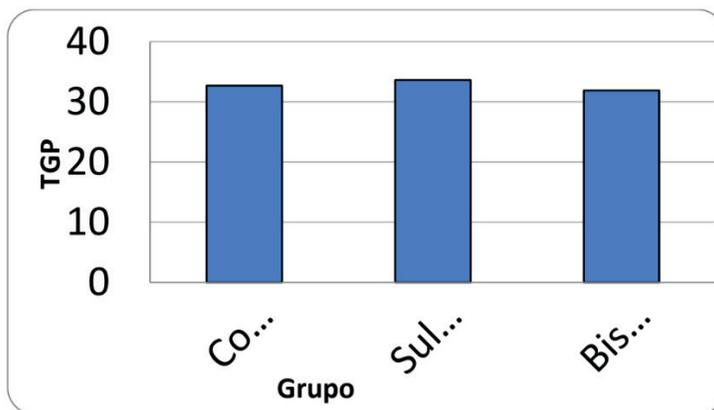


Dosagem de AST/TGO realizada no D40 após tratamento e eutanásia. Resultado significativo de $p=0,005$ pelo teste de Kruskal-Wallis, não paramétrico com pós teste Dunn significativo entre o grupo controle vs tratado com bis-glicinato ($p=0,0348$) e controle vs sulfato ferroso ($p=0,0234$)

Gráfico 9. Dosagem do TGO, 40 dias após início do tratamento.

Fonte: pessoal.

Quando examinado TGP/ALT, não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados e o grupo controle, apresentando $p=0,9743$ (teste de Kruskal-Wallis, com pós teste Dunn). Os dados correlacionados com as enzimas hepáticas, discordam do estudo realizado por Souza e Locatelli (2012), que apresentaram elevação de ALT na comparação dos grupos tratados e controle. A ausência de elevação dessas enzimas no soro, reflete em ausência de comprometimento de biossíntese do fígado, não sendo expresso uma afecção hepática a nível plasmático (SÁEZ-ALQUÉZAR, 2018).



Dosagem de AST/TGP realizada no D40 após tratamento e eutanásia. Resultado não significativo de $p=0,9743$ pelo teste de Kruskal-wallis, não paramétrico.

Gráfico 10. Dosagem TGP, 40 dias após início do tratamento.

Fonte: Pessoal.

3.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

3.3.1 Análise renal

Na análise histopatológica do rim dos animais do grupo controle (fig. 2C), observou-se o parênquima do córtex renal com aspectos normais, glomérulos renais e estruturas tubulares com características morfológicas dentro da normalidade.

No grupo que recebeu sulfato ferroso + Vit. C (fig. SF+VC) (fig. 4E) o parênquima do córtex renal apresentou-se células com citoplasma acidófilo (setas pretas), células tubulares apresentando irregularidade na borda apical que, por vezes se apresenta solto na luz tubular (seta branca). No grupo que recebeu glicinato ferroso (fig. 2 GF) observou-se o parênquima do córtex renal com as estruturas glomerulares e tubulares dentro da normalidade, espaço glomerular normal (seta preta).

3.3.2 Análise hepática

Na análise histopatológica do fígado de animal do grupo controle (fig. 2 C) observou-se o parênquima hepático normal, com aspectos lobulares preservados e cordões de hepatócitos com características também normais. No grupo que recebeu sulfato ferroso + Vit. C (fig. 2 SF+VC) áreas hepáticas preservadas, entretanto, observa-se uma intensa vascularização no espaço portal (seta preta). No grupo que recebeu glicinato ferroso (fig. 2 GF) observou-se o parênquima hepático normal, com cordões hepáticos e capilares sinusóides de aspectos normais, entretanto, observou-se a presença de macronúcleos (seta preta), e de infiltrado inflamatório (seta branca).

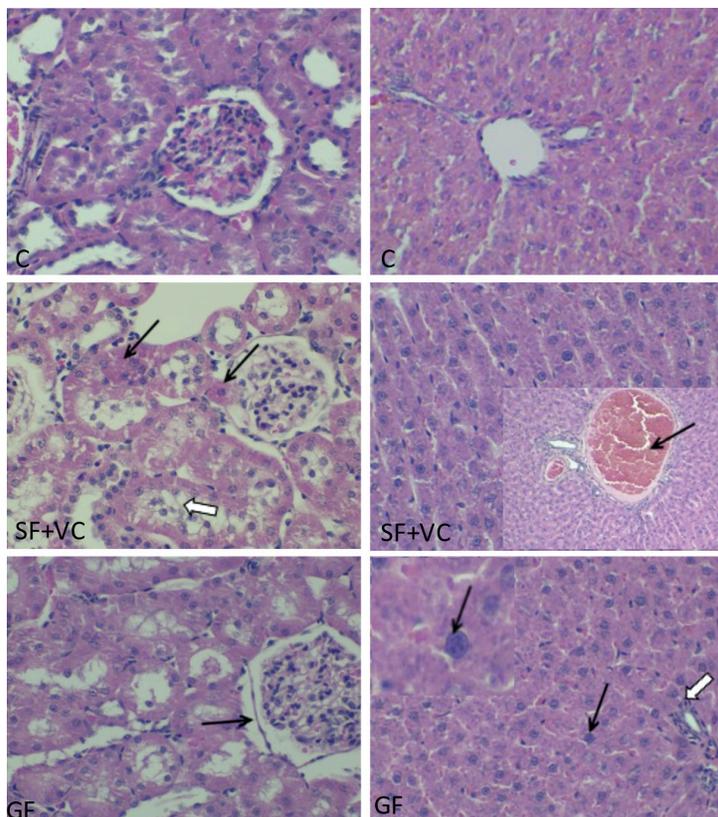


Fig. 2 Fotomicrografias dos aspectos histopatológicos do rim e fígado(H.E.) aum. 40X. Em C: grupo controle, Em SF+ VC: grupo sulfato ferroso e vit. C, Em GF: grupo glicinato ferroso.

Fonte: Os autores

CONCLUSÃO

Com base nos valores diminuídos da hemoglobina entre o grupo tratado com bis-glicinato para o grupo controle antes do início do tratamento, e após o tratamento não houve diferença estatística significativa. Concluiu-se neste estudo, que os medicamentos a base de ferro alteram os elementos sanguíneos.

Na avaliação bioquímica, os valores de TGO/AST apresentaram -se diminuídos, quando comparado ao grupo controle, em ambos os grupos tratados.

Na análise histopatológica, o grupo tratado com sulfato ferroso e vitamina C, apresentou tanto alterações relevantes no córtex e nas células tubulares do sistema renal, como também, intensa vascularização no parênquima hepático. No grupo tratado com bis-glicinato, apresentou apenas comprometimento hepático com a presença de macronúcleos e infiltrado inflamatório.

Em ambos os tratamentos apresentaram alterações, entretanto, a interação

medicamentosa do sulfato ferroso com vitamina C apresentou danos histológicos tanto em nível hepático, como renal, enquanto o tratamento com o bis-glicinato, mostrou alterações patológicas relacionadas apenas, no fígado.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Programa Nacional de Suplementação de Ferro: manual de condutas gerais / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.
- GLICINATO FÉRRICO: comprimido. Responsável Técnico: Dra. Francielle Tatiana Mathias CRF/PR 24612, ORTOLÂNDIA EMF SIGMA PHARMA LTDA. 01/12/2015.
- GUYTON, Arthur C. *et al.* **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.
- HAUSER, Aline Borsato. Doenças Renais. In: BARCELOS, Luiz Fernando *et al.* **Tratado de Análise Clínicas**. São Paulo: Atheneu, 2018. Cap. 9. p. 99-112.
- OMS. **Anemia**. Disponível em: https://www.who.int/es/health-topics/anaemia#tab=tab_3. Acesso em: 16 jun. 2022.
- SÁEZ-ALQUÉZAR, Amadeu. Fígado, Enzimas e Proteínas Plasmáticas. In: BARCELOS, Luiz Fernando *et al.* **Tratado de Análise Clínicas**. São Paulo: Atheneu, 2018. Cap. 12. p. 141-158.
- SAÚDE, Ministério da. **Brasil reduz anemia e carência de vitamina A em crianças de até cinco anos**. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2020/dezembro/brasil-reduz-anemia-e-carencia-de-vitamina-a-em-criancas-de-ate-cinco-anos>. Acesso em: 12 jun. 2021.
- SAÚDE, Ministério da. **PNDS: resultado sobre anemias e hipovitaminose A no Brasil**. 2009. Disponível em: <https://livroaberto.ibict.br/bitstream/1/569/1/PNDS%20anemia%20e%20hipovitaminose%20A%20no%20Brasil.pdf>. Acesso em: 16 jun. 2022.
- SULFATO FERROSO: comprimido. Responsável Técnico: Dra. Francielle Tatiana Mathias CRF/PR 24612, MINAS GERAIS: Laboratórios Osório de Moraes Ltda. 19/05/2020
- VERRASTRO, Therezinha. **Hematologia-Hemoterapia**. São Paulo: Atheneu, 1996.
- SOUZA, M. C.; LOCATELLI, C.. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA ASSOCIAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO/ SULFATO FERROSO EM RATOS TRATADOS SUBCRONICAMENTE. **Ágora**, Santa Catarina, v. 16, n. 2, p. 455-468, dez. 2012.