



UNIVALI
UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

LISIANE MAGALI ROSA SCHÖNINGER

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO COMPLEXO QUITOSANA FERRO-III
SOLÚVEL E INSOLÚVEL EM ANIMAIS TRATADOS COM ALOXANO**

Itajaí - 2007

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS BIOATIVAS

LISIANE MAGALI ROSA SCHÖNINGER

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO COMPLEXO QUITOSANA FERRO-III
SOLÚVEL E INSOLÚVEL EM ANIMAIS TRATADOS COM ALOXANO

Dissertação submetida à Universidade
do Vale do Itajaí como parte dos
requisitos para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Clóvis Antônio
Rodrigues.

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Cristiani Bürger.

Itajaí, Fevereiro de 2007.

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO COMPLEXO QUITOSANA FERRO-III SOLÚVEL E INSOLÚVEL EM ANIMAIS TRATADOS COM ALOXANO

Lisiane Magali Rosa Schöninger

‘Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Produtos Naturais e Substâncias Bioativas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí.’

Clóvis Antônio Rodrigues, Doutor
Orientador
(corpo 11)

Tânia Bresolin, Doutora
Coordenador do Programa Mestrado em Ciências Farmacêuticas
(corpo 11)

Apresentado perante a Banca Examinadora composta pelos Professores:

Dr. Clóvis Antônio Rodrigues (Univali)
Presidente

Dra. Cristiani Bürger (Univali)
Co-orientadora

Titulação Nome do Membro da Banca (instituição)
Membro
(corpo 11)

Titulação Nome do Membro da Banca (instituição)
Membro
(corpo 11)

Itajaí (SC), 20, fevereiro de 2007.

*Dedico este trabalho ao meu marido Roque
meu grande amor e companheiro de todos os momentos.*

*Aos meus pais, Roberto e Natália pelo amor, carinho, incentivo e
sobretudo pela confiança demonstrada ao longo de todos esses anos.*

*À Luisa, minha filha,
Que com muito amor foi gerada
Durante a realização deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Clóvis Antônio Rodrigues pela orientação segura e competente e acima de tudo pelo entusiasmo e incentivo que tanto me ajudaram a realizar esse trabalho.

À Prof^a. Cristiani Büger pela orientação, amizade, confiança, segurança e principalmente por me ensinar que aprender é buscar constantemente novos caminhos.

À Prof^a. Márcia Maria de Souza pelas preciosas contribuições que possibilitaram a concretização deste trabalho.

Ao Prof. Rilton, pela colaboração nas correções do trabalho.

Às minhas irmãs, Viviane e Roberta, pelo carinho e dedicação que contribuíram tanto na realização deste trabalho e das quais tenho muito orgulho.

Aos meus cunhados, Jurandir e Daniel, pela amizade e carinho de todos estes anos.

À minha amiga Marina Elisa Felipe, pela amizade, carinho, incentivo e pela realização de grande parte dos ensaios bioquímicos.

À toda equipe do Laboratório Escola de Análises Clínicas sobretudo às amigas Juliana, Daniela e Jussara (Piá), que permitiram e colaboraram muito para a realização deste trabalho.

Aos Bioquímicos do Laboratório do Hospital Pequeno Anjo, que contribuíram na realização de parte dos ensaios bioquímicos.

Aos técnicos dos Laboratórios de pesquisa, que colaboraram muito na realização dos experimentos.

AValiação DOS EFEITOS DO COMPLEXO QUITOSANA FERRO-III SOLúVEL E INSOLúVEL EM ANIMAIS TRATADOS COM ALOXANO

Lisiane Magali Rosa Schöninger

Fevereiro /2007

Orientador: Clóvis Antônio Rodrigues, Doutor.

Área de Concentração: Biopolímeros e Atividade Biológica.

Número de Páginas: 92.

A Doença Renal Crônica consiste em lesão renal e perda progressiva e irreversível das funções glomerular, tubular e endócrina dos rins. Doenças como o *Diabetes mellitus* e a hipertensão são responsáveis por 70% dos casos de doença renal em estágio final requerendo terapias como diálise ou transplante. Na Insuficiência Renal Crônica (IRC), a ausência de função renal tem como resultado a hiperfosfatemia na maioria dos pacientes. A diálise por si só é incapaz de remover a quantidade total de fósforo ingerido numa alimentação adequada devido ao baixo efluxo de fósforo que vai do espaço intracelular para o espaço extracelular. Os agentes que se ligam ao fósforo são eficazes em diminuir a absorção do fósforo intestinal, no entanto, podem possuir efeitos secundários como a hipercalcemia (carbonato de cálcio, acetato de cálcio), a toxicidade (alumínio), calcificação extra-óssea e doença cardíaca. A quitosana complexada com o Ferro (III) e reticulada com glutaraldeído QTS-Fe(III)R mostrou-se eficiente na redução do fosfato no soro de ratos hiperfosfatêmicos. O objetivo deste trabalho é avaliar os possíveis efeitos da quitosana ferro (III) solúvel e insolúvel sobre o metabolismo do fósforo em animais com lesão renal. Para os experimentos foram utilizados ratos da raça *Wistar*, cepa UNIVALI, machos e fêmeas, pesando aproximadamente 200 gramas. Os animais foram induzidos a lesão renal através de droga diabetogênica (aloxano) e fosfato, sendo então tratados com Quitosana-ferro(III) solúvel e insolúvel através de solução via oral por 15 dias e através de ração por 15 e 30 dias. Os resultados mostraram que no experimento via oral (solução com o polímero) tanto a quitosana solúvel como a insolúvel foi efetiva, já no tratamento através de ração, somente a quitosana reticulada apresentou resultados efetivos. Através dos resultados pode-se concluir que o aloxano, juntamente com o fosfato via oral (água e ração), aumentou os níveis séricos de fosfato. O complexo quitosana-ferro(III) tanto solúvel como insolúvel foi efetivo em adsorver o fosfato quando administrados no tratamento via oral. No tratamento através de ração, apenas o polímero insolúvel apresentou efetividade tanto no tratamento de 30 dias como no de 15 dias. O sexo dos animais não proporcionou alterações muito pronunciadas no presente estudo. Os resultados dos níveis de ferro sérico demonstraram a estabilidade do polímero, não liberando o ferro na circulação.

Palavras Chave: Doença Renal Crônica, Hiperfosfatemia, Quitosana-ferro(III).

EVALUATION OF THE EFFECTS OF THE SOLUBLE AND INSOLUBLE IRON (III) -CHITOSAN COMPLEX IN ANIMALS TREATED WITH ALLOXAN

Lisiane Magali Rosa Schöninger

February 2007

Advisor: Clóvis Antônio Rodrigues, PhD.

Concentration Area: Biopolymers and Biological Activity.

Number of Pages: 92.

Chronic Kidney Disease consists of renal lesion and progressive, irreversible loss of glomerular, tubular and endocrine functions of the kidneys. Diseases like *Diabetes mellitus* and hypertension account for 79% of all cases of final stage renal disease requiring treatments like dialysis or transplant. In Chronic Renal Insufficiency (CRI), the absence of renal function results in hyperphosphatemia in the majority of patients. Dialysis alone is incapable of removing the total quantity of phosphor ingested in a complete meal, due to the low efflux of phosphor which travels from the inner cell space to outer cell space. Agents that bond with the phosphor are effective in decreasing the absorption of intestinal phosphor; however, they may have some adverse side effects such as hypercalcaemia (calcium carbonate, calcium acetate), toxicity (aluminum), extra-osseous calcification and heart disease. Chitosan complexed with Iron (III) and reticulated with glutaraldehyd CTS-Fe(III)R proved to be effective in reducing the phosphate in the fluids of hyperphosphatemic mice. This work aims to evaluate the possible effects of soluble and insoluble iron (III) chitosan on the phosphor metabolism of animals with kidney lesion. For the experiments, Wistar mice were used, UNIVALI strain, males and females weighing approximately 200 grams each. Kidney lesion was induced in the animals through the diabetogenic drug (alloxan) and phosphate, followed by treatment with soluble and insoluble iron III chitosan via oral solution, for 15 days and through the food for a further 15 and 30 days. The results showed that the experiment, *via oral*, (soluble with the polymer), both the soluble and the insoluble chitosan were effective, while in the treatment through the food, only the reticulated chitosan showed effective results. With these results, we can conclude that the alloxan, together with the phosphate via oral (water and food), increased the blood phosphate levels. The iron (III) chitosan phosphates, both soluble and insoluble, effectively absorbed the phosphate when the treatment was administered *via oral*. In the treatment administered through the food, only the insoluble polymer proved effective, both in the 30-day and the 15-day treatment. The animal's gender did not affect the study in any noticeable way. The blood iron levels demonstrate the stability of the polymer, since it does not release iron into the circulation.

Key Words: Kidney Chronic Disease, Hyperphosphatemia, Iron (III) Chitosan

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Absorção e eliminação de fósforo (CUPPARI, 1998).....5
- Figura 2:** Metabolismo do fósforo, cálcio e magnésio (ALONSO et al, 2002)....6
- Figura 3:** Efeito do tratamento com o complexo quitosana-ferro sobre o peso corporal dos animais tratados durante 15 dias.....28
- Figura 4:** Efeito do tratamento com o complexo quitosana-ferro sobre o peso dos órgãos dos animais tratados durante 15 dias.....29
- Figura 5:** Efeito do tratamento com o complexo quitosana-ferro sobre o peso corporal dos animais tratados por 30 dias.....38
- Figura 6:** Efeito do tratamento com o complexo quitosana-ferro sobre o peso relativo dos órgãos dos animais tratados por 30 dias.....39
- Figura 7:** Efeito do tratamento com o complexo quitosana-ferro sobre a variação do peso corporal dos animais fêmeas (A) e machos (B) tratados durante 15 dias.....50
- Figura 8:** Efeito do tratamento com o complexo quitosana-ferro sobre o peso relativo dos órgãos de ratos fêmeas tratados durante 15 dias.....51

Figura 9: Efeito do tratamento com o complexo quitosana-ferro sobre o peso relativo dos órgãos dos ratos machos tratados durante 15 dias.....	52
--	----

LISTA DE TABELAS

- QUADRO 1:** Determinação de fósforo (mg/g) nos órgãos dos animais tratados por via oral durante 15 dias.....30
- QUADRO 2:** Determinação de ferro ($\mu\text{g/g}$) nos órgãos dos animais tratados por via oral durante 15 dias.....31
- QUADRO 3:** Determinação sérica dos parâmetros bioquímicos em ratos fêmeas tratados por via oral com o composto durante 15 dias.....32
- QUADRO 4:** Determinação dos parâmetros hematológicos em ratos fêmeas tratados com composto durante o período de 15 dias.....36
- QUADRO 5:** Determinação de fósforo (mg/g) nos órgãos dos animais alimentados com ração por 30 dias.....40
- QUADRO 6:** Determinação de ferro ($\mu\text{g/g}$) nos órgãos dos animais alimentados com ração por 30 dias.....41
- QUADRO 7:** Determinação sérica dos parâmetros bioquímicos de ratos fêmeas tratados com ração durante 30 dias.....43
- QUADRO 8:** Determinação dos parâmetros hematológicos em ratos fêmeas tratados com ração durante 30 dias.....48
- QUADRO 9:** Determinação de fósforo (mg/g) nos órgãos das ratos fêmeas tratados com ração durante 15 dias.....53
- QUADRO 10:** Determinação de fósforo (mg/g) nos órgãos dos ratos machos tratados com ração durante 15 dias.....54

QUADRO 11: Determinação de ferro ($\mu\text{g/g}$) nos órgãos das ratos fêmeas tratados com ração durante 15 dias.....	54
QUADRO 12: Determinação de ferro ($\mu\text{g/g}$) nos órgãos dos ratos machos tratados com ração durante 15 dias.....	55
QUADRO 13: Determinação sérica dos parâmetros bioquímicos de ratos fêmeas tratados com ração durante 15 dias.....	56
QUADRO 14: Determinação sérica dos parâmetros bioquímicos de ratos machos tratados com ração durante 15 dias.....	57
QUADRO 15: Determinação dos parâmetros hematológicos em ratos fêmeas tratados com ração durante 15 dias.....	61
QUADRO 16: Determinação dos parâmetros hematológicos em ratos machos tratados com ração durante 15 dias.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média

HCM – hemoglobina corpuscular média

HB – hemoglobina

HTO – hematócrito

IRC – insuficiência renal crônica

RBC – hemácias

QTS-S – quitosana solúvel

QTS-I – quitosana insolúvel ou reticulada

Fe₂SO₄ – sulfato de ferro (III)

PTH – hormônio paratireoideano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3 EMBASAMENTO TEÓRICO.....	4
3.1 Metabolismo do fósforo.....	4
3.2 Hiperfosfatemia	7
3.3 Tratamento da hiperfosfatemia	9
3.2.1 Controle Alimentar.....	10
3.2.2 Remoção de fósforo pela diálise	11
3.2.3 Sais de cálcio	11
3.2.4 Carbonato de cálcio.....	11
3.2.5 Acetato de cálcio	12
3.2.6 Quelantes que contém alumínio.....	12
3.2.7 Sevelamer	13
3.3 Complexo Quitosana-Ferro (III).....	13
4 METODOLOGIA	16
4.1 Materiais.....	16
4.1.1 Materiais de Bancada.....	16
4.1.2 Reagentes	16
4.1.3 Equipamentos.....	16
4.2 Métodos.....	17
4.2.1 Preparo do Polímero	17
4.2.2 Animais.....	17
4.2.3 Tratamento com a droga diabetogênica (Aloxano).....	18
4.2.4 Efeito do Complexo Quitosana-Ferro (III) Via Oral em Animais Hiperfosfatêmicos.....	18
4.2.4.1 <u>Tratamento com QTS-Solúvel e Insolúvel por Gavagem oral durante 15 dias.....</u>	18
4.2.4.2 <u>Tratamento com QTS-Solúvel e Insolúvel através de</u>	

<i>Ração preparada com os polímeros durante 30 dias</i>	20
4.2.4.3 <i>Tratamento com QTS-Solúvel e Insolúvel através de Ração preparada com os polímeros durante 15 dias</i>	21
4.2.4.4 <i>Tratamento com QTS-Solúvel e Insolúvel através de Ração preparada com os polímeros durante 15 dias</i>	21
4.2.5 Ensaio Bioquímico	22
4.2.6 Parâmetros hematológicos	23
4.2.7 Preparo da solução de órgãos.....	24
4.2.8 Análise de fósforo nos órgãos	24
4.2.9 Análise de ferro nos órgãos.....	25
4.2.10 Análise estatística.....	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1 Síntese do complexo Quitosana-Fe(III)	27
5.2 Tratamento com QTS-Solúvel e Insolúvel através de Gavagem oral durante 15 dias	27
5.3 Tratamento com QTS-Solúvel e Insolúvel com Ração em ratas durante 30 dias	38
5.4 Tratamento com QTS-Solúvel e Insolúvel com Ração em ratos machos e fêmeas durante 15 dias	49
6 CONCLUSÕES	65
7 BIBLIOGRAFIA	66
8 ANEXOS	75

1 INTRODUÇÃO

A doença renal crônica consiste em lesão renal e perda progressiva e irreversível das funções glomerular, tubular e endócrina dos rins. Em fase mais avançada, fase terminal de insuficiência renal crônica (IRC), os rins não conseguem mais manter a normalidade do meio interno do paciente (ROMÃO, 2004). Doenças como o *Diabetes mellitus* e a hipertensão são responsáveis por 70% dos casos de doença renal em estágio final requerendo terapias como diálise ou transplante (BURROWS-HUDSON, 2005).

Somente no Brasil, aproximadamente 47.000 pacientes foram constatados até o ano 2000, que fazem o uso de terapia dialítica para substituir a função renal (SESSO, 2000). No ano de 2004, os números alcançaram a margem de 59.153 pacientes em programa dialítico crônico (ROMÃO, 2004).

A manutenção do fósforo sérico é um problema relevante em pacientes que fazem diálise (SELLARES; RAMIREZ, 2004). A hiperfosfatemia é um importante fator de risco para o desenvolvimento de calcificação ectópica (calcificação metastática de tecidos moles, inclusive pulmões, rins e articulações) e cardiovascular em pacientes que fazem hemodiálise (TAKAHASHI et al., 2004). O controle inadequado da concentração sérica de fósforo está associado também com outras complicações graves tais como: aumento do risco de mortalidade; doença cardiovascular e morte cardíaca; hiperplasia da glândula paratireóide e doença óssea renal (MOE, 2002).

O tratamento convencional de pacientes hiperfosfatêmicos envolve alimentação controlada, hemodiálise e uso de adsorventes orais para o controle da absorção intestinal (HERGESELL; RITZ, 1999; BAXTER *et al.*, 2000). Os agentes que se ligam ao fósforo são eficazes em diminuir a absorção do fósforo intestinal, no entanto, podem possuir efeitos secundários como a hipercalcemia (carbonato de cálcio, acetato de cálcio), a toxicidade (alumínio), calcificação extra-óssea e doença cardíaca (KURODA *et al.*, 1995; HERGESELL; RITZ, 1999).

Bürger e colaboradores (2001) mostraram que a quitosana complexada com ferro (III) e reticulada com glutaraldeído (QTS-Fe(III)R), apresentam resultados eficientes na redução de fósforo no soro de ratos hiperfosfatêmicos. Em estudos anteriores com o complexo solúvel quitosana ferro (III), sobre a

toxicidade aguda (1 dia) e subcrônica de doses repetidas (15 dias), não foram observados efeitos tóxicos em animais saudáveis. Porém, no tratamento subcrônico (30 dias) observou-se alterações nos parâmetros bioquímicos e deposição de ferro em alguns órgãos (BÜRGER *et al.*, 2001).

No presente estudo, damos continuidade a estudos anteriores desenvolvidos no NIQFAR (BÜRGER *et al.*, 2001), avaliando o efeito da quitosana complexada com ferro (III) solúvel e insolúvel quando administradas em animais com lesão renal e associada a hiperfosfatemia, sob os níveis séricos de fosfato e cálcio. A eficiência do complexo quitosana ferro (III) solúvel foi determinada através dos níveis séricos de ferro. Mesmo que em estudos previamente realizados mostrando que o ferro presente no complexo QTS-Fe(III) não é liberado no meio intestinal, torna-se importante avaliar esse parâmetro no quadro clínico de lesão renal, pois o metal pode ter efeitos tóxicos quando em excesso, e o aumento dos estoques corporais de ferro tem sido relacionado como fator de infarto no miocárdio (CLAEYS *et al.*, 2002). Esta teoria foi baseada em estudos que mostraram que a presença de ferro em excesso favorece o avanço de lesões nas artérias (aterosclerose) (PONRAJ *et al.*, 1999).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os possíveis efeitos da quitosana ferro (III) solúvel e insolúvel sobre o metabolismo do fósforo em animais com hiperfosfatemia.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da administração do composto Quitosana-Ferro (III) solúvel e insolúvel em animais hiperfosfatêmicos;
- Determinar os parâmetros bioquímicos que possam ser alterados pela administração do complexo nesses animais;
- Investigar as possíveis alterações nos parâmetros hematológicos que o composto pode causar nos animais em estudo;
- Verificar a possível ocorrência de perda de peso dos animais durante o tratamento com o polímero;
- Quantificar os níveis de ferro total e fósforo no fígado, pulmão, baço e rim;

3 EMBASAMENTO TEÓRICO

3.1 Metabolismo do Fósforo

O fósforo é um dos minerais presentes em maior proporção no organismo, onde o mesmo se encontra na sua maioria como fósforo inorgânico; no plasma e a maioria das células como fosfato orgânico (ALONSO; GARCÍA; CANNATA, 2002; BELLASI, KOOIENGA; BLOCK, 2006). Juntamente com o cálcio são responsáveis pela mineralização da matriz óssea (MCDOWELL, 1992). Representa cerca de 1% do peso corporal total, distribuindo-se nos ossos (85%), nos tecidos moles (14%) e no fluido extracelular (1%) (RIELLA, 2003).

Em indivíduos normais, a concentração sérica de fósforo é mantida numa faixa estreita apesar do consumo variável de fósforo na dieta (DELMEZ; SLATOPOLKY, 1992). A concentração plasmática de fósforo nestes indivíduos varia entre 2,5 e 4,5 mg/dL (0,80 – 1,45 mmol/L); tais valores representam o balanço da dieta diária, absorção intestinal e excreção urinária de fósforo. (BELLASI, KOOIENGA; BLOCK, 2006). O conteúdo médio diário de fósforo numa dieta ocidental é entre 1 a 1,8 g (18 – 36 mmol/L (DELMEZ; SLATOPOLKY, 1992; BELLASI, KOOIENGA; BLOCK, 2006). A ingestão recomendada de fósforo para adultos saudáveis, segundo o *National Research Council – Recommended Dietary Allowances* (RDA, 1989) – é de 800 mg/dia. Segundo Riella e colaboradores (2003), a ingestão diária varia de 800 a 1850 mg/dia; deste total, 65% são absorvidos principalmente a nível de duodeno e jejuno. No entanto, a dieta diária dos Americanos varia conforme o sexo e a idade. Mais de 50% dos jovens e pessoas de meia idade do sexo masculino consomem aproximadamente 1,6 g/dia de fósforo, enquanto mulheres da mesma faixa etária consomem 1,0 g/dia (CALVO; PARK, 1996).

Os níveis séricos normais de fósforo e cálcio são mantidos por um mecanismo homeostático muito preciso. Os rins regulam os níveis destes eletrólitos por meio de variações da taxa de filtração glomerular, e o trato

intestinal controla a absorção a partir de ingestão alimentar (MALLUCHE, MONIER-FAUGERE; 1999).

A maioria do fósforo é ultrafiltrável, porém 85% é reabsorvido pelo túbulo proximal vinculado ao transporte de sódio/potássio (Na/K) e cotransporte sódio/fósforo (Na/P). O hormônio paratireoideano (PTH) é o principal regulador da eliminação final do fósforo, inibindo a reabsorção tubular. A Vitamina D tem um efeito similar, porém menos pronunciado (ALONSO; GARCÍA; CANNATA, 2002). A figura 1 mostra o mecanismo de absorção e eliminação do fósforo no organismo humano.

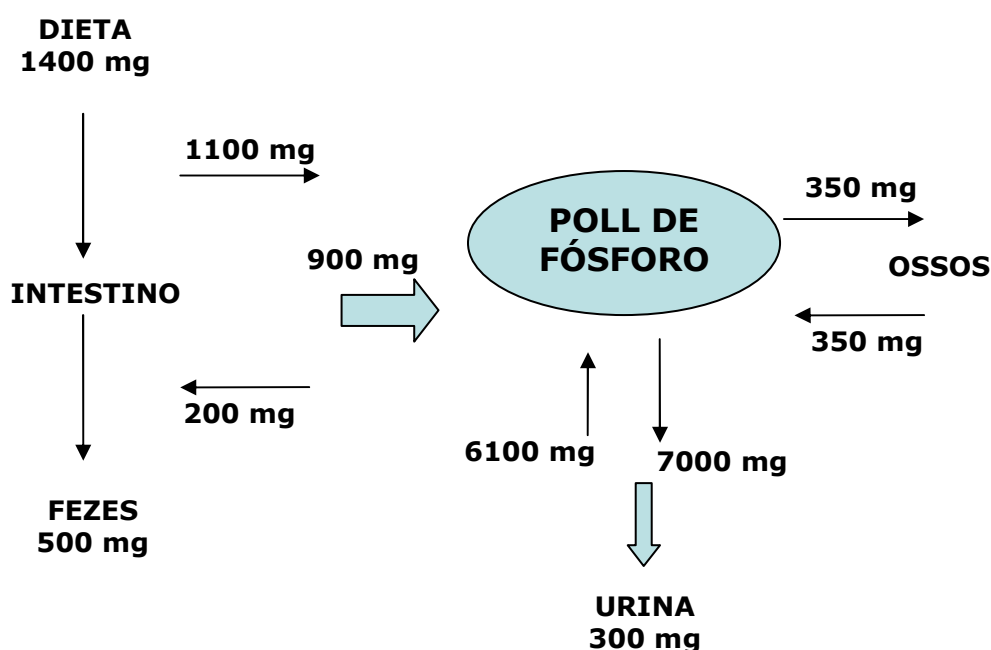


Figura 1: Absorção e eliminação de fósforo. Numa dieta de 1400 mg de fósforo este vai para o intestino, e cerca de 1100 mg vai para o pool de fósforo para ser distribuído. Desses 1100 mg, 200 mg são eliminados junto com aproximadamente 300 mg que vieram diretamente da dieta, num total de 500 mg de fósforo sendo eliminados pelas fezes. Cerca de 900 mg chegam ao “pool” de fósforo, 350 mg vão para os ossos e a mesma quantidade é devolvida ao “pool”, de onde saem aproximadamente 7000 mg para serem eliminados pela urina, e destes 7000 mg, 6100 são reabsorvidos através dos túbulos renais, sendo realmente eliminados cerca de 900 mg pela urina (CUPPARI, 1998).

Por esses mecanismos de regulação, a fosfatemia e a calcemia tendem a mover-se em sentido oposto, mantendo um produto constante, exceto quando existe um déficit no sistema da Vitamina D ou destruição óssea

massiva, nos quais podem observar-se hipocalcemia com hipofosfatemia e hipercalcemia com hiperfosfatemia, respectivamente (figura 2).

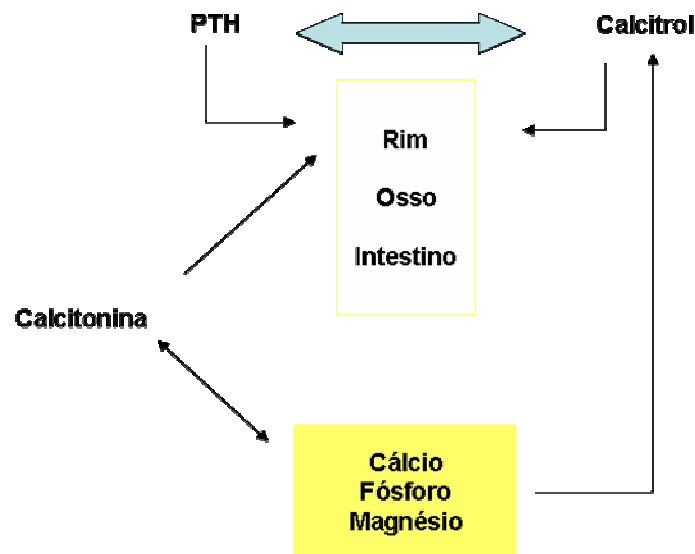


Figura 2: Metabolismo do fósforo, cálcio e magnésio. Níveis elevados de fósforo no sangue estimulam a secreção de PTH que promove sua eliminação via renal, e inibe a 1-alfa-hidrolase renal, diminuindo a síntese de calcitrol e conseqüentemente, sua absorção intestinal e reabsorção renal (ALONSO; GARCÍA; CANNATA, 2002).

O cálcio sérico afeta diretamente a secreção do Hormônio Paratireoideano (PTH) pela paratireóide. Um nível baixo de cálcio eleva o PTH, inibindo a excreção de cálcio dos rins e acelerando a retirada deste dos ossos, elevando assim os níveis de cálcio sérico. O PTH elevado estimula os rins a aumentar a produção de Vitamina D, e isso então regula o cálcio baixo. Dessa maneira, o PTH controla a disponibilidade de cálcio no soro, por regulação da liberação e deposição nos ossos (CHERTOW; BURKE; LAZARUS et al, 1997).

O fósforo sérico tem um papel importante na manutenção do cálcio. Também tem ação direta sobre a glândula paratireóide na estimulação da produção de PTH, no entanto, ao contrário do cálcio, uma elevação dos níveis séricos de fosfato estimula a produção deste hormônio; desse modo, promovendo uma elevação conseqüente de cálcio sérico (CHERTOW; BURKE; LAZARUS et al, 1997).

Quando a função renal está normal, mantém-se o equilíbrio homeostático de fósforo e cálcio séricos, controlando a excreção pelos rins, a

absorção pelo intestino e o armazenamento nos ossos. Porém, na IRC, a ausência de função renal tem como resultado a hiperfosfatemia na maioria dos pacientes (RUFINO et al, 1998), e isso é acarretado por um desequilíbrio homeostático de fósforo e cálcio nestes pacientes, que, mesmo fazendo diálise não conseguem manter os níveis séricos destes (CHERTOW; BURKE; LAZARUS et al, 1997). Como consequência deste desequilíbrio, os pacientes renais crônicos apresentam um alto índice de mortalidade devido às doenças cardiovasculares.

3.2 Hiperfosfatemia

A hiperfosfatemia continua sendo um desafio para os nefrologistas clínicos (HERGESELL, RITZ, 1999). O aumento sérico de fósforo é resultado da incapacidade dos rins em excretar, de maneira eficiente, o fosfato do organismo. Sua principal causa são consequências do aumento da ingestão, da diminuição da excreção (Insuficiência Renal Crônica ou Aguda) ou de desvios intracelulares de fósforo (infecções) (RIELLA, 2003).

Os mecanismos exatos pelos quais a hiperfosfatemia contribui para o excesso de mortalidade dos pacientes são desconhecidos. Um dos fatores pode ser um nível sérico elevado do fósforo e de um produto cálcio x fósforo (Ca x P) elevado no surgimento da calcificação valvular e vascular extra-óssea, complicação que vem sendo correlacionada a um risco cardiovascular excessivo, a qual inclui infarto agudo do miocárdio e parada cardíaca (BELLASI, KOOIENGA; BLOCK, 2006).

A calcificação dos vasos ocorre devido a deposição de cálcio e fósforo mineral nos tecidos cardiovasculares, contribuindo para a morbidade e mortalidade das doenças cardiovasculares em pacientes com doença renal crônica (BLACHER et al, 2001; LONDON; MARTY; MARCHAIS et al, 2004; MOE et al, 2002). Esses pacientes têm calcificação mais freqüente, mais grave e mais rapidamente progressiva nas coronárias e nas válvulas cardíacas do que os pacientes de mesma idade que não fazem hemodiálise e têm doença cardíaca confirmada ou suspeita (BRAUN et al., 1996). Até os pacientes jovens que possuem doença renal crônica correm riscos de calcificação coronários e vasculares (GOODMAN et al., 2000).

A doença cardiovascular é a causa da morte de 50 % de todos os pacientes em diálise (ROSTAND *et al.*, 1988; BLOCK *et al.*, 1998). Em Doenças Renais Crônicas, a hiperfosfatemia é um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento secundário de hipertireoidismo e osteodistrofia renal; onde a diminuição da filtração glomerular provoca um aumento compensatório dos níveis do hormônio paratireoideano, diminuindo assim a reabsorção de fósforo pelo túbulo proximal e mantendo os níveis séricos na normalidade (BELLASI, KOOIENGA; BLOCK, 2006).

Segundo Riella (2003) as manifestações clínicas da hiperfosfatemia se dão em função de sua consequência sobre os níveis de cálcio sérico, PTH, calcitrol e na ação inibitória sobre a atividade da enzima 1- α -hidroxilase. A hiperfosfatemia grave leva o paciente a um quadro de hipocalcemia, devido aos depósitos de cálcio e fósforo nos tecidos moles (pulmão, córnea, rins, pele e mucosas), além do efeito inibitório sobre o calcitrol.

O controle dos níveis séricos de fósforo é complicado pela associação intrincada entre o fósforo e inúmeros outros fatores, entre os quais o cálcio, o hormônio paratireoide (PTH), a vitamina D e seus metabólitos, e a alimentação. Nos pacientes com função renal normal, estes fatores coexistem num equilíbrio delicado, de modo a manter a homeostase (BLOCK; PORT, 2000; GUÉRIN *et al.*, 2000), e, mesmo com um aumento da ingestão de fósforo, este equilíbrio é mantido (RIELLA, 2003). No paciente em diálise, este equilíbrio pode estar comprometido, sendo necessário planejar cuidadosamente intervenções para controlar este aspecto do problema, sem comprometer ainda mais a homeostase do fósforo (BLOCK; PORT, 2000; GUÉRIN *et al.*, 2000).

Até o momento, as abordagens para o controle do fósforo exigem a aderência do paciente e tiveram um sucesso apenas limitado no que se refere a proporcionar o controle dos níveis séricos de fósforo. Entre elas pode-se citar: restrição do fósforo na alimentação, diálise e terapia com quelantes de fósforo (DELMEZ; SLATOPOLSKY, 1992). No entanto, as tentativas de tratar a hiperfosfatemia através da alimentação e da diálise não oferecem um controle adequado do fósforo e a maioria dos pacientes precisa de agentes para promover a sua quelação (BAXTER *et al.*, 2000).

A diálise por si só é incapaz de remover a quantidade total de fósforo

ingerido numa alimentação adequada devido ao baixo efluxo de fósforo que vai do espaço intracelular para o espaço extracelular. A restrição de fósforo alimentar diminui a ingestão das proteínas vitais e não é coerente com uma nutrição adequada. Os agentes que se ligam com o fósforo são eficazes no sentido de diminuir sua absorção intestinal, mas estão associados com problemas tais como toxicidade do alumínio, hipercalcemia, calcificação extra-óssea e doença cardíaca. Em consequência disso, há necessidade de novas modalidades de tratamento capazes de controlar eficazmente os níveis de fósforo sem as complicações em potencial das terapias mais antigas (BLOCK; PORT, 2000; GUÉRIN *et al.*, 2000).

3.3 Tratamento da Hiperfosfatemia

Os princípios do tratamento da hiperfosfatemia são aqueles que procuram atingir a causa subjacente do distúrbio, diminuindo a absorção e promovendo a maior excreção renal deste íon (RIELLA, 2003). Segundo Chertow; Burke; Lazarus e colaboradores (1997), o controle dos níveis de fósforo sérico é uma consideração importantíssima no tratamento de pacientes com insuficiência renal crônica, pois o excesso de fósforo sérico é a força propulsora que existe por trás da calcificação metastática e da estimulação crônica do PTH.

Segundo a Sociedade Brasileira de Nefrologia (PORTARIA Nº 845 de 06 de novembro de 2002), pacientes com doença renal crônica em estágio avançado são colocados em dietas com restrição de fósforo, nas quais a ingesta diária oscila entre 540 mg a 1000 mg. Entretanto, dietas com restrição de fósforo, além de serem de difícil execução, na grande maioria dos casos não é suficiente para manter a fosfatemia em níveis desejáveis, ou seja, abaixo de 5,5 mg/dL. Portanto, mais de 95 % dos pacientes com IRC em fase avançada necessitam fazer uso de quelantes de fósforo junto com a dieta. O objetivo do tratamento é reduzir os níveis de fósforo para valores situados entre 4,5 e 5,5 mg/dL para pacientes em programas de diálise crônica, e entre 3,5 a 4,5 mg/dL em pacientes que não estão em tratamento dialítico.

Restrição alimentar, diálise e o uso de quelantes de fósforo são as modalidades básicas do controle do fósforo sérico em pacientes com insuficiência renal crônica; porém, juntas, alimentação e a diálise não são suficientes para baixar o fósforo até os níveis saudáveis (PERFIL DO PRODUTO E EXPERIÊNCIA CLÍNICA – RENAGEL).

Os medicamentos que contêm cálcio são atualmente os de primeira escolha e estão representados pelo carbonato de cálcio e pelo acetato de cálcio. Ambos quelam o fósforo na luz intestinal, diminuindo sua absorção no tubo digestivo. O principal problema associado a esses medicamentos à base de cálcio é que eles freqüentemente resultam em episódios transitórios de hipercalcemia, exigindo que se reduza a dose de análogos da vitamina D e que se ajuste a concentração de cálcio na solução de diálise. O hidróxido de alumínio pode causar efeitos tóxicos em neurônios, músculos esqueléticos e nas hemácias de pacientes em diálise e, portanto, é raramente usado atualmente, exceto por curtos períodos de tempo.

3.2.1 Controle alimentar

O fósforo encontra-se em quase todos os alimentos, como leite e derivados, carnes, peixes, cereais dentre outros (ALBAAJ; HUTCHISON, 2003). Nos Estados Unidos mais de 50% dos jovens e homens de meia-idade, consomem mais de 1600mg/dia de fósforo, enquanto as mulheres consomem aproximadamente 1000mg/dia. Estas estimativas da ingestão de fosfato refletem o conteúdo de fósforo nos alimentos (URIBARRI; CALVO, 2003). Conseqüentemente, é muito difícil conseguir uma diminuição de fósforo da dieta, sem uma redução da ingestão de proteínas, o que é um risco de má nutrição para os pacientes com insuficiência renal (MOE, 2002). As diretrizes alimentares para os pacientes submetidos à diálise de manutenção incluem a ingestão diária de 1,2 gramas de proteína por quilograma de peso corporal (ALBAAJ; HUTCHISON, 2003).

3.2.2 Remoção de fósforo pela diálise

A diálise tem um papel importante na remoção do excesso de fósforo do sangue do paciente, eliminando entre 2.700 e 3.000 mg de fósforo por semana. No entanto, uma quantidade significativa de fósforo total do organismo é encontrada no compartimento intracelular. Portanto, a quantidade de fósforo que pode ser removida durante a diálise é limitada, colocando o paciente típico de diálise em um balanço de fósforo positivo (MOE, 2002).

3.2.3 Sais de Cálcio

Os medicamentos que contêm cálcio são atualmente os de primeira escolha e estão representados pelo carbonato de cálcio e pelo acetato de cálcio. São os principais compostos usados no tratamento da hiperfosfatemia provocada pela falência renal crônica. Ambos quelam o fósforo na luz intestinal, diminuindo sua absorção no tubo digestivo. O principal problema associado a esses medicamentos à base de cálcio é que eles freqüentemente resultam em episódios transitórios de hipercalcemia, exigindo que se reduza a dose de análogos da vitamina D (calcitrol) e que se ajuste a concentração de cálcio na solução de diálise. A quantidade de cálcio necessária para ser eficaz equivale a três vezes a necessidade diária de cálcio, provocando, portanto a hipercalcemia (WEAVER *et al.*, 1999; RIELLA, 2003).

3.2.4 Carbonato de Cálcio

O carbonato de cálcio oral é utilizado há muito tempo no controle da hiperfosfatemia em pacientes com falência renal avançada e em hemodiálise crônica (KLUTHE *et al.*, 1988). Para que esse efeito ocorra, altas doses deste composto são necessárias, cerca de 8,5 g (variando entre 2,5 a 20 g por dia). O carbonato de cálcio liga-se ao fosfato tanto exógeno como endógeno (secretado pelo pâncreas e parótida) na luz intestinal e inibe de maneira eficaz a absorção do fósforo (RIELLA, 2003). O uso do carbonato de cálcio deve ser acompanhado de monitoramento da concentração de fosfato e cálcio no

plasma, ou seja, as doses são aumentadas gradualmente até o fósforo plasmático atingir 4,5 a 5,5 mg/dL (RIELLA, 2003), pois um fator limitante no uso de carbonato de cálcio é a hipercalcemia, que pode levar a uma calcificação de tecido. Além disso, apenas o carbonato de cálcio (CaCO_3), mesmo em altas doses, não é suficiente para controlar a hiperfosfatemia, onde se sugere a sua associação com hidróxido de magnésio ou carbonato de magnésio (KLUTHE et al., 1988).

3.2.5 Acetato de cálcio

Vários estudos mostraram que o acetato de cálcio tem muitas características para ser complexador de fosfato. Por ser um sal mais solúvel, é facilmente dissolvido pelo pH ácido e também se liga mais rapidamente ao fosfato (JANSSEN *et al.*, 1996).

O acetato do cálcio é solúvel no pH neutro e capaz de ligar o fosfato através de uma larga escala do pH. Portanto, a secreção de ácido gástrico não deve interferir na capacidade de ligar-se ao fosfato. Acetato de cálcio pode causar efeitos adversos gastrintestinais significantes, podendo ser piores que o carbonato de cálcio (ALFREY; DE GOES; NOLAN, 1994). Em um estudo com 91 pacientes dialíticos, o acetato de cálcio foi efetivo para controlar a hiperfosfatemia e resultou num declínio no produto cálcio x fosfato de 66,1 para 50,6 mg/dL depois de 12 semanas de tratamento (BLEYER, 2003).

3.2.6 Quelantes que contém alumínio

Complexadores de fosfato contendo Al(OH)_3 têm sido usados com sucesso no controle da hiperfosfatemia na falência renal crônica. O hidróxido de alumínio na dose de 500 a 1800 mg 3 a 4 vezes ao dia é indicado para pacientes com hiperfosfatemia visando à redução mais rápida dos níveis séricos de fósforo (RIELLA, 2003). Entretanto, o uso em longo prazo em pacientes em hemodiálise pode ser complicado pelos efeitos tóxicos do acúmulo do alumínio (KURODA *et al.*, 1995). Este acúmulo será associado a encefalopatia, osteomalácia resistente a vitamina D, anemia e miopatia,

devendo-se fazer substituição pelo carbonato de cálcio (DRÜKE *et al.*, 1986; RIELLA, 2003).

3.2.7 Sevelamer

Um novo agente não contendo cálcio, alumínio e magnésio, assim evitando os problemas das medicações contendo íons, está sendo usado com bons resultados. O Sevelamer (Renagel®) é um polímero catiônico (polialilamina-hidroclorada) livre de alumínio e cálcio e que se liga ao fosfato (BURKE; SLATOPOLSKY; GOLDBERG, 1997). Não é absorvido e tem a capacidade de diminuir a absorção do fósforo alimentar em pacientes em hemodiálise. Estudos demonstram que o Renagel® diminui o fósforo sérico em pacientes em hemodiálise e que essa diminuição foi maior comparável com a obtida com acetato de cálcio. Observou-se também que o uso deste quelante de fósforo, baixa os níveis de colesterol total e da fração LDL (colesterol lipoprotéico de baixa densidade) (PERFIL DO PRODUTO E EXPERIÊNCIA CLÍNICA – RENAGEL). Porém, o uso deste medicamento fica reservado, geralmente, para pacientes com hipercalcemia, devido aos seus custos (RIELLA, 2003).

3.3 Complexo Quitosana-ferro (III)

Uma das opções encontradas para solucionar o problema da hipercalcemia é o uso do ferro. É conhecido que a administração oral e intravenosa de ferro causa hipofosfatemia. Esse efeito colateral pode ser benéfico no tratamento da hiperfosfatemia em pacientes em hemodiálise (KURODA *et al.*, 1995). A hipótese em utilizar os benefícios dos efeitos colaterais do ferro foi testada por Kuroda e colaboradores (1995), para o tratamento de pacientes com hiperfosfatemia provocada por hemodiálise. Neste experimento 15 pacientes foram tratados, via oral, com 150 mg de citrato de ferro e sódio durante oito semanas. O fósforo no soro diminuiu significativamente durante o experimento. A administração do ferro é preferencialmente oral, pois a intravenosa pode causar hemossiderose, com

conseqüente formação de lesões em órgãos vitais, e além disso, o principal objetivo do tratamento é quelar o fósforo proveniente da alimentação.

A quitosana uma vez complexada com a forma ferrosa (Fe^{++}) tem capacidade de adsorver fosfato *in vitro* apresentando vantagem quando comparada com sulfato básico de ferro (JING; YAMAGUCHI, 1992). A quitosana é um polissacarídeo natural não tóxico produzido industrialmente pela desacetilação da quitina da casca de crustáceos. Devido a sua boa adaptação fisiológica é usada como aditivo alimentício, medicamentos, etc. Por ela não ser hidrolisada pelas enzimas digestivas no homem, e a sua estrutura química ser similar a da celulose, ela pode ser usada como um novo tipo de fibra dietética. Entretanto, por conter um par de elétrons livres no nitrogênio tem capacidade de formar complexos com polímeros e metais (JING et al., 1997).

Rodrigues e colaboradores (1999) mostraram que a quitosana complexada com o ferro (III) reticulada (QTS-Fe (III)-R), apresenta uma série de vantagens quando comparada com a QTS-Fe (II), principalmente por apresentar maior capacidade de adsorção de fósforo. Estes estudos foram conduzidos em soluções aquosas diluídas deste íon. Baxter e colaboradores (2000), estudaram o efeito do complexo de quitosana-ferro(III), adicionado à ração, na redução do fósforo sérico de ratos normais. A ingestão de ração contendo 1% do complexo reduz a concentração de fosfato no soro para 4,4 mg/dL quando comparado com o controle de 5,7 mg/dL no tratamento de 15 dias. No tratamento de 30 dias a redução foi de 4,1 mg/dL com um controle de 5,5 mg/dL. Foi também observado que os níveis de ferro têm um aumento significativo nos grupos tratados em comparação com o grupo controle.

A quitosana complexada com o Ferro (III) e reticulada com glutaraldeído QTS-Fe(III)R mostrou-se eficiente na redução do fosfato no soro de ratos hiperfosfatêmicos (VALCARENGHI; SANDRI, 1999; BÜRGER et al., 2001).

O ferro é um elemento essencial para todos os organismos vivos. Ele está envolvido numa grande quantidade de funções fisiológicas no corpo, entre os quais transporte de oxigênio e reações enzimáticas (LEE et al., 1999). Entretanto, a associação entre a quantidade de ferro no corpo e os riscos de doenças cardiovasculares foi postulado pela primeira vez por Sullivan (1981). Esta teoria relaciona a oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL) com

a presença catabólica de ferro na formação de radicais livres. Um aumento dos estoques corporais de ferro tem sido mostrado como fator de risco de infarto no miocárdio (CLAEYS *et al.*, 2002). A teoria foi baseada em estudos experimentais mostrando que a presença de ferro favorece o avanço de lesões nas artérias (arteriosclerose). Usando camundongos como modelo, foi mostrado que dieta contendo baixa quantidade de ferro reduz a formação de lesões (PONRAJ *et al.*, 1999).

No presente estudo, objetivou-se avaliar o efeito do complexo quitosana-ferro(III) solúvel quando administrada em animais com lesão renal, além de verificar se o ferro em excesso pode causar efeitos adversos, visto que estudos prévios mostraram que o aumento nos estoques corporais de ferro está relacionado ao avanço de lesões nas artérias (aterosclerose) (PONRAJ *et al.*, 1999) e é fator importante para desencadear o infarto no miocárdio (CLAEYS *et al.*, 2002).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes

Os reagentes utilizados durante os experimentos foram: anticoagulante EDTA para a coleta do hemograma; Heparina (Liquemine ®); Salina 0,9 % (Laborasa Indústria Farmacêutica); Complexo quitosana-ferro (III) reticulada ou insolúvel; Complexo quitosana-ferro (III) solúvel; Sulfato de ferro (III) $[\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3]$ (Vetec ®); Aloxano (Sigma ®); Fosfato de potássio (KH_2PO_4) (Nuclear ®); Kit de Glicose Diasys ®; Kit de Creatinina Wiener ®; Kit de Fósforo Wiener ®; Kit de Fósforo Labtest Diagnóstica ®; Kit de Magnésio Wiener ®; Kit de Ferro Biosystems ®; Kit de Ferro Labtest Diagnóstica ®; Quitosana Purifarma ®.

4.1.2 Equipamentos

Os equipamentos utilizados para as análises das amostras de sangue são apresentados a seguir.

Os parâmetros hematológicos foram analisados pela automação CELLDYN 3000 (ABBOTT ®).

Para todas as dosagens bioquímicas, exceto sódio, potássio, cálcio e ferro foi utilizado automação COBAS MIRA (ROCHE ®).

Os eletrólitos sódio, potássio e cálcio foram determinadas pelo método de íon-seletivo em automação ISELAB (DRAKE ®).

A dosagem de ferro sérico foi realizada em aparelho semi-automatizado QUICK LAB ®.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo do Polímero

O polímero Quitosana ferro (III) solúvel (QTS-S) foi preparado de acordo com o método descrito na literatura por Fagundes et al., (2001) e Bürger et al., (2001), proveniente de quitosana comercial (Quitosana Purifarma ®). A quitosana comercial foi dissolvida em uma solução aquosa de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 0,1 M por 4 horas, resultando um precipitado de cor laranja depois da adição de acetona. O sólido foi filtrado e lavado com acetona para remover o excesso de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ e finalmente secado à vácuo. Após o preparo, foi determinada a quantidade de ferro espectrofotometricamente utilizando a 1,10-fenantrolina como agente cromóforo (FAGUNDES et al., 2001).

A Quitosana ferro (III) insolúvel (QTS-I) foi preparada a partir da QTS-S, segundo metodologia descrita por Fagundes e colaboradores (2001).

4.2.2 Animais

Foram utilizados ratos da raça *Wistar*, cepa UNIVALI, machos e fêmeas, pesando aproximadamente 200 gramas. Estes foram criados no Biotério Central da Universidade do Vale do Itajaí, em ambiente com temperatura controlada (19-25 °C), com ciclo claro/escuro de 12 horas. Posteriormente os animais foram transferidos para o biotério do laboratório de Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde (CCS) no bloco 27, antes do início do tratamento. Água e ração foram fornecidas *ad libitum*.

Os animais foram tratados de acordo com as diretrizes para a utilização de animais em pesquisas científicas e atividades didáticas, que visa manejar com respeito e de forma adequada a espécie, tendo as necessidades de transporte, alojamento, condições ambientais, nutrição e cuidados veterinários sido atendidos (MENEZES, 2002). O tratamento foi aprovado pelo comitê de ética da UNIVALI, processo número 475/2004.

4.2.3 Tratamento com a droga diabetogênica (Aloxano)

Os animais usados nos experimentos foram pesados e mantidos em caixas (5 em cada caixa) com privação de água e ração *overnight*. Após 12 horas, foi injetada intraperitonealmente uma solução de aloxano monohidratado na concentração de 120 mg/kg (SZKUDELSKI, 2001). Os animais controle receberam o mesmo volume de salina (NaCl 0,9 %). Após a injeção, os animais foram alimentados com ração comercial e água em livre acesso durante 15 dias.

4.2.4 Efeito do Complexo Quitosana-Ferro (III) Via Oral em Animais Hiperfosfatêmicos

Para avaliar os efeitos da administração do composto Quitosana-Ferro (III) solúvel e insolúvel nos animais hiperfosfatêmicos foram realizados quatro experimentos que serão apresentados a seguir:

4.2.4.1 Tratamento com QTS-S e QTS-I por Gavagem oral durante 15 dias

Para este experimento foram utilizados ratas e foram seguidos os mesmos procedimentos iniciais descritos no item 4.2.3. para elevação do fósforo sérico.

Após 15 dias, os animais receberam água contendo 1,2 % de fosfato como tratamento auxiliar para o aumento sérico de fosfato (SCHWARZ *et al.*, 1985; BÜRGER *et al.*, 2001), quando então iniciou-se o tratamento com os polímeros.

O complexo foi administrado através da via oral, utilizando uma seringa acoplada a uma agulha de gavagem, o que possibilitou atingir diretamente o estômago dos animais, sem maiores danos a mucosa do trato gastrointestinal. Estes foram divididos em seis grupos, conforme esquema a seguir:

- GRUPO I: Grupo Controle, recebendo apenas salina a 0,9 % (único grupo sem indução de lesão renal).
- GRUPO II: Grupo Aloxano, que também recebeu apenas salina.
- GRUPO III: Grupo QTS-S 100 (13 mg/kg de ferro), que recebeu o polímero solúvel a 100 mg/kg.
- GRUPO IV: Grupo QTS-S 50 (6,6 mg/kg de ferro), também recebeu o polímero solúvel a 50 mg/kg.
- GRUPO V: Grupo QTS-I 100 (13 mg/kg de ferro), tratados com o complexo quitosana insolúvel ou reticulada a 100 mg/kg.
- GRUPO VI: Grupo $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (13 mg/kg de ferro), tratados com sulfato ferroso, composto utilizado como um controle de ferro.

Todos os grupos, exceto os grupos controle e aloxano (grupos I e II), receberam água contendo fosfato a 1,2 % durante todo o tratamento.

Durante o período de tratamento, foram realizadas três pesagens dos animais para avaliação do peso corporal e comparação entre os grupos.

Água e ração foram pesados diariamente.

Após quinze dias de tratamento, os animais foram anestesiados com éter em cuba de vidro e o sangue foi coletado através de punção intracardíaca.

Posteriormente foram realizadas as análises bioquímicas de: glicose, sódio, potássio, fosfato e ferro. Avaliações hematológicas como contagem total e diferencial de leucócitos e eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, índices hematimétricos e plaquetas foram realizados nos mesmos tempos que a determinações bioquímicas.

Após a coleta de sangue os animais foram sacrificados por asfixia com éter para posterior retirada de alguns órgãos vitais como: baço, rim (esquerdo), pulmão (esquerdo) e fígado. Estes foram lavados em solução salina a 0,9 % e secos em papel absorvente e logo após foram pesados. O peso relativo de todos os grupos foram obtidos por cálculo obtido através do peso final dos animais.

4.2.4.2 Tratamento com QTS-S e QTS-I através de Ração preparada com os polímeros durante 30 dias

Este experimento foi realizado com seis grupos de ratas que foram submetidos a injeção de aloxano (conforme ítem 4.2.3). Esperou-se 15 dias, quando teve início o tratamento com ração contendo o polímero 0,5 %, (sendo 0,054 % de ferro), e fosfato a 1,2 % (BAXTER et al., 2000). Os animais também receberam água contendo fosfato na mesma concentração (1,2%). Os ratos foram tratados conforme descreve-se a seguir:

- GRUPO I: Controle, recebeu ração e água normais (grupo sem lesão renal);
- GRUPO II: ração contendo QTS-I 0,054% de ferro e fosfato (KH_2PO_4) a 1,2%;
- GRUPO III: Ração com Sulfato ferroso e fosfato nas mesmas concentrações do polímero (0,5%);
- GRUPO IV: Grupo recebeu apenas ração contendo fosfato (1,2%);
- GRUPO V: Ração contendo QTS-S 0,054% de ferro e fosfato a 1,2%;
- GRUPO VI: Grupo recebeu ração com fosfato (1,2%) e não foram submetidos a primeira etapa de lesão renal.

Todos os grupos, exceto grupos I e VI, receberam água contendo fosfato em paralelo com a ração. Água e ração foram pesados diariamente.

Após 30 dias de tratamento com a ração modificada, os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos no item 4.2.4.1 para coleta de sangue e retirada dos órgãos.

Durante o período de tratamento, foram realizadas cinco pesagens dos animais para avaliação do peso corporal e comparação entre os grupos.

4.2.4.3 Tratamento com QTS-S e QTS-I através de Ração preparada com os polímeros durante 15 dias

Neste experimento utilizou-se 5 (cinco) grupos de ratas, submetidos a injeção de aloxano para elevação do fósforo sérico (idem ítem 4.2.3).

Após o período de 15 dias, os animais receberam o tratamento com os polímeros através de ração, durante 15 (quinze) dias da seguinte maneira:

- GRUPO I: Controle, recebeu ração e água normais (grupo sem lesão renal);
- GRUPO II: Aloxano, tratados com ração e água normais;
- GRUPO III: Ração contendo QTS-I 0,054% de Ferro e fosfato 1,2%;
- GRUPO IV: Grupo recebeu apenas ração contendo fosfato na mesma concentração (1,2%);
- GRUPO V: Ração contendo QTS-S 0,054% de Ferro e fosfato 1,2%;

Todos os grupos, exceto grupos I e II, receberam água contendo fosfato em paralelo com a ração. Água e ração foram pesados diariamente.

Após 15 dias de tratamento, os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos no ítem 4.2.4.1 para coleta de sangue e retirada dos órgãos.

Durante o período de tratamento, foram realizadas três pesagens dos animais para avaliação do peso corporal e comparação entre os grupos.

4.2.4.4 Tratamento com QTS-I através de Ração preparada com os polímeros durante 15 dias

Este experimento foi realizado com apenas quatro grupos de ratos, machos, submetidos a injeção de aloxano (idem ítem 4.2.3). Após o período de 15 dias, os animais receberam o tratamento com QTS-I e fosfato através de ração durante 15 dias da seguinte:

- GRUPO I: Controle, recebeu ração e água normais (grupo sem lesão renal);
- GRUPO II: Aloxano, tratados com ração e água normais;
- GRUPO III: Grupo recebeu apenas ração contendo fosfato 1,2%;

- GRUPO IV: Ração contendo QTS-I 0,054% de Ferro e fosfato 1,2%.

Os grupos, exceto grupos I e II, receberam água contendo fosfato em paralelo com a ração. Água e ração foram pesados diariamente.

Após 15 dias de tratamento, os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos no item 4.2.4.1 para coleta de sangue e retirada dos órgãos.

Durante o período de tratamento, foram realizadas três pesagens dos animais para avaliação do peso corporal e comparação entre os grupos.

4.2.5 Ensaio Bioquímicos

Para todas as dosagens bioquímicas, exceto sódio, potássio, cálcio e ferro foi utilizado automação Cobas Mira (ROCHE®) com metodologia Wiener. Os métodos das respectivas dosagens estão descritos abaixo conforme as bulas dos Kits.

O fósforo foi determinado por método UV onde o mesmo reage em meio ácido com o molibdato para dar um complexo fosfomolibdico que é medido espectrofotometricamente a 340 nm. A absorbância deste complexo na faixa do UV é diretamente proporcional a concentração do fósforo (Kit Wiener®) (FÓSFORO, 2000).

A creatinina foi dosada pelo método cinético a 500 nm, sem desproteinização, onde reage com o picrato alcalino (reação de Jaffé) produzindo um cromogênio vermelho (Kit Wiener®) (CREATININA, 2000).

A glicemia foi determinada por sua reação com a glicose oxidase, na qual são gerados o ácido glicurônico e o peróxido de hidrogênio. Este, reage então com uma aceptor de oxigênio, como a orto-dianisidina, fenilamina-fenazona (reagente de Trinder), numa reação catalisada pela peroxidase para formar coloração vermelha medida em 505 nm (Kit Diasys®) (HENRY, 1999, GLICOSE, 2004).

O ferro foi determinado pelo método onde o íon férrico presente na amostra reage com o cromazurol B e com o cetilmetilamoniobromida (CTAB) formando um complexo medido espectrofotometricamente em 626 nm. O Kit utilizado para as dosagens foi BIOSYSTEMS® (GARCIA, 1979; PARIS; BENAÏT; RIGAT; PROGNON, 1986; FERRO, 2002).

Os níveis séricos de magnésio foram determinados por metodologia Wiener®, através de método colorimétrico direto. Em pH alcalino, o magnésio reage com a calmagita formando um complexo colorido, cuja absorvância medida em 520 nm, é proporcional à concentração de magnésio na amostra analisada. A presença de EGTA (ácido tetracético etilenoglicol) no reagente evita a interferência do cálcio (MAGNÉSIO, 2000).

As concentrações séricas de sódio, potássio e cálcio foram determinadas pelo método de íon-seletivo em automação ISELAB (DRAKE®). A análise de sódio é baseada em uma membrana de vidro sensível a este íon. Uma diferença de potencial elétrica é gerada quando esta membrana separa duas soluções com diferentes concentrações de sódio. Esta diferença de potencial é proporcional a diferença de concentração dos íons sódio entre as duas soluções. Como uma das soluções é a solução eletrolítica interna do eletrodo e portanto possui uma concentração de sódio constante e conhecida, pode-se determinar a concentração da amostra. O mesmo princípio é utilizado para a determinação de potássio e cálcio (BURTIS; ASHWOOD, 1998).

4.2.6 Parâmetros hematológicos

Após a coleta das amostras em tubos contendo EDTA como anticoagulante, os parâmetros hematológicos foram analisados pela automação CELLDYN 3000 (ABBOTT®). Foi realizada contagem diferencial de leucócitos utilizando contador manual e microscópio óptico.

Na determinação da concentração de hemoglobina, o sangue é diluído numa solução de ferrocianeto de potássio e cianeto de potássio. O ferrocianeto oxida as hemoglobinas até hemoglobina, e o cianeto fornece íons cianetos até formar cianeto de hemoglobina (HiCN) que é lida em 540 nm

sendo comparada com uma solução padrão de HiCN (ABBOT HEMATOLOGIA CD 3000 CS/SL. Manual resumido do operador).

O hematócrito foi medido indiretamente como produto do volume corpuscular médio (VCM) x hematimetria. Os eritrócitos e plaquetas foram medidos pelo método da Impedância Elétrica, onde as células, ao passarem por uma abertura, através da qual flui uma corrente, provoca alterações elétricas que são computadas como pulsos de voltagem (MANUAL RESUMIDO DO OPERADOR – ABBOTT HEMATOLOGIA CD 3000 CS/SL).

Os leucócitos são determinados por um detector fotossensível que mede a dispersão da luz com uma tecnologia chamada Dispersão Polarizada Multiangular. O sangue é diluído numa solução que mantém os leucócitos num estado próximo ao natural, mas que torna os eritrócitos transparentes ao laser. São efetuadas quatro medidas simultâneas de dispersão de luz em cada leucócito (HENRY, 1999).

4.2.7 Preparação da solução de órgãos

Os órgãos retirados dos animais (fígado, rim, pulmão e baço) foram congelados até a realização das dosagens. Primeiramente os órgãos foram secos durante 12 horas à uma temperatura média de 80 °C e, em seguida, foi pesado 1 grama de cada órgão, colocado em banho de areia a 150 °C. As amostras foram solubilizadas em água régia, ou seja, uma solução de HCl 1M: HNO₃ 1M a 100 °C, em banho de areia, por aproximadamente 1 hora. Posteriormente, foi filtrado, completado para 100 mL com água destilada, em balão volumétrico de 100 mL (FAGUNDES et al, 2001).

4.2.8 Análise de fosfato nos órgãos

A determinação de fósforo (fosfato), foi realizada pelo método fosfomolibdato, utilizando kit Analisa Diagnóstica ®. O íon fosfato (Pi) reage com molibdato de amônio na presença de ácido sulfúrico formando um complexo de fosfomolibdato de amônio. Por ação da hidroxilamina em meio

alcalino, o complexo formado é reduzido a azul de molibdênio cuja absorvância, medida em 650nm, é diretamente proporcional à concentração de fósforo na amostra. As análises das amostras foram feitas em triplicata, utilizando o espectrofotômetro UV/ Vis Shimadzu UV 1601 (FÓSFORO, 2002).

4.2.9 Análise de ferro nos órgãos

Para a determinação de ferro, foi realizado método Goodwin modificado utilizando kit Labtest Diagnóstica ®. Os íons férricos são dissociados da transferina por ação de um tampão ácido e reduzidos a íons ferrosos por ação da hidroxilamina. Após a adição do Ferrozine forma-se um complexo magenta brilhante cuja absorvância, medida em 560nm, é proporcional à quantidade de ferro na amostra. As análises das amostras foram feitas em triplicata, utilizando o espectrofotômetro UV/ vis Shimadzu UV 1601 (FERRO, 2003).

4.2.10 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) e estes foram avaliados estatisticamente através da análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de múltipla comparação utilizando-se o método de Dunnet, Tukey quando apropriados. Valores de $p < 0,05$ ou menos serão considerados como indicativos de significância ($p < 0.05$ = significativo, $p < 0.01$ = muito significativo, $p < 0.001$ = extremamente significativo).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Devido às dificuldades existentes na área de nefrologia clínica no combate a hiperfosfatemia, buscaram-se, cada vez mais, novas alternativas para combater este problema que é um dos mais comuns entre doentes renais. Deste modo, os complexos de quitosana-ferro (III) vêm sendo empregados como substâncias alternativas para a redução dos níveis de fosfato no soro (JING et al., 1992; BAXTER et al., 2000 e BÜRGER et al., 2001).

Neste trabalho, procurou-se avaliar os efeitos do complexo QTS-Fe (III) solúvel reticulada (insolúvel) em animais previamente induzidos a hiperfosfatemia através de água contendo fosfato (1,2 %) e do agente diabetogênico aloxano. Para tanto, foram analisados alguns parâmetros bioquímicos e hematológicos, ganho de peso e o efeito sobre o peso relativo dos órgãos dos animais. Porém, inicialmente necessitou-se padronizar uma técnica que reproduzisse um quadro semelhante ao que ocorre em um paciente diabético que evolui para insuficiência renal (hiperfosfatemia). Por isso, tentou-se empregar uma droga já utilizada, trabalhada pelo nosso grupo de estudo e com efeitos conhecidos, como é o caso do aloxano. Sua ação diabetogênica caracteriza-se pela produção de radicais livres que são tóxicos, especificamente nas células beta do pâncreas, levando à degeneração e morte definitiva das mesmas (GRANKVIST et al., 1979). Essa citotoxicidade seletiva do aloxano ocorre devido à grande capacidade da célula beta em acumular a droga, aliada ao fato de tal célula demonstrar uma maior sensibilidade aos radicais peróxidos, quando comparada a outros tecidos (JORNS et al., 1999).

No diabetes experimental induzido por substâncias químicas como o aloxano, as lesões renais causadas nos animais são similares às aquelas causadas na nefropatia diabética em humanos. Em ratos evidencia-se um aumento da proliferação de células da matriz mesangial, espessamento da membrana basal glomerular e depósito de glicogênio nas células tubulares (MACEDO et al., 2002). A razão pela qual utilizou-se esta metodologia foi promover uma diminuição das funções renais, e, desse modo, alterar os níveis

séricos de fosfato dos animais, para então iniciar o tratamento com o polímero em estudo. Os resultados obtidos serão explanados a seguir.

5.1 Síntese do complexo Quitosana-Fe(III)

A quitosana-Fe(III) foi preparada no laboratório de química pela aluna de graduação do curso de Farmácia Rafaela Dall'Oglio com a quitosana comercial, partindo-se de 18,0 g. A concentração final de ferro do polímero obtida foi 131 mg de ferro/g de polímero, o que corresponde à 13,1% de ferro.

5.2 Tratamento com QTS-S e QTS-I através de gavagem durante 15 dias

Neste primeiro tratamento os animais foram tratados por via oral, utilizado-se o $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ como tratamento controle de ferro. Vale lembrar que todos os animais, exceto o grupo controle, receberam aloxano para auxiliar no aumento do fósforo sérico.

A figura 3 mostra o efeito do tratamento com o polímero sobre o peso corporal dos animais durante os 15 dias de tratamento. Como pôde-se observar, houve aumento de peso da maioria dos grupos tratados. Somente nos grupos QTS-S 50 e QTS-S 100 houve uma diminuição de peso entre início e final do tratamento. Este resultado demonstra que o tratamento com o complexo QTS-S interferiu no ganho de peso durante o tratamento, diminuindo o peso corporal dos animais, porém essa diminuição não foi estatisticamente diferente dos outros grupos. Resultados semelhantes foram apresentados por Baxter e colaboradores (2000), em tratamento com o complexo quitosana-ferro na ração, durante 30 dias.

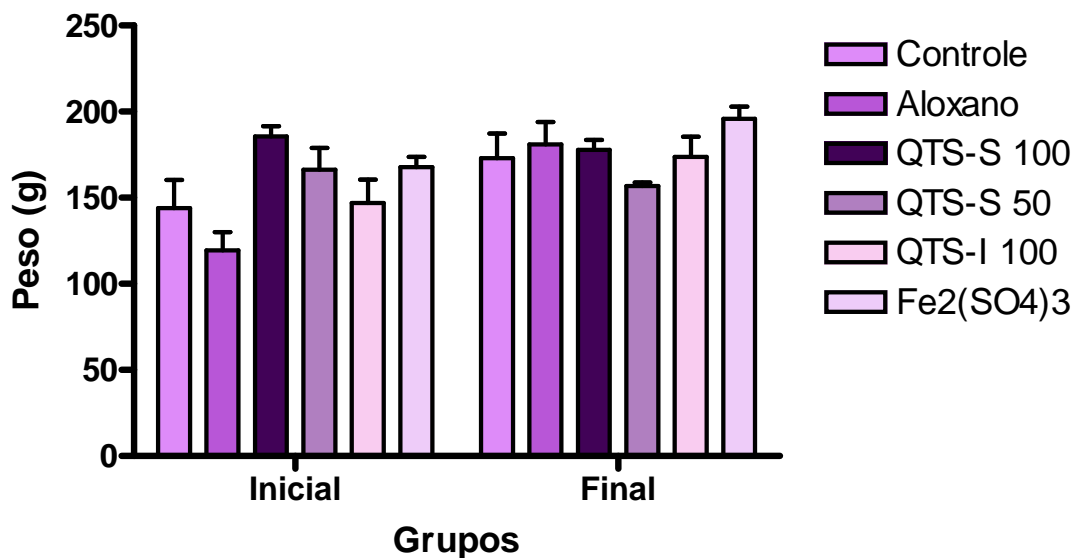


Figura 3: Efeito do tratamento com o complexo Quitosana sobre a variação de peso corporal dos animais tratados por 15 dias. Cada coluna representa a média dos pesos dos animais, no início e no final do tratamento, comparados com o grupo controle, e as barras os respectivos EPMS ($n = 2 - 5$), empregando-se a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunnett em relação ao controle * $p < 0.05$ = significativo, ** $p < 0.01$ = muito significativo, *** $p < 0.001$ = extremamente significativo.

A figura 4 mostra a diferença de peso relativo dos órgãos dos animais durante o tratamento. Como pôde-se observar, o único órgão que apresentou significância nos valores de peso dos órgãos foi o pulmão, onde verificou-se uma diminuição significativa de todos os grupos em relação ao grupo controle. Essa diminuição provavelmente se deve a presença do aloxano, já que a alteração ocorreu em todos os grupos que receberam a droga diabetogênica. Com o restante dos órgãos, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos tratados. Estes resultados demonstram que o tratamento com o polímero não teve alteração pronunciada sobre o peso dos órgãos.

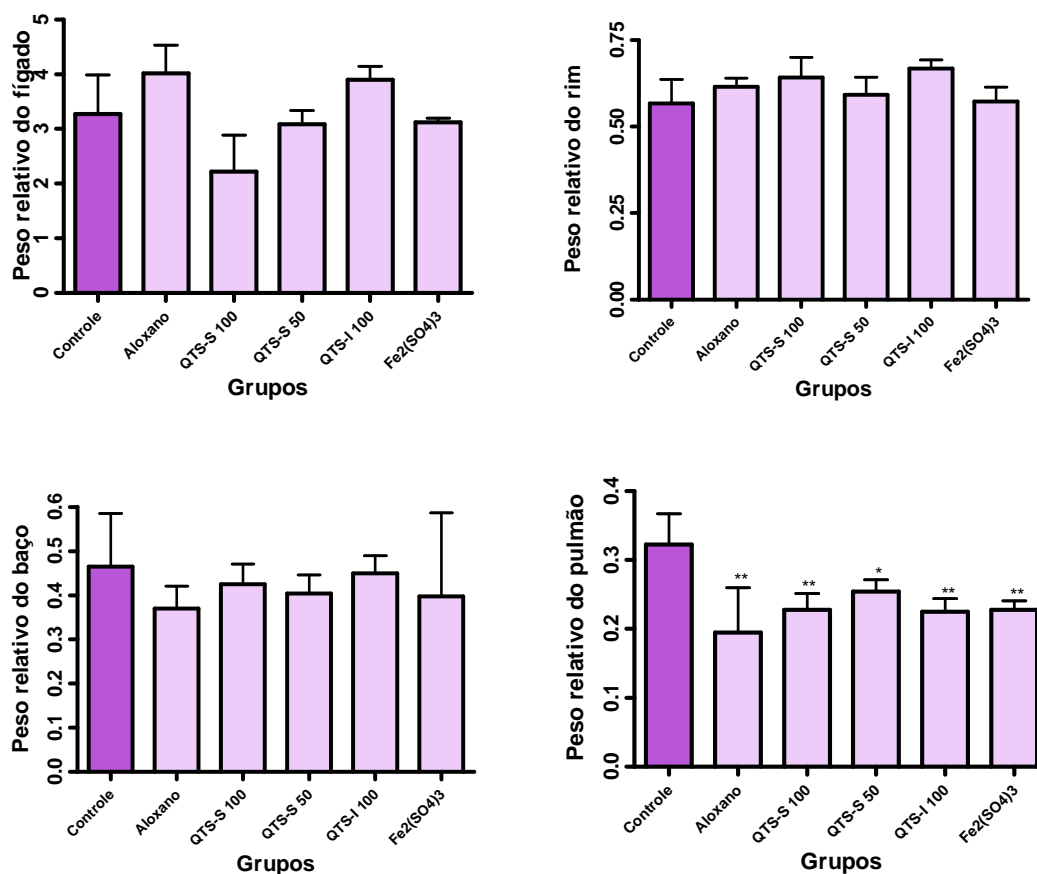


Figura 4: Efeito do tratamento com o complexo quitosana-ferro sobre o peso relativo dos órgãos dos animais tratados por 15 dias. Cada gráfico se refere a um órgão e cada coluna representa a média do peso do órgão e as baixas os respectivos EPMS. Os asteriscos indicam as diferenças significativas em relação ao grupo controle, empregando-se a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunnet em relação ao controle * $p < 0.05$ = significativo, ** $p < 0.01$ = muito significativo, *** $p < 0.001$ = extremamente significativo ($n = 2 - 5$).

Os quadros 1 e 2 mostram os valores de fósforo e ferro respectivamente, dos grupos de animais tratados com os polímeros solúvel e insolúvel em diferentes concentrações e com sulfato ferroso.

QUADRO 1: Determinação de fósforo (mg/g) nos órgãos dos animais tratados por via oral durante 15 dias.

ÓRGÃOS	Controle	Aloxano	QTS-S 50	QTS-S 100	QTS-I 100	Fe ₂ (SO ₄) ₃
Fígado	8,9	5,1	11,7	20,1	40,6	33,4
Rim	11,7	10,8	9,6	27,1	58,5	30,6
Baço	9,08	9,8	10,20	6,4	25,3	26,7
Pulmão	3,3	4,6	1,5	6,8	11,8	12,6

Analisando os resultados de fósforo (quadro 1), verifica-se que os níveis de fósforo em todos os órgãos analisados, estão elevados nos grupos QTS-I 100 e Fe₂(SO₄)₃ em relação ao grupo controle, indicando um possível acúmulo do elemento nesses animais quando receberam tratamento por via oral. Pelo fato da insolubilidade da quitosana e eficácia no processo de retirada do fósforo sérico, esta, pode estar se complexando com algum componente de membrana desses órgãos e, desse modo, estar aumentada.

Os grupos tratados com aloxano e QTS-S 50 tiveram resultados aproximados ao controle em todos os órgãos analisados, demonstrando que a presença do polímero solúvel na dose de 50 mg/kg não alterou esse parâmetro.

No quadro 2 encontra-se a determinação de ferro nos órgãos dos animais tratados. Os resultados apresentados para o rim demonstram que em todos os grupos há uma maior concentração de ferro do que no grupo controle. Observou-se também que, com exceção do rim, em todos os outros órgãos, o grupo aloxano apresentou valores diminuídos em relação ao grupo controle. O grupo Fe₂(SO₄)₃ apresentou resultados elevados em todos os órgãos. O grupo QTS-I também apresentou valores elevados, com exceção ao baço. Por último, o grupo QTS-S 50, exceto para o fígado, apresentou resultados muito próximos de ferro em relação ao grupo controle. Estes resultados eram esperados para a quitosana-solúvel, pois demonstram que não houve acúmulo de ferro do polímero nos órgãos dos animais tratados, já que os resultados foram próximos ao grupo controle, o que clinicamente é um bom resultado.

QUADRO 2: Determinação de ferro ($\mu\text{g/g}$) nos órgãos dos animais tratados por via oral durante 15 dias.

ÓRGÃOS	Controle	Aloxano	QTS-S 50	QTS-S 100	QTS-I 100	$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$
Fígado	168	103,6	157	119	828,4	228,4
Rim	47	95,5	157	154	201,3	605,4
Baço	401	133,3	439	126	149,1	875,2
Pulmão	81	47,7	733	132	59,9	153,6

O quadro 3 apresenta os parâmetros bioquímicos dos animais em tratamento oral com o polímero. Observa-se que a glicose sérica dos animais tratados apenas com aloxano é significativamente elevada em relação ao grupo controle, indicando a eficiência do tratamento com o agente diabetogênico. Outra observação foi que no grupo tratado com o polímero solúvel na dose de 50 mg/kg, a glicemia dos animais retorna aos valores normais, pois não há diferença entre o grupo controle (88,75 mg/kg) para o grupo QTS-S 50 (96,2 mg/dL). Em contrapartida, nos grupos tratados com a QTS-I e $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, houve interferência na concentração da glicemia, pois os valores encontrados são similares ao valor encontrado para o grupo aloxano.

QUADRO 3: Determinação sérica dos parâmetros bioquímicos em ratos fêmeas tratados por via oral com compostos durante o período de 15 dias.

GRUPOS	Glicose (mg/dL)	Sódio (mmol/L)	Potássio (mmol/L)	Ferro ($\mu\text{g/dL}$)	Fosfato (mg/dL)	Magnésio (mg/dL)
CONTROLE	¹ 88,75 \pm 8,28	140,25 \pm 0,95	3,50 \pm 0,14	282,98 \pm 40,95	5,20 \pm 0,14	1,21 \pm 0,08
ALOXANO	149,0 \pm 21,0**	145,50 \pm 0,50**	2,35 \pm 0,25**	360,60 \pm 53,2	4,66 \pm 0,02	1,38 \pm 0,15
QTS-S 100	106,80 \pm 6,05	143,75 \pm 0,48**	2,90 \pm 0,19	322,7 \pm 26,69	3,74 \pm 0,16**	1,47 \pm 0,06
QTS-S 50	96,20 \pm 11,53	144,20 \pm 0,92**	2,74 \pm 0,17*	260,9 \pm 33,09	4,11 \pm 0,14**	1,50 \pm 0,11
QTS-I 100	156,75 \pm 5,36**	139,0 \pm 0,41	3,25 \pm 0,28	339,0 \pm 68,6	3,90 \pm 0,09**	1,37 \pm 0,05
FE₂(SO₄)₃	159,25 \pm 15,15**	139,75 \pm 0,48	3,58 \pm 0,08	380,15 \pm 18,61	5,02 \pm 0,10	1,44 \pm 0,03

¹Dados apresentados como Média \pm Erro Padrão Médio, (n = 2 – 5), Teste de comparação múltipla de Dunnet em relação ao controle * p < 0.05 = significativo, ** p < 0.01 = muito significativo, *** p < 0.001 = extremamente significativo.

A determinação da glicose sérica foi realizada com o intuito de verificar se o tratamento com o agente diabetogênico (aloxano) foi eficaz. Verifica-se que a droga elevou a concentração da glicose sangüínea, ou seja, induziu o diabetes. O tratamento com a QTS-S, diminuiu a glicemia dos animais em 15 dias de tratamento, mas este efeito não foi verificado para a QTS-I. Substâncias diabetogênicas como o aloxano podem envolver esta condição patológica ou promover uma sobrecarga ao sistema regulatório da glicose, resultando no desequilíbrio e levando a hiperglicemia (SOARES et al., 2002).

A avaliação da função renal dos animais foi determinada através da dosagem sérica de magnésio, eletrólitos (sódio e potássio) e fósforo.

Os valores encontrados para as dosagens séricas de sódio dos grupos aloxano, QTS-S 100 e QTS-S 50 foram significativamente elevados em relação ao grupo controle. Este resultado provavelmente se deve a perda do equilíbrio entre os líquidos intra e extracelular (HENRY, 1999) provocado possivelmente pela administração de aloxano, e desse modo, elevando a concentração séricas de sódio nesses grupos de animais. Resultados diferentes foram encontrados para os grupos QTS-I 100 e $Fe_2(SO_4)_3$, onde a concentração do analito se apresentou idêntica em relação ao grupo controle. Provavelmente a presença destas substâncias pode ter impedido esta perda da homeostase celular.

Analisando os valores de potássio, também observa-se uma diferença significativa dos grupos aloxano e QTS-S 50 em relação ao grupo normal. O potássio também participa da homeostase e do funcionamento normal dos potenciais de membrana dos tecidos (HENRY, 1999). Desse modo, pode-se afirmar novamente que a presença da droga diabetogênica promoveu um desequilíbrio nestes dois grupos de animais.

Ainda, de acordo com o quadro 1, a concentração de magnésio sérico dos animais tratados com o complexo, não diferiu estatisticamente aos valores encontrados para o grupo aloxano. Segundo Wallach (2003), este parâmetro também está relacionado com perda da função renal, e seu aumento indica uma diminuição dos índices de filtração glomerular, ou seja, a hipermagnesemia está inversamente relacionada com a função renal residual.

Os valores das dosagens de ferro nos animais tratados não foram diferentes estatisticamente em relação ao grupo controle. Tais resultados indicam que a QTS-S e a QTS-I são estáveis, e foram semelhantes aos observados por Bürger e colaboradores (2001), para a QTS-Fe(III) reticulada.

A concentração de ferro aumentou na maioria dos grupos em relação ao controle, provavelmente devido ao tratamento com aloxano. Os valores estão abaixo do valor considerado tóxico (500 µg/dL) sendo que, em nenhum dos grupos tratados, a concentração sérica de ferro se aproximou desse valor.

O fósforo dos grupos QTS-S 100, QTS-S 50 e QTS-I 100 apresentou-se significativamente diminuído em relação aos valores encontrados em animais saudáveis, podendo indicar que realmente quitosana-ferro é eficaz em diminuir a concentração sérica deste analito.

Quando comparou-se os grupos tratados com o polímero em relação ao grupo aloxano (controle animais doentes), também verificou-se uma diminuição de fósforo sérico significativa, porém apenas dos grupos QTS-S 100 e QTS-I 100. Resultados semelhantes foram apresentados por Valcarenghi e Sandri (1999), em estudos com o complexo QTS-Fe(III) reticulada, que apresentou bom desempenho na redução dos níveis de fosfato no soro de ratos hiperfosfatêmicos, na dose de 30 mg/kg, durante quinze dias de tratamento. Bürger e colaboradores (2001) também demonstraram o efeito da QTS-Fe(III) reticulada na redução dos níveis de fosfato em animais com hiperfosfatemia. Vale lembrar que estes estudos foram realizados com animais saudáveis e apenas com a quitosana insolúvel, ou seja, sem o tratamento com o aloxano, apenas com aumento de fosfato sérico pela ingestão em água.

O complexo quitosana-ferro (III) reduz o fósforo sérico através da adsorção deste pelo ferro. Esta ligação do fosfato ao complexo depende do pH. O pH 7,5 é a condição ótima, ou seja, ocorre o máximo de adsorção. Nestas condições o HPO_4^{2-} é a espécie predominante e ocorre a formação do complexo $[\text{FeHPO}_4]^+$ na superfície do polímero (FAGUNDES et al., 2001).

A dose de compostos contendo ferro utilizada neste estudo corresponde ao equivalente a 3,5 e 7,0 g/dia, considerando o tratamento de um adulto de aproximadamente 70 kg. Esta dose é muito menor quando comparada com aquela relatada por Hsu; Patel; Young (1999), que foi de 240 g/dia utilizando o citrato de ferro.

Quando comparou-se os resultados deste estudo com aqueles relatados por Baxter e colaboradores (2000), utilizando quitosana-ferro, observou-se uma redução de aproximadamente de 8 e 17 vezes, uma vez que os autores utilizaram aproximadamente o equivalente a 60 g/dia.

Os parâmetros hematológicos desse grupo de animais tratados com o complexo quitosana-ferro (III) são apresentados no quadro 4.

QUADRO 4 – Determinação dos parâmetros hematológicos em ratos fêmeas tratados por via oral com compostos durante o período de 15 dias.

PARÂMETROS ANALISADOS	CONTROLE	ALOXANO	QTS-S 100	QTS-S 50	QTS-I 100	FE ₂ (SO ₄) ₃
Leucócitos(10 ² /μL)	1,52 ± 0,48	2,85 ± 0,55	2,70 ± 0,45	1,56 ± 0,33	2,02 ± 0,19	3,32 ± 0,45*
Hemácias (10 ⁴ /mm ³)	8,16 ± 0,10	7,8 ± 0,01	8,07 ± 0,02	7,96 ± 0,06	7,85 ± 0,10	7,62 ± 0,13*
Hemoglobina (g/dL)	15,43 ± 0,28	14,85 ± 0,15	15,33 ± 0,48	15,24 ± 0,08	14,95 ± 0,29	14,92 ± 0,36
Hematócrito (%)	45,86 ± 0,93	44,05 ± 0,35	46,48 ± 0,62	45,92 ± 0,27	44,25 ± 0,64	44,5 ± 0,72
VCM (fL)	56,35 ± 0,96	57,75 ± 0,75	57,6 ± 0,68	57,74 ± 0,42	57,6 ± 0,47	58,45 ± 0,61
HCM (pg)	18,76 ± 0,24	19,0 ± 0,20	19,02 ± 0,59	19,2 ± 0,23	19,02 ± 0,24	19,62 ± 0,25
CHCM (g/dL)	33,22 ± 0,50	32,95 ± 0,75	32,98 ± 0,63	33,24 ± 0,28	33,02 ± 0,36	33,52 ± 0,32
Plaquetas (10 ³ /μl)	757,0 ± 55,89	851,0 ± 65,0	841,75 ± 50,57	969,2 ± 30,8	879,5 ± 66,55	798,5 ± 82,82
Neutrófilos (%)	29,4 ± 2,45	37,15 ± 12,75	31,58 ± 4,04	36,46 ± 4,71	31,48 ± 1,48	28,15 ± 3,80
Linfócitos (%)	62,18 ± 4,30	58,85 ± 12,15	58,88 ± 6,02	57,94 ± 4,86	63,8 ± 2,30	61,5 ± 7,78
Eosinófilos (%)	5,3 ± 1,59	2,05 ± 0,15	2,58 ± 0,30	3,6 ± 0,37	2,82 ± 0,75	2,55 ± 0,33
Basófilos (%)	1,85 ± 0,13	1,7 ± 0,50	1,5 ± 0,41	1,22 ± 0,18	1,65 ± 0,21	2,02 ± 0,28
Monócitos (%)	1,28 ± 1,00	0,2 ± 0,10	0,42 ± 0,11	0,68 ± 0,18	0,2 ± 0,06	0,65 ± 0,32

Dados apresentados como Média ± Erro Padrão Médio, (n = 4 – 9), Teste de comparação múltipla de Dunnet em relação ao controle * p < 0.05 = significativo, ** p < 0.01 = muito significativo, *** p < 0.001 = extremamente significativo.

De acordo com o quadro 4, dos parâmetros hematológicos avaliados, somente a quantidade total de hemácias e de leucócitos apresentaram diferença estatística entre os grupos.

O grupo tratado com $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ apresentou resultados da dosagem de hemácias significativamente diminuídas em relação ao grupo controle. Essa diferença não está relacionada com a presença de aloxano, pois outros grupos também receberam a droga e seus parâmetros não foram afetados.

Os resultados da contagem de leucócitos totais (WBC) encontrados nos animais tratados com $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ em relação com ao grupo controle, foram significativamente diferentes. Este grupo apresentou um nível mais elevado de glóbulos brancos se relacionados com os outros grupos. Os leucócitos se relacionam a diversas funções de defesa e de reparação do organismo. Apresentam importante papel na remoção de antígenos invasores, bem como na produção de anticorpos (GUIMARÃES, 1990), e provavelmente o aumento de células brancas no grupo tratado com sulfato ferroso representou um mecanismo de defesa que o próprio organismo preparou para combater um possível processo inflamatório causado pela presença do aloxano.

Os demais parâmetros apresentados no hemograma dos animais não se mostraram estatisticamente diferentes entre os grupos.

5.3 Tratamento com QTS-Solúvel e Insolúvel com Ração em ratas durante 30 dias

Neste experimento utilizou-se com ração preparada com o polímero quitosana-ferro. Apesar de o tratamento anterior ter sido eficiente em retirar o fósforo sérico, optou-se por administrar o complexo através da ração, no intuito de diminuir o erro causado pelo estresse do animal quando tratados através de via oral. Outro motivo pelo qual optou-se pelo tratamento através da ração contendo o adsorvente foi que normalmente os adsorventes orais de fosfato são administrados durante as refeições, diminuindo assim o fosfato livre, que seria adsorvido pelo trato gastrintestinal.

Como os animais tiveram livre acesso ao alimento, a alternativa mais correta para avaliar a eficiência do adsorvente foi a preparação da ração modificada com a substância adsorvente.

Na figura 5 estão representados os efeitos dos tratamentos com o polímero sobre o peso corporal durante os 30 dias de tratamento.

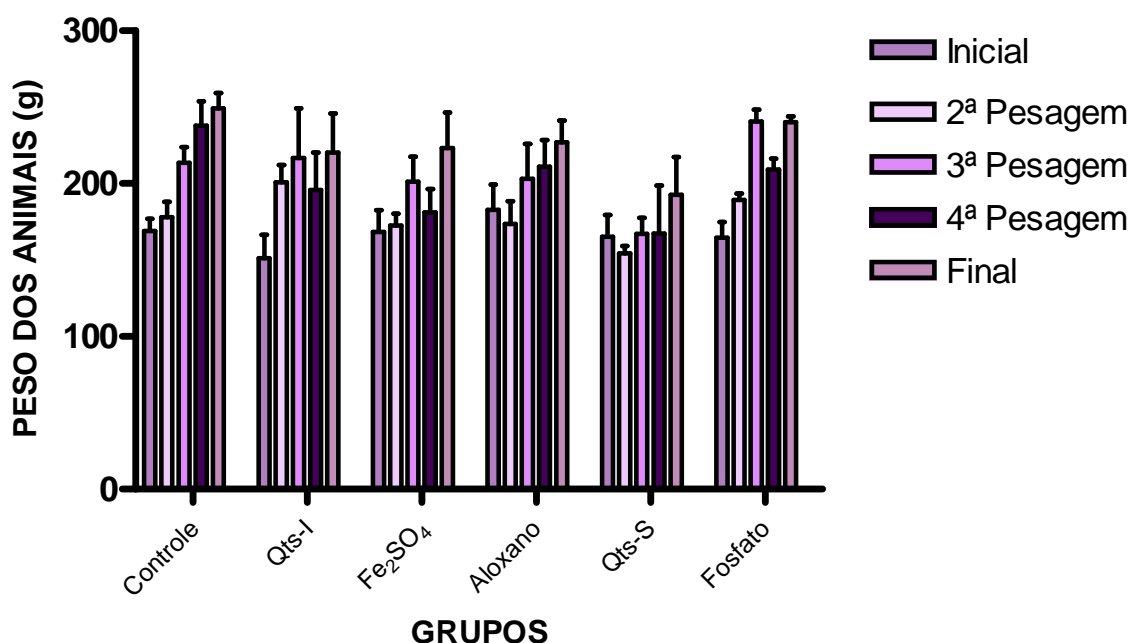


Figura 5: Efeito do tratamento com o complexo Quitosana-ferro sobre a variação de peso corporal dos animais tratados por 30 dias. Cada coluna representa a média dos pesos dos animais, no início até o final do tratamento, comparados com o grupo controle, e as barras os respectivos EPMS. empregando-se a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo

teste de comparação múltipla de Dunnet em relação ao controle * $p < 0.05$ = significativo, ** $p < 0.01$ = muito significativo, *** $p < 0.001$ = extremamente significativo ($n = 2 - 5$).

Como pôde-se observar, houve aumento de peso da maioria dos grupos tratados. Os animais que receberam QTS-S apresentaram um menor aumento de peso quando comparados com os outros grupos. Estes resultados demonstram que os animais não recusaram a alimentação (ração modificada contendo compostos de ferro). Comportamento semelhante foi relatado por Baxter e colaboradores (2000) para ratos tratados com ração contendo quitosana-ferro, no entanto sem o tratamento prévio com o aloxano.

A figura 6 mostra a diferença de peso relativo dos órgãos dos animais durante o tratamento.

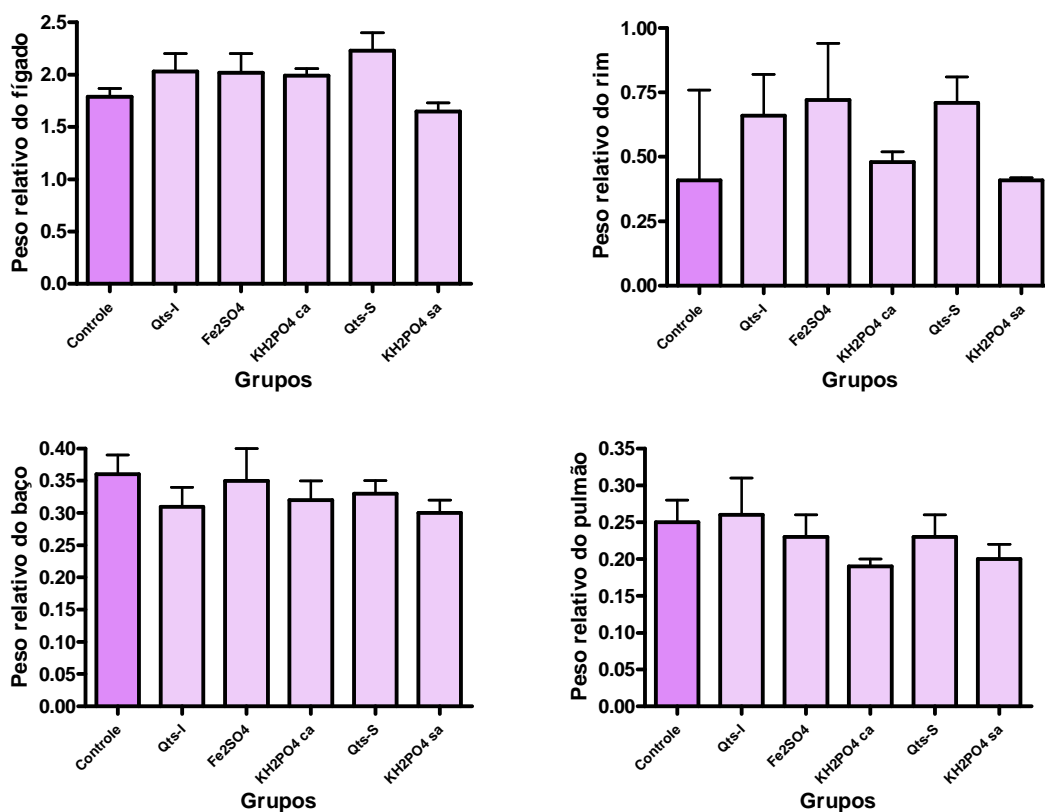


Figura 6: Efeito do tratamento com o complexo quitosana-ferro sobre o peso relativo dos órgãos dos animais tratados por 30 dias. Cada gráfico se refere a um órgão e cada coluna representa a média do peso do órgão e as barras os respectivos EPMS. Os asteriscos indicam as diferenças significativas em relação ao grupo controle, empregando-se a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunnet em relação ao controle * $p < 0.05$ = significativo, ** $p < 0.01$ = muito significativo, *** $p < 0.001$ = extremamente significativo ($n = 2 - 5$).

Como pôde-se observar, não houve diferença significativa entre o peso dos órgãos dos animais tratados com o polímero quando comparados com o grupo controle. Este resultado reproduziu os resultados do experimento anterior, com exceção do pulmão, que apresentou resultados significativos quando avaliou-se os órgãos na administração via oral do polímero.

Os quadros 5 e 6 mostram respectivamente os valores de fósforo e ferro, dos grupos de animais tratados com os polímeros solúvel e insolúvel e com sulfato ferroso.

QUADRO 5: Determinação de fósforo (mg/g) nos órgãos dos animais alimentados com ração por 30 dias.

ÓRGÃOS	Controle	Aloxano	Fosfato	QTS-I 0,5%	QTS-S 0,5%	Fe ₂ (SO ₄) ₃
Fígado	4,52	8,67	4,56	7,35	2,28	4,56
Rim	4,7	15,6	4,6	14,2	7,4	12,4
Baço	3,6	4,1	4,2	3,6	2,3	3,4
Pulmão	1,16	0,72	0,79	0,46	5,18	0,92

Analisando os resultados de fósforo (quadro 5), verifica-se que os níveis de fósforo no fígado dos grupos fosfato e Fe₂(SO₄)₃ se aproximou aos valores observados no grupo controle. Já, o grupo tratado com o polímero insolúvel apresentou resultados que se aproximaram mais do grupo aloxano, ou seja, resultados mais elevados. O único grupo que apresentou valores mais baixos dos teores de fósforo no fígado foi o grupo tratado com quitosana solúvel. Provavelmente a forma do polímero foi administrada (ração) pode ter interferido na concentração de fósforo neste órgão.

Quando avaliou-se os níveis de fósforo no rim, novamente encontrou-se resultados similares entre os grupos Fosfato e Controle. Os grupos QTS-I e Aloxano apresentaram concentrações muito maiores de fosfato nesse órgão.

A determinação dos níveis de fósforo no baço dos animais foi similares para todos os grupos. No pulmão os valores encontrados foram baixos, com exceção do grupo QTS-S, que apresentou valores elevados (5,18 mg/g). Vale

ressaltar que os valores do grupo controle de todos os órgãos foram aproximadamente duas vezes menores do que os valores apresentados no tratamento anterior.

O quadro 6 demonstra os valores de ferro dos grupos tratados com o polímero. Os valores de ferro no fígado dos animais dos grupos QTS-I e $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ estão elevados em relação ao grupo controle, enquanto que os grupos aloxano e QTS-S estão diminuídos em relação ao grupo controle. No rim, o ferro apresentou resultados similares ao controle para os grupos QTS-I, QTS-S e $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$; enquanto que no pulmão, todos os grupos tiveram valores menores que do grupo controle. A concentração de ferro nos órgãos é menor quando comparada com o tratamento realizado por Valcarenghi (2006), considerando que os animais foram submetidos ao tratamento, via oral, por um período de 90 dias. A dependência do tempo de tratamento com os níveis de ferro no fígado e baço foi relatado por Kirk; Heinecke; LeBoeuf (2001), que encontraram um aumento de 57% no ferro dos órgãos após 18 meses de tratamento de ratos alimentados com ração contendo 2% de carbonil ferro.

QUADRO 6: Determinação de ferro ($\mu\text{g/g}$) nos órgãos dos animais alimentados com ração por 30 dias.

ÓRGÃOS	Controle	Aloxano	Fosfato	QTS-I	QTS-S	$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$
Fígado	465,5	246,9	502	530,3	287,4	803,5
Rim	161,6	197,8	269,1	158,6	152,6	162,6
Baço	2142,5	2478,9	2473,8	2459,8	2278	2219
Pulmão	134,5	126,3	90,2	85,3	118,1	106,6

Chuan-amusorm e colaboradores (1999) também encontraram uma dependência de tempo de tratamento com a quantidade de ferro no fígado de ratos tratados com carbonil-ferro. A concentração aumentou 300% e 500% para animais tratados durante 12 e 22 meses respectivamente.

A quantidade de ferro no grupo alimentado com ração contendo $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ficou acima quando comparado com os outros grupos. Resultados semelhantes foi relatado por Rincker e colaboradores (2005), para porcos alimentados com ração contendo a mesmo composto durante 35 dias.

O quadro 7 traz os parâmetros bioquímicos dos grupos tratados com os polímeros.

QUADRO 7 - Determinação sérica dos parâmetros bioquímicos de ratos fêmeas tratados com ração durante o período de 30 dias.

PARÂMETROS ANALISADOS	CONTROLE	ALOXANO	FOSFATO	QTS-S	QTS-I	Fe ₂ (SO ₄) ₃
Glicose (mg/dL)	89,75 ± 4,72	197,6 ± 39,90**	130,6 ± 10,2	216,5 ± 2,50*	86,75 ± 13,22 [#]	98,2 ± 8,84 [#]
Creatinina (mg/dL)	0,54 ± 0,04	0,61 ± 0,04	0,52 ± 0,02	0,54 ± 0,08	0,60 ± 0,11	0,54 ± 0,04
Sódio (mmol/L)	140,4 ± 0,51	139,25 ± 0,25	138,6 ± 0,68	140 ± 0,00	141 ± 2,08	142 ± 2,1
Potássio (mmol/L)	3,72 ± 0,17	3,5 ± 0,59	3,54 ± 0,23	3,5 ± 0,20	3,68 ± 0,18	3,86 ± 0,12
Cálcio (mmol/L)	1,12 ± 0,02	1,00 ± 0,10	1,08 ± 0,01	0,86 ± 0,26	0,88 ± 0,17	0,97 ± 0,09
Ferro (µg/dL)	223,2 ± 28,99	199,06 ± 55,48	193 ± 11,20	208,35 ± 19,75	246,95 ± 110,59	196,74 ± 22,30
Fósforo (mg/dL)	3,86 ± 0,31	5,24 ± 0,87 [#]	3,45 ± 0,30	3,66 ± 0,52	2,53 ± 0,35 [#]	3,79 ± 0,36
Magnésio (mg/dL)	1,37 ± 0,06	1,50 ± 0,13	1,30 ± 0,06	1,34 ± 0,07	1,38 ± 0,03	1,52 ± 0,06

Dados apresentados como Média ± Erro Padrão Médio, (n = 2 – 5), Teste de comparação múltipla de Dunnet em relação ao controle * p < 0.05 = significativo, ** p < 0.01 = muito significativo, *** p < 0.001 = extremamente significativo. Teste de comparação múltipla de Tukey, comparação de todos os parâmetros entre si [#] p < 0.05 = significativo, ^{##} p < 0.01 = muito significativo, ^{###} p < 0.001 = extremamente significativo.

Analisando o quadro 7, pode-se observar que, do mesmo modo que no experimento anterior, a glicemia do grupo aloxano é significativamente elevada em relação ao grupo controle. Também observou-se que, diferentemente dos resultados apresentados no tratamento por via oral, os valores de glicemia dos animais tratados com o polímero reticulado (insolúvel) e não a solúvel, retornaram aos valores normais (89,75 mg/dL), ou seja, se aproximaram ao grupo controle. Provavelmente, a via de administração do complexo quitosana-ferro através ração pode ter sido a causa dessa diferença na glicemia dos animais dos grupos tratados com quitosana solúvel e insolúvel. Os animais tratados com a QTS-S apresentaram resultados de glicemia melhores quando receberam o tratamento por via oral, enquanto que nos animais tratados com a QTS-I, a glicemia de foi melhor através da ração. Resultados significativamente baixos foram encontrados para os grupos tratados com sulfato ferroso e QTS-I quando relacionado com o grupo aloxano, provavelmente pelo mesmo motivo relatado anteriormente.

A avaliação da função renal dos animais foi determinada através da dosagem sérica de creatinina, eletrólitos, magnésio e fósforo. Desses parâmetros, o fósforo foi o único analito que apresentou alterações. Houve um aumento significativo deste analito no grupo aloxano quando comparado com o grupo controle. Este resultado foi importante, pois através dele conseguiu-se a confirmação do aumento de fosfato sérico com a metodologia padronizada (lesão renal e uso de água e ração contendo fosfato). Resultados semelhantes foram encontrados por Baxter e colaboradores (2000) em animais sadios tratados com ração contendo 1% de polímero com 0,054% de ferro. Vale lembrar que a concentração de polímero utilizado no presente estudo foi exatamente metade do polímero que o autor (Baxter) usou, ou seja, 0,5% de polímero com a mesma concentração de ferro (0,054%).

Outro resultado que se apresentou válido, foi a diminuição significativa de fosfato sérico nos animais tratados com quitosana reticulada em relação ao grupo aloxano. Também ocorreu uma diminuição do fósforo no soro dos animais tratados com QTS-S, porém esta diminuição não foi significativa. Esse dado mostra que o polímero foi efetivo como adsorvente de fosfato. A redução

da concentração do fósforo sérico dos ratos tratados com QTS-S e QTS-I foram de 31% e 52% quando comparado com o grupo aloxano. A redução é maior quando estes valores são comparados com aqueles obtidos por Baxter e colaboradores (2000), que foi de 25% para ratos tratados com ração contendo quitosana-ferro durante 30 dias.

Hsu e colaboradores (1999) relataram uma redução de aproximadamente 10% no fósforo sérico de ratos nefrectomizados, tratados durante 30 dias com ração contendo 1% de ferro, na forma de citrato de ferro e amônio, citrato de ferro e cloreto de ferro.

De acordo com o quadro 7, os valores de creatinina sérica dos animais tratados foram idênticos aos do grupo controle. Tais resultados indicam que a presença do polímero tanto solúvel quanto insolúvel não contribuiu na alteração desse parâmetro. Esperava-se que a creatinina dos animais do grupo aloxano estivesse aumentada, indicando uma alteração a nível renal, porém a presença da droga diabetogênica não modificou a concentração sérica deste analito. Este mesmo comportamento foi relatado por Baxter et al, 2000, para ratos normais, alimentados com ração contendo quitosana-ferro.

Os valores encontrados para as dosagens séricas dos eletrólitos: sódio, potássio e cálcio também não foram diferentes se comparados ao controle saudável. Estes analitos participam da homeostase e do funcionamento normal dos potenciais de membrana dos tecidos (HENRY, 1999), e provavelmente se mantiveram a níveis normais durante os experimentos com ração. Resultados diferentes foram apresentados no experimento anterior (tratamento via oral), quando os valores de sódio e potássio tiveram valores alterados em relação ao grupo controle, tal diferença pode estar relacionada com o tipo de tratamento, que pode ter alterado esta homeostase dos meios intra e extracelular.

Quando analisou-se os níveis séricos de ferro, observou-se, como no experimento anterior, que não houve diferença estatística entre os animais tratados e o grupo controle. Este resultado foi importante, pois demonstrou que a via administrada (através da ração) também não alterou estabilidade ao polímero. Resultados semelhantes foram observados por Bürger e colaboradores (2001) com a QTS-Fe(III) reticulada. Quando os valores de ferro

dos animais tratados com os polímeros são comparados com tratamentos envolvendo outros adsorventes, observa-se um comportamento distinto. Hsu; Patel; Young (1999) demonstraram um aumento de 66% do ferro no soro de ratos alimentados com ração contendo citrato de ferro durante 30 dias. Outros estudos relataram um aumento de aproximadamente 72% do ferro no soro dos ratos alimentados com ração contendo quitosana-ferro durante 30 dias (BAXTER et al, 2000).

Na análise do hemograma dos animais em estudo (quadro 8), procurou-se verificar quais os elementos sanguíneos que sofreriam alterações com a presença aloxano e o tratamento com o complexo QTS-S e QTS-I.

Avaliando a série vermelha dos animais tratados, observa-se que somente no índice eritrocítico VCM (Volume Corpuscular Médio) foram observados diferenças estatísticas entre os grupos testados. Os valores de VCM dos grupos QTS-I, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, Aloxano e QTS-S estão diminuídos significativamente em relação ao grupo controle. O VCM diz respeito a tamanho do eritrócito (FISCHBACH, 2002). Os hematócritos não diferenciaram-se entre os grupos normais, aloxano e os animais tratados com ração contendo ferro, diferente dos resultados relatados por Hsu; Patel; Young (1999) para ratos tratados com compostos de ferro, onde ocorreu um aumento do hematócrito dos animais.

Os resultados indicam que nestes grupos as hemácias apresentaram um tamanho menor do que nos animais do grupo controle. Parâmetro este, que pode estar relacionado com um quadro de anemia em humanos, porém em animais este resultado não tem indicações e literatura que informe sobre tal dado.

Os resultados de plaquetas também apresentaram diferença estatística quando comparou-se os grupos $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ e Fosfato. Os valores do primeiro grupo foram estatisticamente menores aos valores do segundo grupo. As plaquetas têm função de homeostase, manutenção da integridade vascular, e no processo de coagulação do sangue (HENRY, 1999). Valores aumentados de plaquetas são encontrados em doenças mieloproliferativas e trombocitoses reativas. Valores diminuídos são encontrados quando a produção plaquetária

está diminuída, na destruição periférica aumentada e uso de certas drogas (SOARES, *et al.*, 2002).

A contagem diferencial de célula refere-se à enumeração e classificação dos leucócitos encontrados no esfregaço sangüíneo. O estudo quantitativo de leucócitos inclui: medida da concentração total e contagem diferencial dos tipos de células brancas do sangue. Neste experimento observou-se um predomínio celular de linfócitos, nos grupos controle, aloxano e fosfato, ou seja, nos grupos que não receberam o polímero. Segundo Harkness; Wagner (1999), animais como ratos da raça *Wistar* possuem aproximadamente de 65 – 85% de linfócitos e 9 – 34% de neutrófilos em condições fisiológicas normais. Porém, nos ratos que receberam a QTS-S ou QTS-I, e o grupo que recebeu sulfato ferroso houve uma mudança da prevalência celular. Ocorreu um aumento dos valores de neutrófilos e conseqüentemente diminuição de linfócitos. Estes resultados reproduzem os valores encontrados por Valcarenghi (2006), quando houve uma mudança do perfil de leucócitos de linfócitos para neutrófilos em animais tratados com QTS-S.

QUADRO 8 – Determinação dos parâmetros hematológicos em ratos fêmeas tratados com ração durante o período de 30 dias.

PARÂMETROS ANALISADOS	CONTROLE	ALOXANO	FOSFATO	QTS-S	QTS-I	Fe ₂ (SO ₄) ₃
Leucócitos(10 ² /μL)	2,26 ± 0,36	3,08 ± 0,58	1,9 ± 0,42	1,57 ± 0,32	2,17 ± 0,34	2,22 ± 0,90
Hemácias (10 ⁴ /mm ³)	8,18 ± 0,03	7,86 ± 0,34	8,3 ± 0,24	8,8 ± 0,34	7,47 ± 0,73	8,12 ± 0,06
Hemoglobina (g/dL)	15,28 ± 0,31	14,42 ± 0,54	15,64 ± 0,30	15,6 ± 0,42	14,2 ± 0,74	14,72 ± 0,31
Hematócrito (%)	46,36 ± 0,54	42,2 ± 1,89	46,74 ± 0,94	47,07 ± 1,91	43,98 ± 0,74	43,98 ± 0,60
VCM (fL)	56,68 ± 0,53	53,6 ± 0,69**	56,34 ± 0,57	53,5 ± 0,23*	53,52 ± 0,95**	54,18 ± 0,33*
HCM (pg)	18,64 ± 0,35	18,36 ± 0,27	18,86 ± 0,49	17,7 ± 0,23	17,55 ± 0,59	18,12 ± 0,30
CHCM (g/dL)	32,92 ± 0,44	32,24 ± 0,44	33,48 ± 0,58	33,1 ± 0,51	32,8 ± 0,66	33,5 ± 0,56
Plaquetas (10 ³ /μL)	810,8 ± 28,44	776,2 ± 60,53	949,6 ± 25,87 [#]	818,33 ± 51,24	779,5 ± 49,96	743,75 ± 44,78 [#]
Neutrófilos (%)	19,96 ± 1,95	17,84 ± 3,84	32,7 ± 4,76	41,57 ± 5,64*	34,45 ± 5,22	40,1 ± 3,87*
Linfócitos (%)	74 ± 2,66	76,96 ± 3,76	62,68 ± 4,83	48,47 ± 8,39**	62,62 ± 4,75	53,9 ± 4,13*
Eosinófilos (%)	4,02 ± 1,36	0,98 ± 0,30	2,56 ± 0,38	3,0 ± 0,30	1,42 ± 0,42	2,5 ± 0,35
Basófilos (%)	1,68 ± 0,22	1,44 ± 0,34	1,48 ± 0,14	2,23 ± 0,90	0,85 ± 0,34	0,85 ± 0,12
Monócitos (%)	0,34 ± 0,07	2,78 ± 2,13	0,58 ± 0,31	4,73 ± 4,14	0,68 ± 0,21	2,62 ± 2,26

¹Dados apresentados como Média ± Erro Padrão Médio, (n = 3 – 5), Teste de comparação múltipla de Dunnet em relação ao controle * p < 0.05 = significativo, ** p < 0.01 = muito significativo, *** p < 0.001 = extremamente significativo. Teste de comparação múltipla de Tukey, comparação de todos os parâmetros entre si [#] p < 0.05 = significativo, ^{##} p < 0.01 = muito significativo, ^{###} p < 0.001 = extremamente significativo.

5.4 Tratamento com QTS-Ferro (III) através de Ração em ratos fêmeas e machos durante 15 dias

Neste experimento trabalhou-se com apenas cinco grupos de animais fêmeas e quatro grupos de machos, todos receberam aloxano, com exceção dos grupos controle. O tratamento com a ração contendo o polímero teve duração de 15 dias. O intuito deste experimento foi analisar se o tempo de tratamento estaria afetando os resultados de fôstato sérico, ou se a efetividade do polímero pode ser vista em menos tempo de tratamento. Neste experimento procurou-se verificar também, se o sexo dos animais poderia modificar os resultados encontrados na utilização do polímero. No grupo de machos foi testado somente o polímero insolúvel, pois observou-se nos outros experimentos que a quitona-ferro (III) solúvel somente foi efetiva quando administrada por via oral através de gavagem.

A figura 7 mostra a variação de peso corporal respectivamente de fêmeas e machos durante os 15 dias de tratamento. Como pôde-se observar, houve aumento de peso da maioria dos grupos tratados. Este resultado demonstra que o tratamento com o complexo QTS-Fe(III) não alterou este parâmetro, reproduzindo os mesmos resultados dos experimentos anteriores.

A avaliação do peso corporal é de extrema importância neste caso, porque pacientes com insuficiência renal são pacientes que requerem uma atenção especial em relação à ingestão de alimentos. Segundo a Sociedade Brasileira de Nefrologia, a ingestão de proteínas deve ser no máximo 0,65 g/kg/dia, que restringe muito a ingestão de calorias.

Como a quitosana-ferro (III) não promoveu alteração de peso corporal, isso significa que o quelante não interfere na absorção de nutrientes. Se o peso corporal tivesse diminuído, provavelmente este paciente poderia entrar em um quadro de subnutrição, o que poderia agravar ainda mais o seu estado.

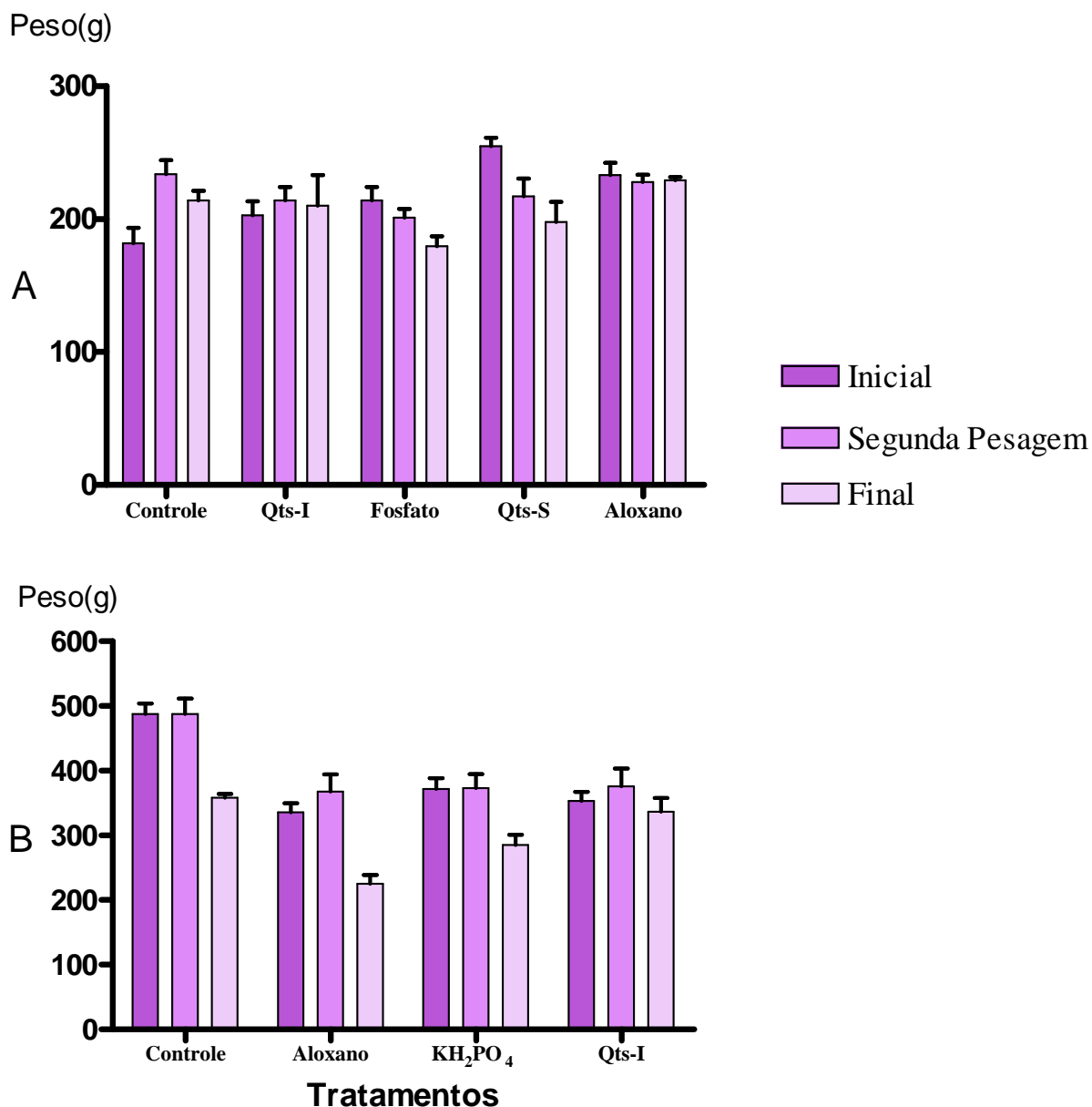


Figura 7: Efeito do tratamento com o complexo quitosana-ferro sobre a variação do peso corporal dos animais fêmeas (A) e machos (B) tratados durante 15 dias. Cada coluna representa a média dos pesos dos animais, no início até o final do tratamento, comparados com o grupo controle, e as barras os respectivos EPMS. empregando-se a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunnet em relação ao controle * $p < 0.05$ = significativo, ** $p < 0.01$ = muito significativo, *** $p < 0.001$ = extremamente significativo (fêmeas – $n = 2 - 6$, machos – $n = 4 - 9$).

As figuras 8 e 9 mostram a diferença de peso relativo dos órgãos dos animais durante o tratamento.

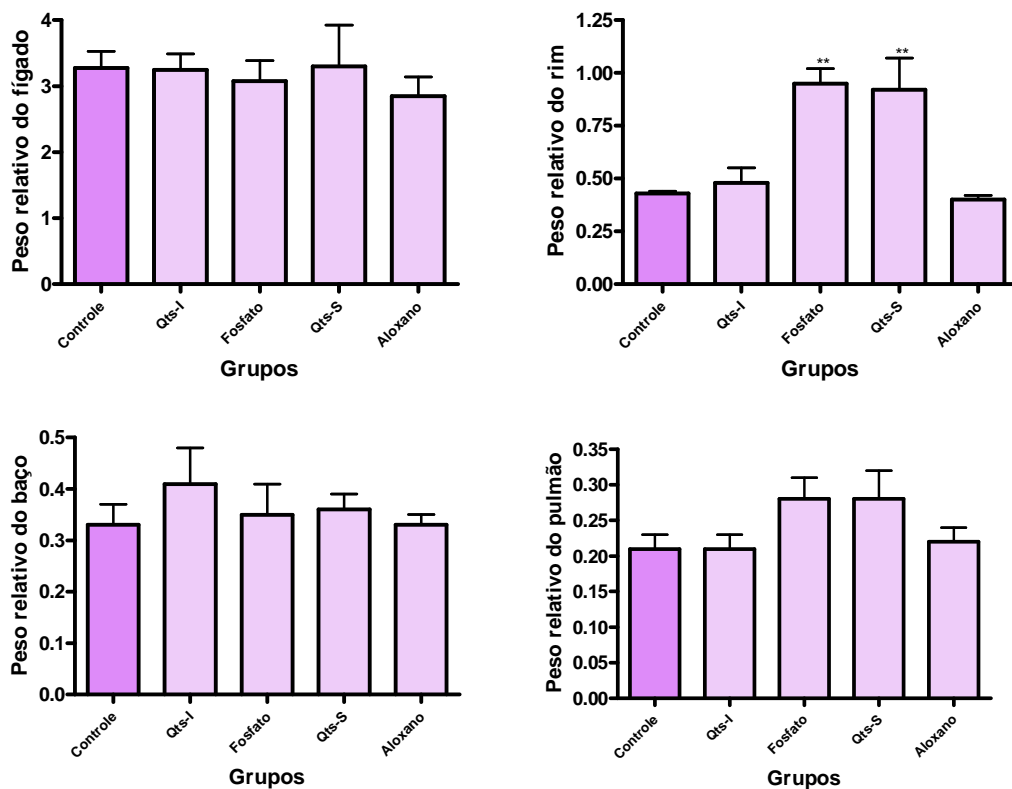


Figura 8: Efeito do tratamento com o complexo quitosana-ferro sobre o peso relativo dos órgãos de fêmeas tratadas durante 15 dias. Cada gráfico se refere a um órgão e cada coluna representa a média do peso do órgão e as baixas os respectivos EPMS. Os asteriscos indicam as diferenças significativas em relação ao grupo controle, empregando-se a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunnet em relação ao controle * $p < 0.05$ = significativo, ** $p < 0.01$ = muito significativo, *** $p < 0.001$ = extremamente significativo (fêmeas – $n = 2 - 6$).

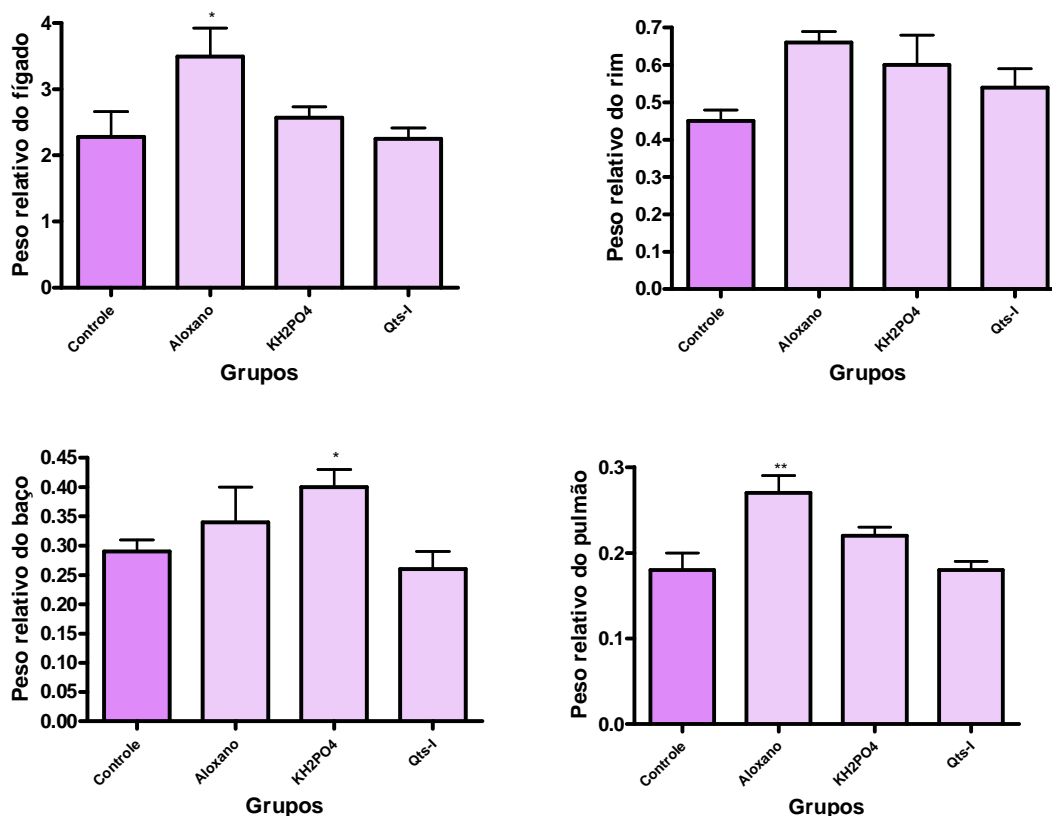


Figura 9: Efeito do tratamento com o complexo quitosana-ferro sobre o peso relativo dos órgãos de machos durante 15 dias. Cada gráfico se refere a um órgão e cada coluna representa a média do peso do órgão e as baixas os respectivos EPMS. Os asteriscos indicam as diferenças significativas em relação ao grupo controle, empregando-se a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunnet em relação ao controle * $p < 0.05$ = significativo, ** $p < 0.01$ = muito significativo, *** $p < 0.001$ = extremamente significativo (machos – $n = 4 - 9$).

Como pôde-se observar, o único órgão no grupo de fêmeas que apresentou diferença significativa de peso relativo foi o rim, onde os grupos QTS-S e fosfato apresentaram órgãos significativamente maiores do que o grupo controle. Este resultado também pode indicar a presença de lesão renal nos animais, já que o grupo fosfato não recebeu tratamento de quelante de fosfato, e o polímero solúvel não foi efetivo em adsorver o fosfato. Vale ressaltar que o aumento do peso relativo do rim ocorreu apenas nos animais que receberam fosfato além da água, também na ração. O grupo aloxano recebeu água e ração normais, o que nos permite sugerir que o fosfato realmente tem um papel importante na lesão e deteriorização da função renal associado ao aloxano. Já no tratamento com ratos machos, outros órgãos

apresentaram diferença. Com relação ao peso do fígado do grupo que recebeu aloxano, estes tiveram peso mais elevado estatisticamente quando relacionado ao grupo controle e também quando comparado com o grupo QTS-I. O baço dos animais tratados com fósforo também apresentou diferença estatística em relação ao grupo QTS-I. O peso dos pulmões foi diferente quando comparou-se os grupos aloxano e controle, e, comparando-se os grupos aloxano e QTS-I, sendo o grupo que o aloxano resultados de peso relativo elevado nos dois casos. Estes resultados confirmam a presença de alteração em diferentes órgãos dos animais. Observou-se também que o grupo que recebeu o tratamento com o polímero insolúvel (em machos) apresentou resultados de peso relativo dos órgãos similares aos valores encontrados para o grupo controle, mostrando que o uso da quitosana insolúvel não alterou esse parâmetro.

Os quadros 9 e 10 apresentaram os resultados referentes aos níveis de fósforo dos órgãos nos grupos em estudo. No tratamento com fêmeas, com exceção do fígado, todos os órgãos apresentaram valores similares entre os grupos controles do experimento anterior. No fígado dos animais tratados com QTS-I e QTS-S apresentaram valores similarmente aumentados, como observados no grupo controle. Já nos animais machos, os valores de fósforo no fígado apresentaram-se mais elevados no grupo controle do que nos outros grupos.

QUADRO 9: Determinação de fósforo (mg/g) nos órgãos de ratos fêmeas tratados com ração durante 15 dias.

ÓRGÃOS	Controle	Aloxano	Fosfato	QTS-I	QTS-S
Fígado	13,6	6,96	8,8	11,7	11,9
Rim	5,43	3,34	7,59	5,34	7,77
Baço	3,22	3,08	5,42	3,13	3,23
Pulmão	1,62	1,51	2,31	2,25	1,89

QUADRO 10: Determinação de fósforo (mg/g) nos órgãos dos ratos machos tratados com ração durante 15 dias.

ÓRGÃOS	Controle	Aloxano	Fosfato	QTS-I
Fígado	7,51	5,79	4,84	4,17
Rim	5,13	4,44	8,34	6,63
Baço	3,57	3,42	5,1	3,88
Pulmão	1,51	0,97	0,79	0,73

Observa-se que os valores encontrados para o rim, são todos elevados, exceto do grupo aloxano para ambos os animais (machos e fêmeas), não reproduzindo os resultados encontrados no experimento anterior (30 dias). Quando analisou-se o peso do baço de ambos os sexos, observou-se que os valores de fósforo foram idênticos entre os grupos, com exceção do grupo fosfato, que apresentou valores mais elevados. No pulmão, os resultados foram similares entre os grupos.

Os quadros 11 e 12 trazem os resultados de ferro nos órgãos dos animais fêmeas e machos tratados com o polímero.

QUADRO 11: Determinação de ferro ($\mu\text{g/g}$) nos órgãos de ratos fêmeas tratados com ração durante 15 dias.

ÓRGÃOS	Controle	Aloxano	Fosfato	QTS-I	QTS-S
Fígado	523,9	648	432,8	237,8	370,8
Rim	93,96	133,8	261,6	148,7	233,8
Baço	1964,2	2019,8	1989,2	1963,4	1765,9
Pulmão	8,11	12,8	6,76	10,14	7,44

QUADRO 12: Determinação de ferro ($\mu\text{g/g}$) nos órgãos dos ratos machos tratados com ração durante 15 dias.

ÓRGÃOS	Controle	Aloxano	Fosfato	QTS-I
Fígado	394,7	157,9	320,3	488,8
Rim	128,4	134,5	225,8	85,2
Baço	797,7	963,3	1325,6	1255
Pulmão	9,7	10,0	16,4	13,53

Quando analisou-se o fígado dos animais, observou-se que os níveis de ferro estavam elevados para o grupo QTS-I dos machos, porém para fêmeas os níveis encontraram-se diminuídos em relação ao grupo controle. Já no rim, os níveis de ferro foram mais elevados no grupo QTS-I das fêmeas e diminuídos para os machos quando comparados com o grupo controle. No baço das fêmeas encontrou-se valores de ferro mais elevados que os machos. E, por último, no pulmão os níveis de ferro encontraram-se diminuídos em todos os grupos tratados e em ambos os sexos.

Os valores encontrados para as dosagens séricas dos animais estão representados nos quadros 13 e 14.

QUADRO 13 – Determinação sérica dos parâmetros bioquímicos de ratos fêmeas tratados com ração durante 15 dias.

PARÂMETROS ANALISADOS	CONTROLE	ALOXANO	QTS-I	FOSFATO	QTS-S
Glicose (mg/dL)	87,58 ± 12,40	153,4 ± 19,62	208,2 ± 63,24	164,83 ± 52,48	231,6 ± 81,78
Creatinina (mg/dL)	0,52 ± 0,02	0,66 ± 0,07	0,49 ± 0,02	0,52 ± 0,07	0,49 ± 0,02
Sódio (mmol/L)	141 ± 0,41	143,6 ± 1,57	140 ± 2,41	139,6 ± 2,04	140 ± 1,22
Potássio (mmol/L)	3,62 ± 0,13	3,36 ± 0,06	3,52 ± 0,23	4,42 ± 0,16	4,02 ± 0,52
Cálcio (mmol/L)	0,99 ± 0,02	1,24 ± 0,05	1,00 ± 0,03 ^{##}	0,67 ± 0,05 ^{##}	0,81 ± 0,13
Ferro (µg/dL)	224,4 ± 45,20	133,16 ± 2,83	163,14 ± 10,13	165,1 ± 30,50	199,08 ± 45,40
Fosfato (mg/dL)	3,88 ± 0,16	3,7 ± 0,44	4,12 ± 0,30	6,72 ± 0,72 ^{**}	5,79 ± 0,69
Magnésio (mg/dL)	2,55 ± 0,16	2,82 ± 0,17	2,72 ± 0,02	3,49 ± 0,18 [*]	3,18 ± 0,30

Dados apresentados como Média ± Erro Padrão Médio, (n = 2 – 6), Teste de comparação múltipla de Dunnet em relação ao controle * p < 0.05 = significativo, ** p < 0.01 = muito significativo, *** p < 0.001 = extremamente significativo. Teste de comparação múltipla de Tukey, comparação de todos os parâmetros entre si # p < 0.05 = significativo, ## p < 0.01 = muito significativo, ### p < 0.001 = extremamente significativo.

QUADRO 14 – Determinação sérica dos parâmetros bioquímicos de ratos machos tratados com ração durante 15 dias

PARÂMETROS ANALISADOS	CONTROLE	ALOXANO	FOSFATO	QTS-I
Glicose (mg/dL)	106,02 ± 7,31	297,74 ± 50,63*	160,02 ± 34,38	248,04 ± 46,16
Creatinina (mg/dL)	0,36 ± 0,19	0,35 ± 0,04	0,41 ± 0,04	0,38 ± 0,04
Sódio (mmol/L)	135,75 ± 0,48	132,4 ± 1,36	135,33 ± 1,50	133,71 ± 1,21
Potássio (mmol/L)	3,72 ± 0,06	4,66 ± 0,53 [#]	3,53 ± 0,09 [#]	4,08 ± 0,23
Cálcio (mmol/L)	0,81 ± 0,02	0,58 ± 0,08* ^{##}	0,83 ± 0,02 ^{##}	0,87 ± 0,05 ^{##}
Ferro (µg/dL)	216 ± 8,85	166,8 ± 12,35	186 ± 7,88	249 ± 5,81
Fosfato (mg/dL)	3,82 ± 0,20	5,86 ± 0,87*	5,62 ± 0,20*	4,50 ± 0,18
Magnésio (mg/dL)	2,24 ± 0,27	2,04 ± 0,18	2,65 ± 0,24	2,67 ± 0,23

Dados apresentados como Média ± Erro Padrão Médio, (n = 4 – 9), Teste de comparação múltipla de Dunnet em relação ao controle * p < 0.05 = significativo, ** p < 0.01 = muito significativo, *** p < 0.001 = extremamente significativo. Teste de comparação múltipla de Tukey, comparação de todos os parâmetros entre si [#] p < 0.05 = significativo, ^{##} p < 0.01 = muito significativo, ^{###} p < 0.001 = extremamente significativo.

Analisando os resultados de glicemia do grupo de fêmeas, observou-se diferenças, porém não significativa entre os grupos que receberam aloxano e o grupo controle. Houve um aumento da glicemia dos animais que receberam a droga diabetogênica. Já os valores de glicose sérica dos grupos de machos apresentaram-se significativamente elevados nos animais que receberam aloxano em relação ao grupo controle. Porém, é perceptível a diferença nos dois experimentos entre os grupos tratados e não tratados com a droga diabetogênica e isso se deve a presença da mesma (aloxano), substância que pode envolver esta condição patológica ou de sobrecarga ao sistema regulatório, resultando neste desequilíbrio e levando à hiperglicemia (SOARES, et al., 2002), resultado caracterizado em todos os tratamentos realizados.

A avaliação da função renal dos animais tratados foi determinada através da dosagem sérica de fosfato, já que os rins estão intimamente envolvidos na homeostase do fósforo (HENRY, 1999). Os resultados obtidos com o tratamento, de acordo com os quadros 13 e 14, demonstram que a concentração sanguínea de fósforo do grupo tratado com o polímero insolúvel, se aproximou aos valores do grupo controle, sendo que este grupo foi estatisticamente diferente ao grupo tratado com fosfato nas fêmeas e aos grupos fosfato e aloxano nos machos. Esse dado mostra que o polímero foi efetivo como adsorvente de fosfato, reproduzindo os resultados encontrados nos dois experimentos anteriores e, nesse caso, em menor tempo. O polímero na forma insolúvel diminuiu 38,69% e 19,9% do fosfato sérico (em relação ao grupo fosfato) em ratos fêmeas e machos respectivamente, durante 15 dias de tratamento. Em estudos anteriores, onde foi realizada uma comparação entre o hidróxido de alumínio e o hidrocloreto de sevelamer, em pacientes adultos que se submeteram à diálise peritoneal, foi verificado que após oito semanas de tratamento, o fosfato sérico diminuiu 16% no grupo que recebeu o sevelamer e 17,5% no grupo que recebeu o hidróxido de alumínio (KATOPODIS et al, 2006). Esse dado nos mostra que o tratamento para a hiperfosfatemia, quando realizado com o complexo quitosana-ferro (III) insolúvel, é tão eficiente quanto os tratamentos convencionais, não apresentando os efeitos colaterais destes, além de ser efetivo num período de tempo menor.

Também, como no experimento anterior, não encontrou-se resultados significativos com o polímero solúvel no tratamento com ração. Vale lembrar que a QTS-S foi efetiva no tratamento via gavagem oral, onde o complexo é levado diretamente ao estômago do animal, o que nos leva a pensar que na passagem do polímero solúvel pelo esôfago do rato, este possa sofrer alguma interação, já que apresenta uma certa solubilidade em água, perdendo assim a sua estabilidade, e conseqüentemente o efeito adsorvente.

Também foram dosados os eletrólitos: sódio, potássio, e cálcio. Os resultados encontrados com relação aos níveis sódio e potássio nos animais tratados não diferiram estatisticamente dos animais controle. Os níveis séricos de sódio dos animais tratados foram diminuídos quando comparados com os animais controle, esta diferença pode ser resultado da presença do aloxano, que pode ter afetado os eventos metabólicos e ainda os potenciais de membrana dos tecidos nervoso e muscular, que são regulados pelas diferenças de concentração entre esses eletrólitos do meio intra e extracelular (HENRY, 1999).

Os níveis séricos de cálcio dos animais tratados com QTS-I no tratamento com as fêmeas foram mais elevados quando comparados com o grupo fosfato. Há uma relação inversa entre cálcio e fósforo, ou seja, a diminuição de fósforo pode levar ao aumento dos níveis de cálcio (WALLACH, 2003) e essa relação inversa foi encontrada neste experimento. Resultados diferentes foram encontrados no grupo de machos, onde o grupo QTS-I foi idêntico ao grupo fosfato e, os dois foram elevado estatisticamente quando comparados com o grupo aloxano, mostrando que algumas diferença são encontradas entre machos e fêmeas no tratamento com o polímero.

Quando analisou-se os níveis séricos de ferro, observou-se que não houve diferença estatística entre os animais tratados quando comparados ao grupo controle. Estes experimentos reproduziram resultados obtidos com os dois experimentos anteriores e também foram observados por Bürger e colaboradores (2001) com a QTS-Fe(III) reticulada.

Diferentemente dos outros tratamentos, os níveis séricos de magnésio dos animais do grupo fosfato mostraram-se significativamente aumentados em relação ao grupo controle, no tratamento com ratos fêmeas. Tal resultado não

foi obtido no grupo de machos. O aumento dos níveis séricos de magnésio podem ocorrer na insuficiência renal (HENRY, 1999).

Quando avaliou-se o hemograma dos animais em estudo (quadros 15 e 16), procurou-se analisar quais os elementos sanguíneos que sofreram alterações devido a presença da lesão renal e o tratamento com o complexo quitosana-ferro.

QUADRO 15 – Determinação dos parâmetros hematológicos em ratos fêmeas tratados com ração durante 15 dias.

PARÂMETROS ANALISADOS	CONTROLE	ALOXANO	QTS-I	FOSFATO	QTS-S
Leucócitos ($10^2/\mu\text{L}$)	0,85 ± 64,55	2,82 ± 0,42	0,94 ± 172,05	1,55 ± 368,56	1,36 ± 235,80
Hemácias ($10^4/\text{mm}^3$)	8,02 ± 0,17	7,29 ± 0,21	8,08 ± 0,26	9,13 ± 0,20**	8,64 ± 0,20
Hemoglobina (g/dL)	14,78 ± 0,35	13,64 ± 0,16	14,76 ± 0,42	16,3 ± 0,33*	15,42 ± 0,39
Hematócrito (%)	44,35 ± 1,23	38,86 ± ,76*	44,16 ± 1,60	50,55 ± 0,93**	49,04 ± 1,34
VCM (fL)	55,28 ± 0,79	53,38 ± 0,72	54,66 ± 0,76	55,37 ± 0,55	56,76 ± 0,49
HCM (pg)	18,42 ± 0,27	18,82 ± 0,52	18,3 ± 0,22	17,83 ± 0,20	17,88 ± 0,18
CHCM (g/DI)	33,32 ± 0,26	35,2 ± 0,68*	33,48 ± 0,33	32,22 ± 0,24	31,48 ± 0,25*
Plaquetas ($10^3 /\mu\text{L}$)	867,5 ± 32,88	755,2 ± 56,19	703,2 ± 39,74	712,5 ± 53,54	713,2 ± 75,78
Neutrófilos (%)	14,15 ± 7,78	30,67 ± 3,42	21,12 ± 0,28	40,53 ± 17,15	43,42 ± 13,24
Linfócitos (%)	67,4 ± 3,20	64,98 ± 3,35	64,1 ± 4,13	44,5 ± 12,49	42,5 ± 13,65
Eosinófilos (%)	1,95 ± 0,76	1,72 ± 0,28	2,32 ± 0,46 [#]	0,80 ± 0,31	0,40 ± 0,16 [#]
Basófilos (%)	8,42 ± 4,21	2,18 ± 0,24	5,66 ± 3,01	2,88 ± 1,85	11,46 ± 10,18
Monócitos (%)	8,05 ± 2,99	0,48 ± 0,14	6,8 ± 4,23	11,3 ± 7,42	2,2 ± 1,88

Dados apresentados como Média ± Erro Padrão Médio, (n = 4 – 6), Teste de comparação múltipla de Dunnet em relação ao controle * p < 0.05 = significativo, ** p < 0.01 = muito significativo, *** p < 0.001 = extremamente significativo. Teste de comparação múltipla de Tukey, comparação de todos os parâmetros entre si [#] p < 0.05 = significativo, ^{##} p < 0.01 = muito significativo, ^{###} p < 0.001 = extremamente significativo.

QUADRO16 – Determinação dos parâmetros hematológicos em ratos machos tratados com ração durante 15 dias.

PARÂMETROS ANALISADOS	CONTROLE	ALOXANO	FOSFATO	QTS-I
Leucócitos ($10^2/\mu\text{L}$)	4,65 ± 0,43	2,16 ± 0,37	3,44 ± 0,41	4,05 ± 0,91
Hemácias ($10^4/\text{mm}^3$)	8,67 ± 0,16	9,11 ± 0,19	8,57 ± 0,14	9,08 ± 0,24
Hemoglobina (g/dL)	15,52 ± 0,33	16,3 ± 0,28	15,29 ± 0,23	16,18 ± 0,36
Hematócrito (%)	46,28 ± 0,65	48,9 ± 0,98 [#]	45,44 ± 0,63 [#]	47,9 ± 1,16
VCM (fL)	53,45 ± 0,61	53,66 ± 0,60	53,04 ± 0,43	52,78 ± 0,29
HCM (pg)	17,9 ± 0,20	17,88 ± 0,20	17,88 ± 0,34	17,87 ± 0,22
CHCM (g/dL)	33,52 ± 0,31	30,16 ± 3,08	33,68 ± 0,46	33,85 ± 0,34
Plaquetas ($10^3 /\mu\text{L}$)	725,75 ± 10,20	561,6 ± 78,23 [#]	774,0 ± 40,31 [#]	748,0 ± 49,20
Neutrófilos (%)	29,4 ± 2,59	53,02 ± 13,07	33,6 ± 4,10	46,05 ± 9,44
Linfócitos (%)	66,38 ± 2,51	43,66 ± 12,07	63,6 ± 3,75	51,73 ± 8,78
Eosinófilos (%)	2,80 ± 0,21	0,74 ± 0,47 [*]	1,66 ± 0,31	1,23 ± 0,46
Basófilos (%)	1,20 ± 0,19	2,22 ± 0,92	0,92 ± 0,22	0,75 ± 0,22
Monócitos (%)	0,17 ± 0,08	0,36 ± 0,19	0,18 ± 0,04	0,23 ± 0,09

Dados apresentados como Média ± Erro Padrão Médio, (n = 4 – 9), Teste de comparação múltipla de Dunnet em relação ao controle * p < 0.05 = significativo, ** p < 0.01 = muito significativo, *** p < 0.001 = extremamente significativo. Teste de comparação múltipla de Tukey, comparação de todos os parâmetros entre si [#] p < 0.05 = significativo, ^{##} p < 0.01 = muito significativo, ^{###} p < 0.001 = extremamente significativo.

Na avaliação da série eritrocítica das fêmeas, alguns componentes apresentaram significância estatística nos animais tratados em relação ao controle. A quantidade total de hemácia (RBC), a hemoglobina (HB), o hematócrito (HTO) do grupo fosfato foram significativamente elevados quando comparados com o grupo controle. O grupo aloxano apresentou valores diminuídos de HTO em relação ao grupo controle e CHCM elevado em relação ao grupo controle. As células vermelhas, através da hemoglobina, têm como função o transporte do oxigênio para os tecidos, e a sua diminuição ou deficiência, quase sempre, se traduz por anemia (GUIMARÃES, et al., 1990). Este quadro de anemia constitui uma condição comum, associados freqüentemente a complicações de outras doenças. (HENRY, 1999). Porém, no caso de ratos, não se pode afirmar tal indício, pois os valores de referência são diferentes daqueles encontrados para humanos. Para o restante dos elementos da série vermelha, ou seja: hemácias, hematócrito, VCM, HCM, não foram encontradas diferenças estatísticas nos animais tratados com relação ao grupo controle. Porém, quando analisou-se a série vermelha dos ratos machos, apenas com o hematócrito observou-se alterações entre os grupos tratados, onde o grupo fosfato apresentou valores menores significativamente quando relacionados com o grupo aloxano. Estes resultados demonstram há diferenças entre machos e fêmeas, onde as fêmeas apresentam mais alterações que os machos.

O único elemento da série leucocitária em que foi observado estatisticamente significativo em ambos os dois sexos, foi o eosinófilo. No tratamento com fêmeas o grupo de animais tratados com QTS-S apresentou um percentual significativamente menor do que os resultados observados para grupo QTS-I. Já no tratamento com machos, a diferença foi entre os grupos aloxano e controle. Segundo Wallach (2003), níveis elevados de eosinófilos são verificados em doenças alérgicas provocadas pela terapia com drogas, infestações parasitárias, envenenamento por fósforo, ou sensibilidade às drogas. Neste caso, a diferença de solubilidade do polímero pode ser a provável explicação para a não efetividade da quitosana-solúvel em retirar o fósforo sérico, e, por isso, a elevação deste parâmetro hematológico.

Com o restante da série branca não houve diferença estatística entre os grupos testados.

Ainda, encontraram-se diferenças estatísticas no número de plaquetas dos animais machos entre os grupos fosfato e aloxano. O grupo fosfato apresentou valores mais elevados que o grupo aloxano. As plaquetas têm função de homeostase, manutenção da integridade vascular, e no processo de coagulação do sangue (HENRY, 1999). Valores aumentados de plaquetas são encontrados em doenças mieloproliferativas e trombocitoses reativas. Valores diminuídos são encontrados quando a produção plaquetária está diminuída, na destruição periférica aumentada e uso de certas drogas (SOARES, *et al.*, 2002).

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir dos resultados obtidos no presente estudo pode-se tirar as seguintes conclusões:

A droga diabetogênica (aloxano) utilizada nos experimentos, juntamente com o fosfato via oral (água e ração), aumentou os níveis séricos de fosfato na maioria dos todos os grupos tratados.

O complexo quitosana-ferro(III) tanto solúvel como insolúvel foi efetivo em adsorver o fosfato quando administrados no tratamento via oral.

No tratamento através de ração, apenas o polímero insolúvel apresentou efetividade tanto no tratamento de 30 dias como no de 15 dias.

O sexo dos animais não proporcionou alterações muito pronunciadas no presente estudo.

Os resultados dos níveis de ferro sérico demonstraram a estabilidade do polímero, não liberando o ferro para a circulação.

O hemograma dos animais tratados não sofreu alterações significativas quando comparados com o grupo controle.

Os animais não sofreram variações de peso significativas durante o tratamento com a quitosana.

O peso relativos de alguns órgãos dos animais sofreu alteração durante o tratamento com os polímeros.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOT HEMATOLOGIA CD 3000 CS/SL. Manual resumido do operador.

ALBAAJ F., HUTCHISON A. J. Hiperphosphatemia in Renal Failure. Drugs., [s.l.], v. 63, n. 6, p. 577-596, 2003.

ALFREY A.C.; DE GOES J.J.; NOLAN R. Aluminum and lead absorption from dietary sources in women ingesting calcium citrate. South Med. v.87, n.8, p. 894, 1994.

ALONSO, C. G.; GARCÍA, M. R.; CANNATA, J. B.. Metabolismo del calcio, del fósforo y del magnesio. SECCIÓN I: ESTRUCTURA Y REGULACIÓN DEL HUESO. p. 7 – 12, 2002. Disponível na página:
<http://departamentos.unican.es/med&psiq/MI/Capitulo%2002.pdf>.

BAXTER, J. *et al.* Effect of iron (III) chitosan on the reduction of serum phosphorus in rats. J. Pharm. Pharmacol. v.52, p.863-874, 2000.

BELLASI, A.; KOOIENGA, L.; BLOCK, G. A. Phosphate binders: new products and challenges. Hemodialysis International. 10:225-234, 2006.

BLACHER, J. *et al.* Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. American Heart Association. 38:938, 2001.

BLEYER, J. Phosphate binder usage in kidney failure patients. Expert Opinions. v. 4, n.6, p. 941 – 947, 2003.

BLOCK, G.A *et al.* Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study. Am. J. Kidney Dis. 31:607-617, 1998.

BLOCK, G.A.; PORT, F. K. Re-evaluation of risks associated with hyperphosphatemia and hyperparathyroidism in dialysis patients:

recommendations for a change in management. Am. J. Kidney Dis. 35:1226-1237, 2000.

BRAUN, J. *et al.* Electron beam computed tomography in the evaluation of cardiac calcifications in chronic patients. Am. J. Kidney Dis. 27:394-401, 1996.

BÜRGER, C. *et al.* Cross-linking chitosan-Fe (III), an oral phosphate binder: studies *in vitro* e *in vivo*. Int. J. Pharmac., 2001.

BURKE S. K., SLATOPOLSKY E. A., GOLDBERG D. I. Renagel®, a novel calcium - and aluminium free phosphate binder, inhibits phosphate absorption in normal volunteers. *Nephrol DL Transplant.* 1997;12:1640-1644.

BURROWS-HUDSON, S. Chronic kidney disease: an overview. American Journal of Nursing: vol.105, n.2, February, p. 40-49, 2005. Disponível na página:

<http://www.nursingcenter.com>

BURTIS, C.; ASHWOOD, E. Tietz: Fundamentos de Química Analítica. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 4^a ed., p. 381-383, 1998.

CALVO M.S., PARK Y. K. Changing phosphorus content of the U.S. diet: Potential for adverse effects on bone, J. Nutr., 126: 1168 -1180, 1996.

CHAMPE, P.; HARVEY, P. C.; RICHARD, A Bioquímica Ilustrada. 2^a ed., Porto Alegre: Artes médicas, 1996.

CHERTOW G. M., BURKE S. K., LAZARUS J. M., *et al.* Polyallylamine hydrochloride (Renagel®): a noncalcemic phosphate binder for the treatment of hiperfosfatemia in chronic renal failure. Am J Kidney Dis. 29:66-71;1997.

CHUAN-ANUSORN, W. The effect of prolonged iron loading on the chemical form of iron oxide deposits in rat liver and spleen. Biochimica et Biophysica Acta. V. 1454, p. 191 - 200, 1999.

CLAEYS, D. *et al.* Haemochromatosis mutations and ferritin myocardial infarction: a case-control study. Eur. J. Clin. Invest. (suppl. 1), p.3-8, 2002.

CREATININA. Responsável técnico: Viviana E. Cétola. Rosário: Wiener, 2000. Kit Laboratorial.

CUPPARI, L. Suplementação de fósforo em pacientes com insuficiência renal crônica leve e moderada com diagnóstico sugestivo ou comprovado de doença óssea adinâmica. Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do título de doutor em nutrição. São Paulo, 1998.

DELMEZ, J. A.; SLATOPOLSKY E. Hyperphosphatemia: its consequences and treatment in patients with chronic renal disease. Am. J. Kidney Dis. 19: 303-317, 1992.

DRÜKE, T. B. *et al.* Effect of aluminum on hematopoiesis. Kidney Int. [s.1], p.29-45, 1986.

FAGUNDES, T. *et al.* Phosphate adsorption on chitosan-Fe (III)-crosslinking: batch and column studies. J. Liq. Chrom. Rel. Technol. v. 24, n.8, p.1189-1199, 2001.

FERRO. Responsável técnico: Ana Marta de Araújo Ferreira. Barcelona: Biosystems S. A., 2002. Kit Laboratorial.

FERRO Sérico. Responsable técnico: Neucilene Gomes da Silva. Lagoa Santa: Labtest Diagnóstica, 2003. Kit Laboratorial.

FISCHBACH, F. Manual de Enfermagem: Exames Laboratoriais e Diagnósticos. 6ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

FÓSFORO. Responsável técnico: Viviana E. Cétola. Rosário: Wiener, 2000. Kit Laboratorial.

FÓSFORO. Responsable técnico: Homero J. J. Lopes. Belo Horizonte: Analisa Diagnóstica, 2002. Kit Laboratorial.

GARCIA, A. A highly sensitive, simple determination of serum iron using chrommazuroil B. *Clin Chin Acta*; 94: 115-119, 1979.

GLICOSE. Responsável técnico: Vera Lúcia Alves Janoni. Alemanha: Dyasis Diagnostics Systems International, 2004. Kit Laboratorial.

GOODMAN, W.G. *et al.* Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N. Engl. J. Med.* 342: 1478-1483, 2000.

GRANKVIST, K. *et al.* Superoxide dismutase, catalase and scavengers of hydroxyl radical protect against the toxic action of alloxan on pancreatic islet cells in vitro. *Biochemical Journal*, v.182, p.17-25, 1979.

GUÉRIN, A. P. *et al.* Arterial stiffening and vascular calcifications in end-stage renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 15: 1014-1021, 2000.

GUIMARÃES, R. X. Clínica e laboratório: *Interpretação clínica das provas laboratoriais.* 4ª ed., São Paulo: Savier, 1990.

HARKNESS, J.; WAGNER, J. *Biologia e Clínica de coelhos e roedores.* 3.ed. São Paulo: Editora Roca, 1999.

HENRY, J. B. *Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais.* Editora Manole Ltda, São Paulo 2ª edição, p.162-170, 549-644, 1999.

HERGESELL, O.; RITZ, E. Phosphate binders on iron basis: a new

perspective? Kidney Int. v. 56, p.42-45, 1999.

HSU, C., PATEL, S., YOUNG, E. New phosphate binding agents: ferric compounds. J. Am. Soc. Nephrol. v.10, p.1274-1280, 1999.

JANSSEN, M. J. A. *et al.* Alumunem hidroxide, calcium carbonate and calcium acetate in chronic intermittent hemodialysis patients. Clinical Nephrology. The Netherlands, v.45, n.2, p.111-119, 1996.

JING, S. B., YAMAGUCHI, T. Removal of phosphate from dilute phosphate solution by na iron chitosan complex to be used as na oral sorbent. Bull. Chem. Soc. Jpn. v.65, p. 1866-1870, 1992.

JING, S. B. *et al.* Effect of chitosan on renal function in patients with chronic renal failure. J. Pharm. Pharmacol. [s.1], v. 49, 9. 721-723, 1997.

JORNS, A. *et al.* Effect of superoxide dismutase, catalase, chelating agents, and free radical scavengers on the toxicity of alloxan to isolated pancreatic islets in vitro. Free Radical Biology & Medicine, v.26, n.10, p.1300-1304, 1999.

KATOPODIS, K. P. *et al.* Sevelamer hydrochloride versus aluminum hydroxide: effect on serum phosphorus and lipids in capd patients. Peritoneal Dialysis International. V. 26, p. 320-327, 2006.

KLUTHE, R. *et al.* Calcium and phosphate provision of renal patients. Clin. Nephrol. Freiburg, v.30, n.5, p.288-292, 1988.

KIRK, E. A.; HEINECKE, J. W.; LeBOEUF, R. C. Iron overloaded diminishes atherosclerosis in apoE-deficient mice. The Journal of Clinical Investigation. v. 107, p. 1545 -1553, 2001.

KURODA, S. *et al.* Effect of iron as a new type of phosphate binder in hemodialysis patients. Jpn. J. Nephrol. [s.1], v.37, n.8, p.468-473, 1995.

LEE, T. *et al.* Iron-deficient diet reduces atherosclerotic lesions in apoE-deficient mice. Circulation. V.99, p.1222-1229, 1999.

LONDON G.M.; MARTY C.; MARCHAIS S. J.; *et al.* Arterial calcifications and bone histomorphometry in end-stage renal disease. J. Am. Soc. Nephrol. 15: 1943–51, 2004.

MACEDO, C. S.; CAPELETTI S. M.; MERCADANTE, M. C. S., PADOVAN C. R., SPADELLA, C. T.. Role of metabolic control on diabetic nephropathy. Acta Cir Bras [serial online] Nov – Dec; 17(6), 2002. Disponível na página: www.scielo.br/acb.

MAGNÉSIO. Responsável técnico: Viviana E. Cétola. Rosário: Wiener, 2000. Kit Laboratorial.

MALLUCHE H. H., MONIER-FAUGERE M. C. Understanding and managing hyperphosphataemia in patients with chronic renal disease. Clin Nephrol.; 52:267-277, 1999.

MCDOWELL, R. L.. Minerals in animal and human nutrition. San Diego: Academic Press, p.524, 1992.

MENEZES, H. S. Revista AMRIGS. Porto Alegre, 46 (3,4): 105-108, 2002.

MOE, S. M. Equilíbrio entre fósforo e cálcio na insuficiência renal crônica: implicações e tratamento. Indianápolis: Escola de Medicina de Indiana, p. 54. 2002.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Recommended Dietary Allowances. 10 ed. Washington, D.C., National Academy Press, 1989.

PARIS, M.; BENAÏT, M. O.; RIGAT, B.; PROGNON, J. A. A manual method for the direct determination of serum iron using a new chromogen: chromazurol B. *Ann Biol Clin*; 44: 511-516, 1986.

PERFIL DO PRODUTO E EXPERIÊNCIA CLÍNICA: RENAGEL® SEVELAMER
Disponível na página:

http://www.genzyme.com.br/thera/renal/br_pdf_renagel_monograph.pdf

PONRAJ, F. *et al.* The onset of atherosclerotic lesion in hypercholesterolemic rabbits is delayed by iron depletion. FEBS Letters. V.459, p.99-102, 1999.

PORTARIA Nº 845 DE 06 DE NOVEMBRO DE 2002. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas – hiperfosfatemia na insuficiência renal crônica. Disponível na página: www.sbn.org.br

RATHKE, T.; HUDSON, S.M. Review of chitin and chitosan as fiber and film formers. J. Macromol. Sci.: Rev. Macromol. Chem. Phys. c. 34, p- 375-437, 1994.

RIELLA, M. C. Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólíticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 4.ed. 1003 p. 2003.

RINCKER M. J. *et al.* Effect of iron supplementation on binding activity of iron regulatory proteins and the subsequent effect on growth performance and indices of hematological and mineral status of young pigs. J. Anim Sci. 83 (9). p. 2137 – 2145, 2005.

RODRIGUES, C. A. *et al.* Preparation, characterization and chromatography properties of chitin modified with FeCl₃. J. Liq. Chrom. Rel. Technol. 22, 761-769, 1999.

RODRIGUES, C.A.; LARANJEIRA, M.C.; STADLER, E.; DRAGO, V. Preparation and characterization of pentacyanoferrate(II) on the Surface of N-(4-pyridilmethylidene) chitosan. Carbohydr. Pol. v. 40, p. 311-314, 2000.

ROMÃO JR, J. E. Doença renal crônica: definição, epidemiologia e classificação. J. Bras. Nefrol. Volume XXVI. N.3. supl.1, 2004.

ROSTAND, S. G. *et al.* Myocardial calcification and cardiac dysfunction in chronic renal failure. Am J Med. 85: 651-657, 1988.

RUFINO, M. *et al.* Is it possible to control hyperphosphataemia with dieta, without inducing protein malnutrition? Nephrol. Dial. Transplant. 13: 65 – 67, 1998.

SCHWARZ, C. M. *et.al.* Gender differences in antacids induced phosphate deprivation in rats. Gastroenterology. 89: 313-20, 1985.

SELLARES, V. L.; RAMIRES, A. T.. Management of hyperphosphataemia in dialysis patients: orole of phosphate binders in the elderly. Therapy in practice. 21 (3): 153-165, 2004.

SESSO, R. Inquérito epidemiológico em unidades de diálise. J. Bras. Nefrol. 22 (supl2): 23-6, 2000.

SOARES, L.; PASQUALOTTO; A; ROSA, D.; LEITE, V. R. Métodos Diagnósticos. Artmed Editora. Porto Alegre, 1^a ed., p. 21 – 1096, 2002.

SULLIVAN, J. L. Iron and the sex difference in heart disease risk. Lancet. V.1, p.1293-1294, 1981.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cell of the rats pancreas. Physiol. Res. v.50: 536-546,2001.

TAKAHASHI, Y. et al.. Nicotinamide suppresses hyperphosphatemia in hemodialysis patients. Kidney International. Vol.65, 1099-1104, 2004.

URIBARRI, J.; CALVO, M. S. Hidden sources of phosphorus in the typical american diet: does it matter in nephrology? Dialysis. v. 16, n. 3, 2003.

VALCARENGHI, D.; SANDRI, S. Utilização do polímero quitosana-Fe(III)-R como adsorvente oral no tratamento da hiperfosfatemia: estudo *in vitro* e *in vivo*. 1999. Monografia de Graduação em Farmácia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Vale de Itajaí.

VALCARENGHI, D. Avaliação toxicológica crônica do polímero quitosana ferro (III) solúvel. Itajaí, 2006. 77p. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI.

WALLACH, J. Interpretação de Exames Laboratoriais. Editora Médica e Científica Ltda. 7.ed, 2003.

WEAVER, C. M. *et al.* Phosphate-binding capacity of ferrihydrite versus calcium acetate in rats. Am. J. Kidney Dis. 34: 324-327, 1999.

8 ANEXOS