



Universidade Federal de Uberlândia  
Instituto de Biotecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

**Diminuições dos níveis de ferro e da degradação do grupo heme estão associadas ao processo inflamatório ligado à resistência à insulina em homens hiperglicêmicos**

Aluna: **Sarah Yasminy Luz**

Orientador: Prof. Dr. **Nilson Penha-Silva**

Co-Orientadora: Profa. Dra. **Nadia Carla Cheik**

**UBERLÂNDIA - MG  
2020**



Universidade Federal de Uberlândia  
Instituto de Biotecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

**Diminuições dos níveis de ferro e da degradação do grupo heme estão associadas ao processo inflamatório ligado à resistência à insulina em homens hiperglicêmicos**

Aluna: **Sarah Yasminy Luz**

Orientador: Prof. Dr. **Nilson Penha-Silva**

Co-Orientadora: Profa. Dra. **Nadia Carla Cheik**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área de Bioquímica)

**UBERLÂNDIA - MG  
2020**

2021 Diminuições dos níveis de ferro e da degradação do grupo heme estão associadas ao processo inflamatório ligado à resistência à insulina em homens hiperglicêmicos [recurso eletrônico] / Sarah Yasminy Luz. - 2021.

Orientador: Nilson Penha-Silva.

Coorientadora: Nadia Carla Cheik.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.50>

Inclui bibliografia.

1. Genética. I. Penha-Silva, Nilson, 1957-, (Orient.).  
II. Cheik, Nadia Carla, 1977-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica  
 Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
 Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico - nº 13/2020 - PPGGB.				
Data:	Vinte e oito de janeiro de dois mil e vinte e um	Hora de início:	08:30h	Hora de encerramento:	09:10h
Matrícula do Discente:	11822GBI015				
Nome do Discente:	Sarah Yasminy Luz				
Título do Trabalho:	Diminuições dos níveis de ferro e da degradação do grupo heme estão associadas ao processo inflamatório ligado à resistência à insulina em homens hiperglicêmicos.				
Área de concentração:	Bioquímica				
Linha de pesquisa:	Biologia Molecular				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Relações entre força muscular, estabilidade de membrana de eritrócitos e variáveis bioquímicas, hematológicas e inflamatórias em pacientes com pré-diabetes e <i>Diabetes mellitus</i> tipo 2.				

Aos vinte e oito dias do mês de janeiro de dois mil e vinte e um, às 08:30 horas, reuniu-se via web conferência pela plataforma Google Meet, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Professores Doutores: Nilson Penha Silva (Orientador), Morun Bernardino Neto e Ricardo Rodrigues. A participação dos dois últimos se deu por epístola. Iniciando os trabalhos, o (a) presidente Dr (a). Nilson Penha Silva apresentou a Comissão Examinadora e o candidato (a), agradeceu a presença dos participantes, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir o senhor(a) presidente procedeu a leitura das epístolas enviadas pelos membros da banca. Em seguida os membros presentes, passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a leitura das epístolas e a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

( A ) PROVADO.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Nilson Penha Silva, Presidente**, em 28/01/2021, às 09:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Rodrigues, Médico(a)**, em 28/01/2021, às 09:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Morun Bernardino Neto, Usuário Externo**, em 28/01/2021, às 09:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [h tps://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2484257** e o código CRC **8D61A825**.



Universidade Federal de Uberlândia  
Instituto de Biotecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

**Diminuições dos níveis de ferro e da degradação do grupo heme estão associadas ao processo inflamatório ligado à resistência à insulina em homens hiperglicêmicos**

ALUNO: **Sarah Yasminy Luz**

#### **COMISSÃO EXAMINADORA**

Presidente: **Nilson Penha Silva** (UFU) (Orientador)

Examinadores:

**Morun Bernardino Neto** (USP) (Titular)

**Ricardo Rodrigues** (UFU) (Titular)

**Márcia Aires Rodrigues de Freitas** (UFU) (Suplente)

**Romeu Paulo Martins Silva** (UFC) (Suplente)

**Data da Defesa:** 28/01/2021

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas do PPGGB para o formato da dissertação foram contempladas.

---

Nilson Penha Silva  
Orientador

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai,  
Antônio Fausto Luz (*in memoriam*),  
grande homem e meu maior incentivador.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela minha vida e pela minha saúde para enfrentar todas as dificuldades encontradas ao longo da realização deste trabalho.

Agradeço a minha família, especialmente a minha mãe, Lindaura Dias de Noronha e ao meu querido pai, Antônio Fausto Luz (*in memoriam*) pelo incentivo e companheirismo.

Agradeço ao meu namorado, Marcos Aurélio, pela parceria e apoio a minha vida acadêmica.

Agradeço ao Prof. Dr. Nilson Penha-Silva, pelo aprendizado, paciência, oportunidade de aprender e ser uma pessoa melhor tanto na vida pessoal quanto na vida acadêmica.

Agradeço à Profa. Dra. Nadia Cheik, pela amizade, pelos ensinamentos e por todos os conselhos que guiaram meu aprendizado.

Agradeço ao Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho, pelo apoio extraordinário concedido na análise dos resultados deste estudo.

Agradeço aos meus colegas e técnicos de laboratório, pelo companheirismo e pela troca de experiências que foram fundamentais para a execução deste estudo.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade que me foi concedida e pela formação recebida.

Agradeço o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de minha bolsa de Mestrado.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	10
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>OBJETIVO</b> .....	15
Objetivo Geral .....	15
Objetivos específicos .....	15
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	16
População.....	16
Coleta das amostras de sangue .....	16
Determinação das variáveis hematológicas e bioquímicas .....	16
Modelo de Avaliação da Homeostase na Resistência à Insulina (HOMA-IR) e Modelo de Avaliação da Homeostase na Função das Células $\beta$ (HOMA- $\beta$ ) .....	17
Avaliação da força muscular .....	17
Determinação da estabilidade osmótica de eritrócitos .....	17
Análise estatística.....	19
<b>RESULTADOS</b> .....	20
<b>DISCUSSÃO</b> .....	26
<b>CONCLUSÃO</b> .....	31
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	32

## RESUMO

**Diminuições dos níveis de ferro e da degradação do grupo heme estão associadas ao processo inflamatório ligado à resistência à insulina em homens hiperglicêmicos**

**Introdução:** Alterações na homeostase da glicose estão associadas a alterações na homeostase do ferro. **Objetivo:** Analisar as associações de variáveis antropométricas, inflamatórias, regulatórias, metabólicas e hematológicas, com indicadores do *status* do ferro e níveis de HbA1c em homens hiperglicêmicos, no intuito de identificar possíveis vínculos entre a quebra da homeostase da glicose com a quebra da homeostase do ferro. **Métodos:** Um total de 79 homens (54 normoglicêmicos e 25 hiperglicêmicos) participaram deste estudo. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para a comparação dos grupos e a correlação de Spearman para verificar as associações entre pares de variáveis. **Resultados:** O grupo hiperglicêmico apresentou valores significativamente maiores de HbA1c e do Modelo de Avaliação da Homeostase na Resistência à Insulina (HOMA-IR), mas valores menores dos níveis de ferro e do Modelo de Avaliação da Homeostase da Insulina (HOMA- $\beta$ ). O aumento em HbA1c foi associado a aumento da resistência à insulina e diminuição de ferro e da fração de bilirrubina não-conjugada. Tanto a diminuição de ferro e da fração de bilirrubina não-conjugada como o aumento de HOMA-IR foram associados a aumento de proteína C-reativa (CRP). **Conclusão:** As alterações na homeostase do ferro – com diminuição dos níveis de ferro – e de eritrócitos – com diminuição na degradação do grupo heme da hemoglobina – estão associadas ao processo inflamatório vinculado à resistência à insulina.

**Palavras-chave:** Hiperglicemia; inflamação; eritrócitos; hemoglobina glicada; deficiência de ferro; estabilidade osmótica.

## ABSTRACT

### **Decreased iron levels and heme group degradation are associated with the inflammatory process linked to insulin resistance in hyperglycemic men**

**Introduction:** Changes in glucose homeostasis are associated with changes in iron homeostasis. **Objective:** To analyze the associations of anthropometric, inflammatory, regulatory, metabolic, and hematologic variables, with indicators of iron status and HbA1c levels in hyperglycemic men, to identify possible links between the glucose homeostasis breakdown and the iron homeostasis breakdown. **Methods:** A total of 79 men (54 normoglycemic and 25 hyperglycemic) participated in this study. The Mann-Whitney test was used to compare groups and Spearman's correlation to verify associations between pairs of variables. **Results:** The hyperglycemic group showed significantly higher values of HbA1c and the Model of Assessment of Homeostasis in Insulin Resistance (HOMA-IR), but lower values of iron levels and the Model of Evaluation of Insulin Homeostasis (HOMA- $\beta$ ). The increase in HbA1c was associated with increased insulin resistance and decreased iron and unconjugated bilirubin fraction. Both the decrease in iron and the unconjugated bilirubin fraction and the increase in HOMA-IR were associated with increased C-reactive protein. **Conclusion:** Changes in the homeostasis of iron - with decreased iron levels - and erythrocytes - with decreased hemoglobin heme group degradation - are associated with the inflammatory process linked to insulin resistance.

**Keywords:** Hyperglycemia; inflammation; erythrocytes; glycated hemoglobin; iron deficiency; osmotic stability.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina Aminotransferase (do inglês <i>Alanine Amino Transferase</i> )
$A_{max}$	Absorbância a 540 nm associada à hemólise total da população de eritrócitos
$A_{min}$	Absorbância a 540 nm associada à hemólise basal da população de eritrócitos
AST	Aspartato Aminotransferase (do inglês <i>Aspartate Aminotransferase</i> )
DB	Bilirrubina Direta (do inglês <i>Direct Bilirubin</i> )
dX	Variação na concentração de NaCl responsável pela hemólise total
$H_0$	Concentração salina onde a hemólise tem início
$H_{50}$	Concentração salina capaz de promover 50% de hemólise
$H_{100}$	Concentração salina capaz de promover 100% de hemólise
HbA1c	Hemoglobina glicada
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade (do inglês <i>High Density Lipoprotein</i> )
HOMA-IR	Modelo de Avaliação da Homeostase na Resistência à Insulina (do inglês <i>Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance</i> )
HOMA- $\beta$	Modelo de Avaliação da Homeostase na Função das Células $\beta$ (do inglês <i>Homeostasis Model Assessment <math>\beta</math> Cell Function</i> )
IB	Bilirrubina Indireta (do inglês <i>Indirect Bilirubin</i> )
LDH	Lactato Desidrogenase (do inglês <i>Lactate Dehydrogenase</i> )
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade (do inglês <i>Low Density Lipoprotein</i> )
MCH	Hemoglobina Corpuscular Média (do inglês <i>Mean Corpuscular Hemoglobin</i> )
MCHC	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (do inglês <i>Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration</i> )
MCV	Volume corpuscular médio (do inglês <i>Mean Corpuscular Volume</i> )
RDW	Amplitude da Distribuição de Volumes de Células Vermelhas (do inglês <i>Red Cell Distribution Width</i> )
TB	Bilirrubina Total (do inglês <i>Total Bilirubin</i> )
TIBC	Capacidade Total de Ligação do Ferro (do inglês <i>Total Iron Binding Capacity</i> )
TSI	Índice de Saturação da Transferrina (do inglês <i>Transferrin Saturation Index</i> )
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade (do inglês <i>Very Low Density Lipoprotein</i> )

## INTRODUÇÃO

Um processo crônico de inflamação de baixo grau, principalmente quando associado a sobrepeso e obesidade, contribui para a instalação do *diabetes mellitus* tipo 2 (T2DM) (Lontchi-Yimagou, Sobngwi et al. 2013). De fato, níveis aumentados de marcadores inflamatórios como Proteína C Reativa (CRP), interleucina-6 e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) estão associados à resistência à insulina e, por sua vez, a exacerbação da inflamação na presença de hiperglicemia também contribui para as complicações de longo prazo do diabetes (Berbudi, Rahmadika et al. 2020).

Entretanto, a hiperglicemia crônica, característica dessa doença, também está associada ao desenvolvimento de suas complicações micro e macrovasculares, como nefropatia (Flyvbjerg 2017), neuropatia (Vinik, Nevoret et al. 2013) e retinopatia (Heng, Comyn et al. 2013). Dentre os vários mecanismos associados a essas complicações, merece destaque a glicação de biomoléculas, e dentre as biomoléculas glicadas merece destaque a hemoglobina, particularmente a fração A1c (HbA1c), cujos níveis sanguíneos se elevam proporcionalmente à elevação da glicemia (Ikeda and Shimazawa 2019). É por isso que os níveis de HbA1c fornecem um critério adicional para avaliar o *status* glicêmico, o que é muito interessante no cenário do diabetes (Sacks 2012), especialmente porque os níveis de HbA1c no sangue expressam os níveis estacionários de glicose sanguínea durante o período de meia-vida dos eritrócitos. De fato, a Associação Americana para o Diabetes (ADA, do inglês *American Diabetes Association*) recomenda como meta de bom controle glicêmico a manutenção de níveis de HbA1c abaixo de 6.5% para evitar complicações futuras da doença (Association 2010).

Entretanto, outros fatores, como a deficiência de ferro, também afetam os níveis de HbA1c (Soliman, De et al. 2017). De fato, o ferro desempenha papel essencial no organismo. O ferro é um constituinte essencial do grupo prostético heme de proteínas como a hemoglobina, a mioglobina e uma série de proteínas da cadeia de transporte de elétrons que estão também associadas à dinâmica da respiração, bem como a enzimas associadas ao metabolismo de xenobióticos

(Chifman, Laubenbacher et al. 2014, Dev and Babitt 2017), dentre várias outras proteínas conjugadas.

Nesse sentido, a deficiência de ferro pode produzir alterações importantes em índices hematológicos, como diminuição da hemoglobina corpuscular média (MCH, do inglês *mean corpuscular hemoglobin*) e aumento da distribuição de volume de eritrócitos (RDW, do inglês *red cell distribution width*) (Bouri and Martin 2018).

Estudos anteriores verificaram que níveis mais altos de HbA1c estão associados a deficiência de ferro em indivíduos com ou sem diabetes e que com a suplementação de ferros os níveis de Hb1Ac tendem a diminuir (Christy, Manjrekar et al. 2014, Soliman, De et al. 2017, Intra, Limonta et al. 2019). Entretanto, estes resultados são controversos, uma vez que há estudos que mostram não haver alterações significantes nos níveis de Hb1Ac em indivíduos sem diabetes e com deficiência de ferro (Kim, Bullard et al. 2010). Para complicar, há estudos mostrando associação de menores níveis de Hb1Ac em um grupo de indivíduos anêmicos quando comparado com um grupo controle de indivíduos sem anemia (Sinha, Mishra et al. 2012).

Essa questão foi bem explorada na revisão sistemática de English et al (English, Idris et al. 2015), a qual demonstrou que a anemia por deficiência de ferro (IDA, do inglês *iron deficiency anemia*) pode levar à elevação espúria de HbA1c, embora a deficiência de ferro sem ocorrência de IDA pode levar à diminuição de HbA1c. De fato, recentemente Cetinkaya et al. (2020) associaram a IDA com diminuição nos níveis de HbA1 e normalização após suplementação de ferro em uma população sem diabetes (Cetinkaya Altuntas, Evran et al. 2020).

Essa heterogeneidade de resultados para a relação dos níveis de HbA1c com os níveis de ferro talvez possa ser explicada pela influência de outros fatores. De fato, o próprio diabetes promove um conjunto muito amplo e complexo de alterações estruturais e funcionais inter-relacionadas de componentes das várias células sanguíneas (Szablewski and Sulima 2017). Uma análise das relações do amplo conjunto de parâmetros sanguíneos afetados pela glicemia com os níveis de HbA1c e também de ferro deve contribuir para uma melhor compreensão da questão.

A glicação também eleva a agregação das moléculas de hemoglobina e leva a redução da deformabilidade celular (Ye, Ruan et al. 2016). Além disso, a glicação de proteínas do citoesqueleto também leva à diminuição na deformabilidade (Kung, Tseng et al. 2009) e prejudica a ocorrência das alterações viscoelásticas necessárias para a passagem dos eritrócitos através de capilares de pequeno diâmetro (Mohandas and Gallagher 2008). A deformabilidade de eritrócitos também é diminuída pela elevação do teor de colesterol de membrana (NM Weijers 2012) e pelo estresse oxidativo (McNamee, Horobin et al. 2018). Eritrócitos menos deformáveis são mecanicamente mais frágeis, o que requer sua remoção da circulação e aceleração da eritropoiese.

Além daqueles fatores e, certamente, de muitos outros, é preciso considerar a heterogeneidade associada aos padrões de hiperglicemia, que vão refletir diferentes momentos da história natural do diabetes, bem como os antagonismos associados a fatores como a própria elevação da glicemia, que também significa elevação da osmolaridade, o que aumenta a estabilidade de eritrócitos (Lemos, Márquez-Bernardes et al. 2011).

Essa complexidade e heterogeneidade dos fatores associados à hiperglicemia certamente poderia justificar as controversas relações entre os níveis de ferro e HbA1c, bem como as alegações de diminuição (Huang, Liu et al. 2018) e mesmo aumento (Wu, Lin et al. 2017) na meia-vida de eritrócitos em voluntários hiperglicêmicos.

De todo modo, a compreensão da influência dos fatores relacionados a relação entre níveis de ferro e HbA1c, deve envolver o estudo de propriedades como a estabilidade de eritrócitos.

De fato, em uma população constituída por voluntários diabéticos de ambos os sexos, Knychala et al. (2020) associaram a diminuição nos níveis de ferro a um aumento na variável dX de estabilidade osmótica – a qual expressa a amplitude da hipotonicidade necessária para promoção de lise hiposmótica de toda a população de eritrócitos – concomitantemente a um aumento de RDW, variável que assim como dX expressa o aumento na variabilidade de volume das células vermelhas do sangue (Knychala, Garrote-Filho et al. 2020).

Em mulheres hiperglicêmicas, Batista-da-Silva (2020) associou a diminuição nos níveis de ferro e o aumento em HbA1c à diminuição na

concentração intracelular de hemoglobina (MCHC), e também a diminuição de MCHC a aumento nos valores de dX, de RDW e da razão bilirrubina não conjugada/bilirrubina total, o que significa uma desaceleração na degradação do grupo heme. Além disso, aquele autor também demonstrou que essa diminuição no catabolismo do heme não parece ser um processo associado somente à diminuição nos níveis de hemoglobina, uma vez que a desaceleração do catabolismo do heme foi também associada ao aumento no status inflamatório e diminuição nos níveis de LDL-colesterol (Batista-da-Silva 2020).

Esta dissertação objetiva investigar também as relações da diminuição dos níveis de ferro e aumento em HbA1c em uma população hiperglicêmica, porém agora constituída exclusivamente por homens. Esta preocupação em estudar isoladamente a população masculina é bastante pertinente, em função das diferenças hematológicas amplamente conhecidas entre homens e mulheres. De fato, Attard et al. (2015) encontraram diferenças bastante significantes na estimativa da prevalência de pré-diabetes utilizando valores de HbA1c tanto entre os sexos como entre participantes sem e com deficiência de ferro (Attard, Herring et al. 2015).

## **OBJETIVO**

### **Objetivo Geral**

Investigar em homens hiperglicêmicos as alterações presentes na antropometria (peso, altura, índice de massa corporal, circunferência da cintura, circunferência do quadril, circunferência do braço); insulinemia; resistência à insulina (HOMA-IR); função de células  $\beta$  pancreáticas (HOMA- $\beta$ ); glicemia; hemoglobina glicada; perfil lipídico; marcadores de agressão celular (aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e lactato desidrogenase); estado inflamatório (Proteína C Reativa); creatinina; ureia; ácido úrico; bilirrubina indireta, direta e total; *status* de ferro (ferro, ferritina, índice de saturação de transferrina e capacidade de ligação total de ferro); vitaminas B9, B12 e D; parâmetros e índices hematológicos (eritrograma; leucograma e contagem de reticulócitos); e estabilidade osmótica de eritrócitos.

### **Objetivos específicos**

Comparar os valores dos parâmetros estudados entre homens normoglicêmicos e hiperglicêmicos.

Investigar as possíveis associações entre os parâmetros estudados, especialmente aqueles que refletem a homeostase da glicose e do ferro e as propriedades de eritrócitos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **População**

Um total de 79 homens atendidos no Ambulatório de Clínica Médica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia foram estratificados nos grupos normoglicêmico (glicose < 100 mg/dL, n= 25) e hiperglicêmico (glicose ≥ 100 mg/dL, n = 54). No grupo normoglicêmico, 5 dos voluntários tiveram diagnóstico anterior de pré-diabetes (tempo de diagnóstico de 0.6 (0) anos e glicemia de 95.1 (5.6) mg/dL). No grupo hiperglicêmico, 25 voluntários tiveram diagnóstico anterior de pré-diabetes (tempo de diagnóstico de 0.6 (1.0) anos e glicemia de 116.4 (20.8) mg/dL) e 17 de diabetes mellitus tipo 2 (tempo de diagnóstico de 0.6 (2.0) anos e glicemia de 145.1 (57.8) mg/dL). Indivíduos com comprometimento cognitivo, eritrocitopatias hereditárias, histórico de abuso de álcool e outras drogas foram excluídos do estudo.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Uberlândia sob o registro # 56557516.0.0000.5152. Todos os voluntários foram atendidos no ambulatório do Hospital de Clínicas da UFU e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido.

### **Coleta das amostras de sangue**

Amostras 20 mL de sangue foram coletadas por punção intravenosa, após jejum noturno de 8-12 horas, em dois tubos à vácuo contendo K<sub>3</sub>EDTA, para determinação das variáveis hematológicas e da estabilidade de eritrócitos, e em dois tubos contendo gel separador, para as análises bioquímicas.

### **Determinação das variáveis hematológicas e bioquímicas**

Os exames de sangue de rotina foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

As contagens sanguíneas foram determinadas usando um sistema automatizado (Sysmex America Inc., modelo XN 3.000, Kobe, Japão). As contagens de reticulócitos foram realizadas visualmente. A taxa de sedimentação de eritrócitos (VHS) foi determinada em um sistema de análise automatizado (Alifax SPA, Padova, Itália). A hemoglobina glicada (Hb1c) foi quantificada pelo

método de cromatografia líquida de alto desempenho (HLPC) (BIORAD D-10, Hercules, CA, EUA).

Dosagens de colesterol total (t-C), HDL-colesterol (HDL-C), LDL-colesterol (LDL-C), VLDL-colesterol (VLDL-C), triglicerídeos (TGC), glicose (Glu) e proteína C reativa (CRP) foram feitas em analisador automático da Roche (Cobas 6000, Tóquio, Japão). A hemoglobina glicada (HbA1c) foi medida por cromatografia líquida de alta eficiência (BIORAD D-10, Hercules, CA, EUA).

### **Modelo de Avaliação da Homeostase na Resistência à Insulina (HOMA-IR) e Modelo de Avaliação da Homeostase na Função das Células $\beta$ (HOMA- $\beta$ )**

Os valores de HOMA-IR, que é proporcional ao grau de resistência à insulina, e de HOMA- $\beta$ , que representa a função relativa das células  $\beta$  e é expressa como porcentagem, foram calculados com a utilização das equações:  $HOMA-IR = \text{insulinemia de jejum} \times \text{glicemia de jejum} \div 22,5$  e  $HOMA-\beta = 20 \times \text{insulinemia de jejum} \div (\text{FPG} - 3,5)$ , onde a insulinemia e a glicemia de jejum são dadas em mU/L e mmol/L, respectivamente (Matthews, Hosker et al. 1985, Dullaart, Annema et al. 2012).

### **Avaliação da força muscular**

A força muscular foi avaliada utilizando um dinamômetro eletrônico de mão (Camry Scale Store, modelo EH 101, City Industry, CA, USA), o qual estima a força de preensão manual, dada em kg. Dois testes com intervalo de 1 minuto foram realizados e a maior força de preensão manual que o indivíduo foi capaz de manter por 3 segundos foi registrada.

### **Determinação da estabilidade osmótica de eritrócitos**

As soluções de NaCl foram preparadas utilizando reagente de alta pureza (99%) em água ultrapura (Millipore Corporation, São Paulo, Brasil). As medidas de massa foram feitas usando uma balança analítica (AND, modelo 870, Japão). Para as medidas de volume foram utilizadas pipetas automáticas (Labsystems, modelo Finnpipette Digital, Helsinki, Finlândia). Um banho termostaticado (Marconi, modelo MA 184, Piracicaba, SP, Brasil) foi utilizado para incubações a 37 °C. As centrifugações foram realizadas em centrífuga com temperatura

controlada (Hitachi Koki, modelo CF15RXII, Hitachinaka, Japão). As leituras da absorbância foram realizadas em espectrofotômetro digital (Hach, modelo DR 5000, Düsseldorf, Alemanha).

O teste de estabilidade osmótica de eritrócitos (Penha-Silva, Firmino et al. 2007) foi realizado em série duplicada de minitubos contendo 1 mL de solução de NaCl com concentração de 0.1 a 0.9 g/dL. Inicialmente, os minitubos foram pré-incubados durante 10 minutos a 37 °C em banho termostatizado. Depois, 10 µL de sangue foram adicionados a cada minitubo. Depois de serem fechados e delicadamente agitados, os minitubos foram incubados por 30 minutos sob as mesmas condições. Finalmente, os minitubos foram centrifugados a 1600 x g durante 10 minutos a 37 °C e os sobrenadantes foram utilizados para a leitura de absorbância a 540 nm.

Os gráficos de absorbância a 540 nm ( $A_{540}$ ) em função da concentração de NaCl (X) foram ajustados por regressão sigmoideal (Fig.1) de acordo com a equação de Boltzmann:

$$A = \frac{A_{max} - A_{min}}{1 + e^{(X-H_{50})/dX}} + A_{min} \quad (1),$$

em que  $A_{max}$  e  $A_{min}$  representam, respectivamente, os platôs máximo e mínimo de  $A_{540}$ ,  $H_{50}$  é a concentração salina capaz de promover 50% de hemólise e  $dX$  representa um quarto da variação na concentração de NaCl responsável por promover a lise total dos eritrócitos. As variáveis,  $H_0$  e  $H_{100}$  representam a concentrações salinas onde a hemólise inicia e termina, respectivamente. Para o cálculo de  $H_0$  e  $H_{100}$  foram usadas as seguintes equações:

$$H_0 = H_{50} + 2 dX \quad (2)$$

e

$$H_{100} = H_{50} - 2 dX \quad (3).$$

As variáveis  $H_0$ ,  $H_{50}$  e  $H_{100}$  são proporcionais à fragilidade osmótica de eritrócitos. Nesse sentido, menores valores  $H_0$ ,  $H_{50}$  e  $H_{100}$  indicam maior a estabilidade osmótica de eritrócitos. Por outro lado,  $dX$ , assim como a razão  $dX/H_{50}$ , são diretamente proporcionais à estabilidade osmótica de eritrócitos. Ou seja, quanto maior o valor de  $dX$ , maior é a estabilidade osmótica de eritrócitos (Bernardino Neto, Arantes et al. 2013).

## **Análise estatística**

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade dos dados. A maioria das variáveis analisadas apresentaram distribuição não-paramétrica e, por isso, foram expressas como mediana e intervalo interquartil. As comparações entre os grupos foram feitas com a utilização do método de Mann-Whitney. Além disso, a correlação de Spearman foi utilizada para verificar a existência de associações entre as variáveis estudadas. As diferenças e as correlações com valores de  $p < 0.05$  foram consideradas significantes.

Todas as análises comparativas e de correlação foram realizadas usando o SPSS 21 (SPSS Inc, IBM, Chicago, IL, EUA).

O OriginPro 2016 (Microcal, Northampton, MA, EUA) foi usado para obter parâmetros de estabilidade osmótica de eritrócitos utilizando rotina de regressão não-linear pela equação de Boltzmann.

A matriz de correlação mostrada na Figura 2 foi construída utilizando R (versão 3.6.1 com R studio 1.2.1335 e pacote de correção).

## RESULTADOS

A **Figura 1** representa uma curva típica de dependência da quantidade de hemoglobina liberada, estimada pela absorvância a 540 nm, em função da concentração de NaCl do meio.

A **Tabela 1** apresenta as características basais da população de homens normoglicêmicos e hiperglicêmicos estudados.

Em comparação ao grupo de homens normoglicêmicos, o grupo de homens hiperglicêmicos apresentou valores significativamente maiores de glicemia – que foi o critério usado para estratificação –, de HbA1c e do Modelo de Avaliação da Homeostase na Resistência à Insulina (HOMA-IR), mas valores menores dos níveis de ferro e do Modelo de Avaliação da Homeostase da Insulina (HOMA- $\beta$ ), embora os níveis de insulina entre os grupos não tenham sido significativamente diferentes.

A **Figura 2** apresenta os resultados da análise de correlação de Spearman entre cada par de variáveis estudadas do grupo de homens hiperglicêmicos. Algumas correlações merecem destaque.

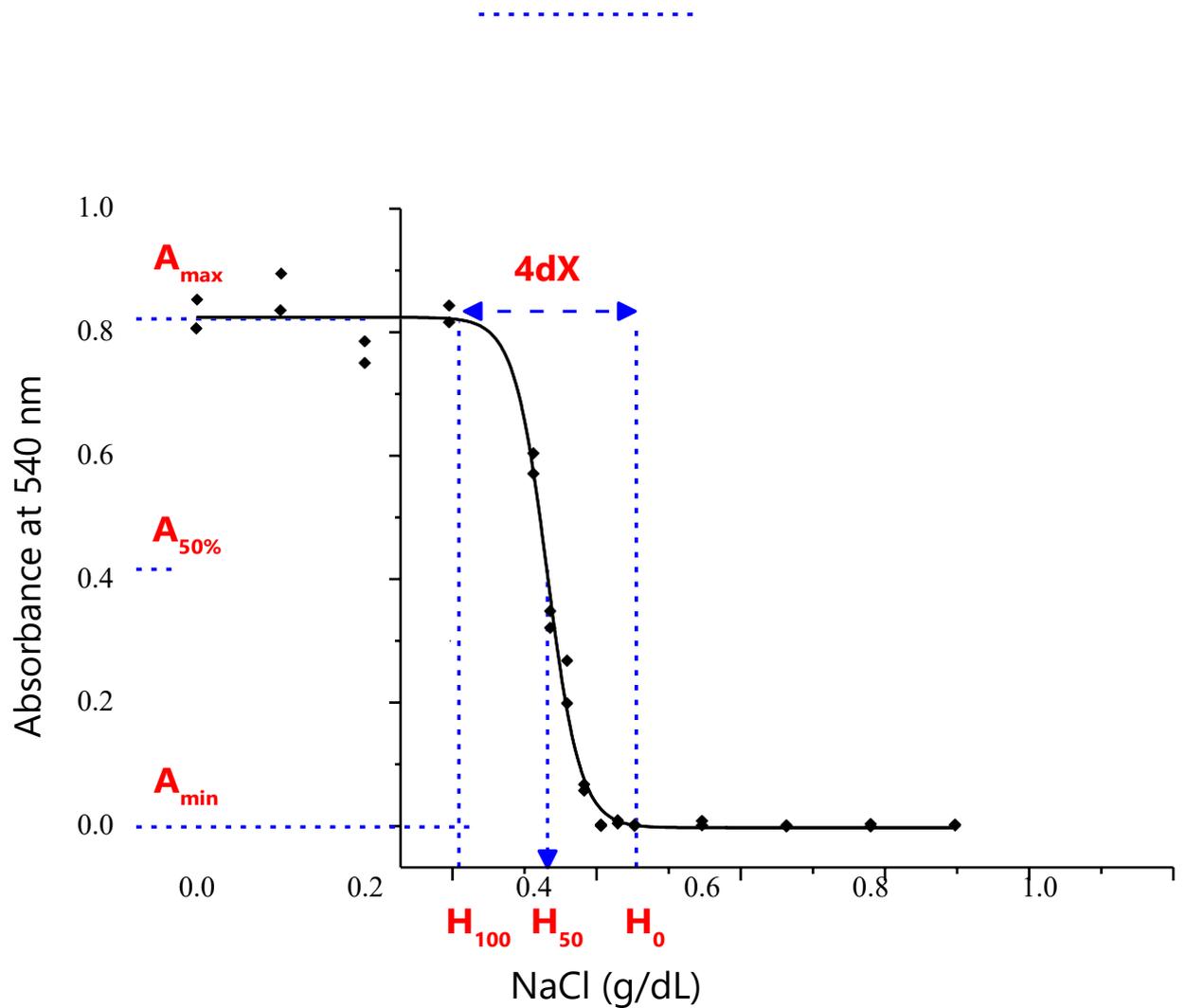
Os níveis sanguíneos de HbA1c aumentaram com o aumento da glicemia e da resistência à insulina (HOMA-IR), mas também com a diminuição dos níveis sanguíneos de ferro e da razão entre bilirrubina indireta (IB) e bilirrubina total (TB), o que associa o aumento em HbA1c com a tendência à anemia e a diminuição da fração de bilirrubina não-conjugada, certamente em decorrência da desaceleração do catabolismo do grupo heme, proveniente majoritariamente da hemoglobina no organismo humano. De fato, a associação de maiores valores de HbA1c com menores valores de MCH e MCV sustentam a associação da elevação de HbA1c com tendência à anemia microcítica.

Diminuições nos níveis de ferro, mas também do índice de saturação da transferrina (TSI) foram observadas com o aumento da glicemia, associando a quebra da homeostase do ferro à quebra da homeostase da glicose.

Diminuições nos níveis de ferro, mas também de TSI, IB, TB e razão IB/TB e aumento na insulinemia e na resistência à insulina (HOMA-IR) foram associados a um aumento nos níveis sanguíneos de proteína C-reativa (CRP), indicando que as quebras na homeostase do ferro – com diminuição dos níveis de ferro e de TSI

– e de eritrócitos – com diminuição do catabolismo do heme – também estão associadas ao processo inflamatório vinculado à resistência à insulina.

Elevações de HOMA-IR também foram associados a aumento nos níveis de triglicérides (TGC), VLDL-colesterol (VLDL-C), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), ácido úrico (UA), e ferritina, certamente em decorrência de implicações regulatórias (elevações de TGC e VLDL-C) e vinculações inflamatórias (elevações de ALT, AST, UA e ferritina) da resistência à insulina.



**Figura 1.** Curva sigmoide típica de lise hiposmótica de eritrócitos humanos, com definição dos parâmetros de estabilidade osmótica  $A_{\min}$ ,  $A_{\max}$ ,  $H_0$ ,  $H_{50}$ ,  $H_{100}$  e  $dX$ . Os parâmetros  $H_0$ ,  $H_{50}$  e  $H_{100}$  representam as concentrações de NaCl necessárias para obtenção do início, 50% e 100% de hemólise, respectivamente. O parâmetro  $dX$  representa 1/4 do declínio na concentração de NaCl responsável pela transição entre células íntegras, presentes em  $H_0$ , onde a absorbância da hemoglobina livre é mínima ( $A_{\min}$ ), e células lisadas, presentes em  $H_{100}$ , onde a absorbância da hemoglobina livre é máxima ( $A_{\max}$ ).

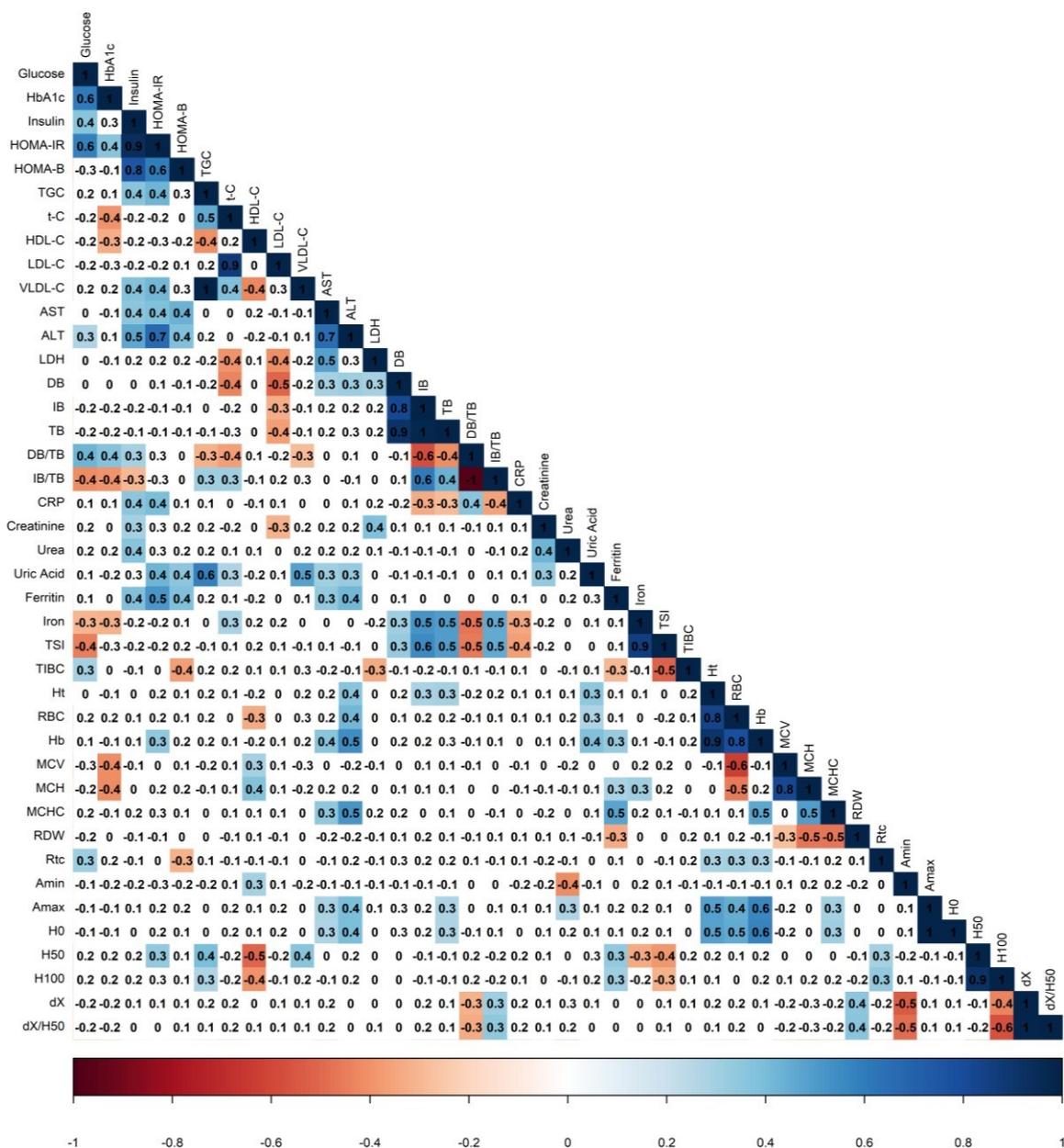
**Tabela 1.** Características da população estudada.

Parâmetros	Faixa de Referência	Normoglicêmicos (n = 25)	Hiperglicêmicos (n = 54)	p
Idade (anos)	-	59 (15)	63 (15)	0.403
Peso (kg)	-	83 (10)	80 (24)	0.756
Altura (cm)	-	170 (7)	170 (9)	0.736
Índice de Massa Corporal (kg/m <sup>2</sup> )	18.5 - 24.9	27.77 (4.38)	28.6 (6.16)	0.237
Circunferência da Cintura (cm)	< 80	95 (17)	100.5 (21)	0.161
Circunferência do Quadril (cm)	< 0.85	100 (9)	102 (9)	0.306
Relação Cintura/Quadril	< 0.7	0.98 (0.11)	0.97 (0.07)	0.497
Circunferência do Braço (cm)	-	30.5 (5.5)	31 (5.5)	0.721
Força (kg)	> 24	39.65 (9.05)	37.45 (14.2)	0.794
Pressão Arterial Sistólica (mmHg)	120	120 (10)	120 (10)	0.231
Pressão Arterial Diastólica (mmHg)	80	80 (0)	80 (0)	0.447
Insulina (μU/mL)	2 - 23	10 (4.19)	11.94 (12.83)	0.114
HOMA-IR	< 2.15	2.31 (0.66)	3.89 (3.71)	0.008
HOMA-β	167 - 175	116.1 (72.95)	72.34 (40.69)	0.001
Glicose (mg/dL)	≤ 99	92 (5.4)	119.2 (39.3)	<0.001
HbA1c (%)	≤ 5.6	5.55 (0.6)	6.1 (1.9)	0.003
Triglicérides (mg/dL)	< 150	108.6 (68.7)	134.05 (103.8)	0.065
Colesterol Total (mg/dL)	< 200	172 (52.3)	176.4 (70.6)	0.894
HDL-Colesterol (mg/dL)	> 55	43.7 (13)	42.5 (16.2)	0.864
LDL-Colesterol (mg/dL)	< 100	106 (47)	95 (49)	0.563
VLDL-Colesterol (mg/dL)	< 30	22 (13)	26.5 (20)	0.097
AST (U/L)	5 - 40	22.1 (6.6)	20.6 (6.5)	0.576
ALT (U/L)	0 - 50	19.2 (8.2)	18.85 (16.65)	0.291
LDH (UI/L)	120 - 246	193 (36)	183 (41)	0.591
Proteína C Reativa (mg/L)	5	0.16 (0.29)	0.22 (0.33)	0.573
Creatinina (mg / dL)	0.5 - 1.1	1.03 (0.28)	1.02 (0.25)	0.386
Ureia (mg/dL)	13 - 43	33.1 (11.5)	31.2 (7.4)	0.566
Ácido Úrico (mg / dL)	6	5.55 (1.65)	5.7 (2)	0.987
Bilirrubina Direta (mg / dL)	0.1 - 0.4	0.22 (0.08)	0.22 (0.1)	0.475
Bilirrubina Indireta (mg / dL)	0.1 - 0.7	0.41 (0.2)	0.38 (0.21)	0.541
Bilirrubina Total (mg / dL)	0.2 - 1.1	0.63 (0.3)	0.58 (0.25)	0.500
Bilirrubina Direta/Bilirrubina Total	-	0.35 (0.06)	0.34 (0.06)	0.574
Bilirrubina Indireta/Bilirrubina Total	-	0.65 (0.06)	0.66 (0.06)	0.894
Ferro (mg/dL)	-	115.33 (47.21)	99.6 (38.28)	0.036
Ferritina (ng/mL)	11 - 306	190.45 (207.4)	265.85 (292)	0.137
TSI (%)	20 - 55	38.39 (16.78)	34.06 (16.11)	0.072
TIBC (μg/dL)	250 - 425	297.86 (34.13)	293.64 (60.85)	0.673
Vitamina B <sub>9</sub> (ng/mL)	> 5.4	10.63 (5.33)	10.91 (5.14)	0.246
Vitamina B <sub>12</sub> (pg/mL)	211 - 911	403 (172.8)	397.15 (160.6)	0.885
Vitamina D (ng/mL)	> 30	33.14 (11.27)	33.07 (10.35)	0.436
Hemoglobina (g/dL)	12 - 16	14.7 (1.6)	15.1 (2.3)	0.396
Hematócrito (%)	36.0 - 47.0	42.2 (4.5)	43.65 (4.7)	0.198
RBC (milhão/mm <sup>3</sup> )	4.00 - 5.60	4.8 (0.6)	5 (0.7)	0.249
MCV (fL)	82.0 - 94.0	87 (7.9)	86.9 (6.4)	0.883
MCH (pg)	27.0 - 33.0	30.6 (2.4)	30.25 (2.3)	0.776
MCHC (mmol/L)	32.0 - 37.0	34.7 (1.1)	34.4 (1.4)	0.454
RDW (%)	11.0 - 16.5	13.2 (0.9)	13 (0.9)	0.812
Índice de Reticulócitos (%)	0.5 - 1.5	0.8 (1.1)	1 (1.3)	0.257
Contagem de Leucócitos (10 <sup>9</sup> células/L)	4.5 - 10.0	5.7 (1.6)	6.35 (2.2)	0.248
Porcentagem de Linfócitos	20 - 40	31.8 (8.5)	31.95 (12.5)	0.490

Porcentagem de Monócitos	3 - 10	8.6 (2.9)	8.65 (3)	0.992
Contagem de Plaquetas (10 <sup>9</sup> células/L)	150 - 400	208 (63)	220 (87)	0.451
Volume Médio de Plaquetas (fL)	8.14 - 12.24	10.4 (0.5)	10.1 (1.4)	0.898
A <sub>min</sub> (ΔOD)	-	0 (0.01)	0.01 (0.02)	0.314
A <sub>max</sub> (ΔOD)	-	1.23 (0.16)	1.26 (0.16)	0.467
H <sub>0</sub> (g/dL NaCl)	-	2.46 (0.31)	2.53 (0.33)	0.454
H <sub>50</sub> (g/dL NaCl)	-	0.44 (0.02)	0.44 (0.03)	0.548
H <sub>100</sub> (g/dL NaCl)	-	0.41 (0.03)	0.41 (0.03)	0.850
dX (g/dL NaCl)	-	0.02 (0)	0.01 (0)	0.169
dX/H <sub>50</sub> (g/dL NaCl)	-	0.03 (0.01)	0.03 (0.01)	0.195
dX/A <sub>min</sub> (g/dL NaCl)	-	1.23 (2.92)	1.09 (1.7)	0.941

**Abreviaturas:** HOMA-IR, Modelo de Avaliação da Homeostase na Resistência à Insulina (HOMA-IR); HOMA-β, Modelo de Avaliação da Homeostase na Função das Células β; HbA1c, hemoglobina glicada A1c; HDL, lipoproteína de alta densidade; LDL, lipoproteína de baixa densidade; VLDL, lipoproteína de densidade muito baixa; ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; LDH, lactato desidrogenase; TSI, índice de saturação da transferrina; TIBC, capacidade total de ligação de ferro; MCV, volume corpuscular médio; MCH, hemoglobina corpuscular média; MCHC, concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW, largura de distribuição de volume de eritrócitos; A<sub>min</sub>, absorbância a 540 nm associada à lise residual da população de eritrócitos; A<sub>max</sub>, absorbância a 540 nm associada à lise de toda a população de eritrócitos; H<sub>0</sub>, concentração salina onde começa a hemólise *in vitro*; H<sub>50</sub>, concentração salina capaz de promover 50% de hemólise; H<sub>100</sub>, concentração salina onde termina a lise *in vitro*; dX, variação da concentração de NaCl responsável pela hemólise total.

\* p < 0,05 indica diferença estatisticamente significativa. Os valores são apresentados em mediana (intervalo interquartil). O teste de Mann-Whitney foi usado para comparação entre os grupos.



**Figura 2.** Valores do coeficiente  $\rho$  de Spearman para as correlações entre pares de parâmetros do grupo hiperglicêmico. **Abreviações:** HbA1c, hemoglobina glicada A1c; HOMA-IR, Modelo de Avaliação da Homeostase na Resistência à Insulina; HOMA- $\beta$ , Modelo de Avaliação da Homeostase na Função das Células  $\beta$ ; TGC, triglicérides; HDL, lipoproteína de alta densidade; LDL, lipoproteína de baixa densidade; VLDL, lipoproteína de densidade muito baixa; AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase; LDH, lactato desidrogenase; DB, bilirrubina direta; IB, bilirrubina indireta; TB, Bilirrubina Total; CRP, Proteína C Reativa; TSI, índice de saturação da transferrina; TIBC, capacidade total de ligação de ferro; Ht, hematócrito; RBC, glóbulos vermelhos; MCV, volume corpuscular médio; MCH, hemoglobina corpuscular média; MCHC, concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW, largura de distribuição de volume de eritrócitos; Rtc, reticulócitos;  $A_{min}$ , absorvância a 540 nm associada à lise residual da população de eritrócitos;  $A_{max}$ , absorvância a 540 nm associada à lise de toda a população de eritrócitos;  $H_0$ , concentração salina onde começa a hemólise in vitro;  $H_{50}$ , concentração salina capaz de promover hemólise de 50%;  $H_{100}$ , concentração salina onde termina a lise in vitro; dX, variação da concentração de NaCl responsável pela hemólise total.

## DISCUSSÃO

Em comparação aos homens normoglicêmicos, os homens hiperglicêmicos apresentaram valores significativamente maiores de HbA1c e de HOMA-IR, além de valores significativamente menores de HOMA- $\beta$ , embora os níveis de insulina entre os grupos não tenham sido significativamente diferentes (Tabela 1). Esses resultados eram esperados, uma vez que valores elevados de glicose estão associados às diferentes etapas da quebra da homeostase da glicose na história natural do *diabetes mellitus*.

Além disso, nossos resultados revelaram a presença de níveis significativamente menores de ferro no grupo de homens hiperglicêmicos (Tabela 1). Isso merece preocupação, uma vez que a fração glicada da hemoglobina designada como HbA1c – a qual é usada na rotina clínica para avaliação dos níveis estacionários de glicose durante o período de meia-vida dos eritrócitos – sofre a influência de eritropatias como a IDA (Guo, Zhou et al. 2019).

Segundo English et al. (2015), em sua revisão sistemática, a IDA pode levar à elevação espúria de HbA1c, embora a deficiência de ferro sem ocorrência de IDA pode levar à diminuição de HbA1c (English, Idris et al. 2015).

Em nosso estudo, níveis mais elevados de HbA1c foram observados nos voluntários hiperglicêmicos com menores níveis de ferro (Figura 2), embora os níveis de marcadores do *status* de ferro e os parâmetros do eritrograma estivessem dentro da normalidade (Tabela 1), ou seja, sem evidência de IDA.

Entretanto, os aumentos nos níveis sanguíneos de HbA1c com a diminuição dos níveis de ferro e da razão entre bilirrubina indireta (IB) e bilirrubina total (TB) (Figura 2) associam os valores elevados de HbA1c com a tendência à anemia e a diminuição da fração de bilirrubina não-conjugada, em função da desaceleração do catabolismo do grupo heme da hemoglobina, possivelmente como uma resposta do organismo à diminuição dos níveis de ferro. Além disso, a associação de maiores valores de HbA1c com menores valores de MCH e MCV sustentam a associação da elevação de HbA1c com tendência à anemia microcítica (Figura 2).

Embora a tendência à elevação de HbA1c com a diminuição dos níveis de ferro ser conhecida (English, Idris et al. 2015), os mecanismos que explicam esse

fato ainda permanecem incertos. O estudo de Brooks et al. (1980) hipotetizou que na deficiência de ferro ocorreria alteração na estrutura quaternária da hemoglobina e maior rapidez no processo de glicação da cadeia de globina (Brooks, Metcalfe et al. 1980). Dado que o processo de glicação da hemoglobina é irreversível, os níveis de HbA1c nos eritrócitos aumentariam com o aumento da idade da célula. Interessantemente, na deficiência de ferro a produção de eritrócitos diminui, o que levaria a aumento da idade média das células vermelhas circulantes e, conseqüentemente, a aumento nos níveis de HbA1c (Sluiter, Van Essen et al. 1980). Em indivíduos com hiperglicemia, particularmente, como é o caso de nosso estudo, essa explicação carece de consenso diante das alegações de diminuição (Huang, Liu et al. 2018) e mesmo aumento (Wu, Lin et al. 2017) na meia-vida de eritrócitos. Porém, a associação da elevação de HbA1c com a desaceleração do catabolismo do grupo heme da hemoglobina sugere que a meia-vida de eritrócitos possa de fato estar sendo estendida no grupo hiperglicêmico.

Outra possível explicação é a ligação do estado inflamatório de baixo grau apresentado na obesidade com a deficiência de ferro (Wang, Fang et al. 2015). Citocinas inflamatórias, como a interleucina-6, que está associada à superexpressão de hepcidina, levaria à diminuição da absorção de ferro por enterócitos (Tussing-Humphreys, Pustacioglu et al. 2012).

Embora os parâmetros antropométricos e o marcador inflamatório aqui utilizado, a CRP, não tenham apresentado diferença no grupo hiperglicêmico em relação ao normoglicêmico, a diminuição nos níveis de ferro e o aumento na resistência à insulina (HOMA-IR) (Tabela 1) foram associados a aumento nos níveis sanguíneos de proteína C-reativa (CRP) (Figura 2), indicando que a quebra na homeostase do ferro também está associada ao processo inflamatório vinculado à resistência à insulina.

A relação da quebra da homeostase do ferro com o status inflamatório é uma questão complexa que parece estar envolvida no próprio desenvolvimento do diabetes tipo 2. Em sua revisão sistemática com meta-análise, Liu et al. (2020) mostraram associação de níveis elevados de ferritina com maior risco de diabetes tipo 2 (Liu, Li et al. 2020). Isso não é surpreendente, uma vez que a ferritina é considerada mais como um marcador de inflamação do que um indicador do

*status* de ferro em indivíduos com sobrepeso e/ou obesos, nos quais uma ferritina elevada em consequência de uma inflamação subclínica pode até mesmo mascarar uma deficiência subjacente de ferro (Khan, Khan et al. 2016). Porém o estudo de Liu et al. também mostrou que a razão entre o receptor solúvel de transferrina e a ferritina foi inversamente relacionada com o risco de diabetes tipo 2 (Liu, Li et al. 2020). Uma vez que o receptor solúvel sérico de transferrina frequentemente se liga à transferrina sérica no transporte de ferro do exterior para o interior da célula, refletindo o armazenamento intracelular de ferro (Garcia and Diaz-Castro 2013), isso faz sentido, pois a transferrina sérica também pode induzir lipólise nos adipócitos, aumentando os níveis de ácidos graxos livres, que levariam à resistência à insulina e a por último à prejuízo na função secretória do pâncreas (Huth, Beuerle et al. 2015).

Como a diminuição na razão IB/TB, embora não tenha sido significativamente diferente no grupo hiperglicêmico em relação ao normoglicêmico, também foi associada a aumento nos níveis sanguíneos de proteína C-reativa (CRP), isto significa que a quebra na homeostase de eritrócitos também está associada ao processo inflamatório vinculado à resistência à insulina.

No presente estudo, o grupo de hiperglicêmicos apresentou uma pior função das células  $\beta$  pancreáticas, dado pelo valor significativamente menor da mediana de HOMA- $\beta$  em relação ao grupo de normoglicêmicos (Tabela 1), refletindo efeitos de longo prazo da glicotoxicidade, lipotoxicidade e agressão oxidativa, associados à hiperglicemia, sobre as células  $\beta$  pancreáticas (Remedi, Emfinger et al. 2016).

É possível que a deficiência de ferro também tenha ligação com a piora da função das células  $\beta$  pancreáticas. O ferro parece ser fundamental para a secreção normal de insulina por estas células, mas seu mecanismo nesse processo ainda não é conhecido (Backe, Moen et al. 2016, Fu, Zhou et al. 2017).

Entretanto, em nosso estudo, a diminuição dos níveis de ferro não foi associada a alterações em HOMA- $\beta$  (Figura 2), embora o aumento em HOMA- $\beta$  (Tabela 1) tenha sido associado a diminuição de TIBC e aumento de ferritina (Figura 2), indicando associação da secreção de insulina à homeostase do ferro. De fato, associação positiva moderada tem sido descrita entre níveis de insulina e

de ferritina (Van Campenhout, Van Campenhout et al. 2006, Bonfils, Ellervik et al. 2015). É possível que tal elevação de insulina com o aumento nos níveis de ferritina não reflita efetivamente uma influência dos níveis de ferritina na secreção de insulina, mas sim nos mecanismos subjacentes à resistência à insulina. Pelo menos é isso que sugere a associação positiva entre ferritina e HOMA-IR observada em nosso estudo (Figura 2).

Ademais, as associações de valores elevados de HOMA-IR com níveis elevados de triglicérides (TGC), VLDL-colesterol (VLDL-C), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), ácido úrico (UA), e ferritina, certamente são decorrentes de implicações regulatórias (elevações de TGC e VLDL-C) e vinculações inflamatórias (elevações de ALT, AST, UA e ferritina) da resistência à insulina.

Embora os parâmetros de estabilidade osmótica de eritrócitos não tenham sido significativamente diferentes entre os grupos, algumas correlações merecem menção. A correlação positiva entre dX e RDW (Figura 2), por exemplo, que indica aumento da estabilidade osmótica com o aumento da heterogeneidade de volumes dos eritrócitos, como observado por Knychala et al. (Knychala, Garrote-Filho et al. 2020) e por Batista-da-Silva (Batista-da-Silva 2020). De fato, o RDW aumentaria devido ao aumento do número de eritrócitos menores e com menor teor de hemoglobina em decorrência da diminuição dos níveis de ferro, resultando em aumento da estabilidade osmótica (Batista-da-Silva 2020, Knychala, Garrote-Filho et al. 2020). Além disso, as correlações positivas de dX e dX/H50 com a razão IB/TB (Figura 2) indicam elevação da estabilidade osmótica com a diminuição da degradação do grupo heme da hemoglobina.

Dentre os aspectos fortes deste estudo, destacamos a análise de um amplo conjunto de variáveis que podem ser afetadas ou exercer influência diante da história natural do diabetes. Dentre os aspectos fracos do estudo, destacamos o tamanho limitado da amostra estudada.

Em face dos resultados aqui apresentados, é importante destacar que embora a tendência à deficiência de ferro esteja associada a maiores níveis de HbA1c, esses níveis podem ser regularizados com suplementação desse mineral (English, Idris et al. 2015, Rajagopal, Ganapathy et al. 2017, Urrechaga, Research

et al. 2018), o que seria desejável antes do estabelecimento de diagnósticos de pré-diabetes e diabetes (Ng, Cooke et al. 2010).

Muito além dessa preocupação diagnóstica, a avaliação de indicadores da homeostase do ferro e de inflamação devem constituir uma preocupação constante na prática clínica, dado o seu envolvimento na fisiopatologia do diabetes tipo 2 e das doenças cerebrocardiovasculares, uma vez que eles podem ser relevantes no estabelecimento de estratégias de prevenção e na análise de risco dessas doenças (Justi, Tatsch et al. 2019). Dentre esses indicadores, é importante considerar os próprios parâmetros do eritrograma. De fato, um trabalho recente mostrou que o produto da contagem de eritrócitos pelo valor do hematócrito pode ser usado como um novo indicador de alteração no estado da glicemia de jejum (Feng, Chen et al. 2020).

## CONCLUSÃO

No presente estudo, os homens hiperglicêmicos, que apresentaram maiores concentrações plasmáticas de Hb1Ac, maior resistência à insulina e pior função das células  $\beta$  pancreáticas, características que refletem a história natural do diabetes mellitus tipo 2, apresentaram também menores níveis de ferro.

O aumento dos níveis sanguíneos de HbA1c foi associado a aumento da resistência à insulina e da glicemia e diminuição dos níveis de ferro e da fração de bilirrubina não-conjugada, certamente em decorrência da desaceleração da degradação do grupo heme da hemoglobina.

A diminuição dos níveis de ferro, mas também da fração de bilirrubina não-conjugada, e o aumento na resistência à insulina (HOMA-IR) foram associados a aumento nos níveis sanguíneos de proteína C-reativa (CRP), indicando que as alterações na homeostase do ferro – com diminuição dos níveis de ferro – e de eritrócitos – com diminuição na degradação do grupo heme da hemoglobina – também estão associadas ao processo inflamatório vinculado à resistência à insulina.

De todo modo, independentemente dessas implicações patofisiológicas, os resultados deste estudo revelam que a utilização da hemoglobina glicada para diagnóstico e monitoramento do diabetes deve considerar o status de ferro do indivíduo.

## REFERÊNCIAS

- Association, A. D. (2010). "Standards of medical care in diabetes—2010." *Diabetes care* **33**(Supplement 1): S11-S61. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/dc10-S011>
- Attard, S. M., A. H. Herring, H. Wang, A. G. Howard, A. L. Thompson, L. S. Adair, E. J. Mayer-Davis and P. Gordon-Larsen (2015). "Implications of iron deficiency/anemia on the classification of diabetes using HbA1c." *Nutr Diabetes* **5**: e166. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nutd.2015.16>
- Backe, M. B., I. W. Moen, C. Ellervik, J. B. Hansen and T. J. A. r. o. n. Mandrup-Poulsen (2016). "Iron regulation of pancreatic beta-cell functions and oxidative stress." **36**: 241-273. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071715-050939>
- Batista-da-Silva, B. (2020). Elevation of HbA1c in hyperglycemic women with decreased iron involves increased osmotic stability and volume variability (RDW) of red cells. M.Sc., Federal University of Uberlândia. Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.641>
- Berbudi, A., N. Rahmadika, A. I. Tjahjadi and R. J. C. d. r. Ruslami (2020). "Type 2 diabetes and its impact on the immune system." **16**(5): 442. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1573399815666191024085838>
- Bernardino Neto, M., T. Arantes, I. Jordão, J. da Costa Huss, T. de Souza, V. de Souza Penha, S. da Silva, P. de Souza, M. Tavares and N. J. B. Penha-Silva (2013). "Bivariate and multivariate analyses of the correlations between stability of the erythrocyte membrane, serum lipids and hematological variables." **50**(5-6): 305-320. Disponível em: <https://doi.org/10.3233/BIR-130641>
- Bonfils, L., C. Ellervik, N. Friedrich, A. Linneberg, C. H. Sandholt, M. E. Jørgensen, T. Jørgensen, T. Hansen, O. Pedersen and K. H. J. D. Allin (2015). "Fasting serum levels of ferritin are associated with impaired pancreatic beta cell function and decreased insulin sensitivity: a population-based study." **58**(3): 523-533. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3469-4>
- Bouri, S. and J. Martin (2018). "Investigation of iron deficiency anaemia." *Clinical Medicine* **18**(3): 242-244. Disponível em: <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.18-3-242>
- Brooks, A., J. Metcalfe, J. Day and M. J. L. Edwards (1980). "Iron deficiency and glycosylated haemoglobin A1." (8186). Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(80\)90019-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(80)90019-7)
- Cetinkaya Altuntas, S., M. Evran, E. Gurkan, M. Sert and T. Tetiker (2020). "HbA1c level decreases in iron deficiency anemia." *Wien Klin Wochenschr*. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00508-020-01661-6>
- Chifman, J., R. Laubenbacher and S. V. Torti (2014). A systems biology approach to iron metabolism. *A Systems Biology Approach to Blood*, Springer: 201-225. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2095-2\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2095-2_10)
- Christy, A. L., P. A. Manjrekar, R. P. Babu and A. Hegde (2014). "Influence of iron deficiency anemia on hemoglobin A1c levels in diabetic individuals with controlled plasma glucose levels." *Iranian biomedical journal* **18**(2): 88. Disponível em: [10.6091 / ibj.1257.2014](https://doi.org/10.6091/ibj.1257.2014)
- Dev, S. and J. L. Babitt (2017). "Overview of iron metabolism in health and disease." *Hemodialysis International* **21**: S6-S20. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/hdi.12542>

Dullaart, R. P., W. Annema, J. F. de Boer and U. J. Tietge (2012). "Pancreatic beta-cell function relates positively to HDL functionality in well-controlled type 2 diabetes mellitus." *Atherosclerosis* **222**(2): 567-573. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.03.037>

English, E., I. Idris, G. Smith, K. Dhatariya, E. S. Kilpatrick and W. G. J. D. John (2015). "The effect of anaemia and abnormalities of erythrocyte indices on HbA 1c analysis: a systematic review." **58**(7): 1409-1421. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3599-3>

Feng, L., H. Chen, J. Chen, C. Xiong, X. Shao, X. Wang, J. Ning, Z. Xiang, X. Wang, T. Chen, H. Xiao, H. Tang, X. Li, G. Hong and H. Zou (2020). "The Product of Red Blood Cells and Hematocrit Can Be Used as a Novel Indicator of Impaired Fasting Blood Glucose Status." *Diabetes Metab Syndr Obes* **13**: 4007-4015. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/DMSO.S270276>

Flyvbjerg, A. (2017). "The role of the complement system in diabetic nephropathy." *Nature Reviews Nephrology* **13**(5): 311. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.31>

Fu, S., S. Zhou, L. Luo and P. J. C. i. i. a. Ye (2017). "Relationships of pancreatic beta-cell function with microalbuminuria and glomerular filtration rate in middle-aged and elderly population without type 2 diabetes mellitus: a Chinese community-based analysis." **12**: 753. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/CIA.S134496>

Garcia, Y. and J. Diaz-Castro (2013). "Advantages and disadvantages of the animal models v. in vitro studies in iron metabolism: a review." *Animal* **7**(10): 1651-1658. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S1751731113001134>

Guo, W., Q. Zhou, Y. Jia, J. J. M. s. m. i. m. j. o. e. Xu and c. research (2019). "Increased Levels of Glycated Hemoglobin A1c and Iron Deficiency Anemia: A Review." **25**: 8371. Disponível em: <https://doi.org/10.12659/MSM.916719>

Heng, L., O. Comyn, T. Peto, C. Tadros, E. Ng, S. Sivaprasad and P. Hykin (2013). "Diabetic retinopathy: pathogenesis, clinical grading, management and future developments." *Diabetic Medicine* **30**(6): 640-650. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/dme.12089>

Huang, Z., Y. Liu, Y. Mao, W. Chen, Z. Xiao and Y. Yu (2018). "Relationship between glycated haemoglobin concentration and erythrocyte survival in type 2 diabetes mellitus determined by a modified carbon monoxide breath test." *J Breath Res* **12**(2): 026004. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/1752-7163/aa9081>

Huth, C., S. Beuerle, A. Zierer, M. Heier, C. Herder, T. Kaiser, W. Koenig, F. Kronenberg, K. Oexle, W. Rathmann, M. Roden, S. Schwab, J. Seissler, D. Stockl, C. Meisinger, A. Peters and B. Thorand (2015). "Biomarkers of iron metabolism are independently associated with impaired glucose metabolism and type 2 diabetes: the KORA F4 study." *Eur J Endocrinol* **173**(5): 643-653. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/EJE-15-0631>

Ikeda, M. and R. Shimazawa (2019). "Challenges to hemoglobin A1c as a therapeutic target for type 2 diabetes mellitus." *Journal of General and Family Medicine*. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jgf2.244>

Intra, J., G. Limonta, F. Cappellini, M. Bertona, P. J. D. Brambilla and m. journal (2019). "Glycosylated hemoglobin in subjects affected by iron-deficiency anemia." **43**(4): 539-544. Disponível em: <https://doi.org/10.4093/dmj.2018.0072>

- Justi, A., P. Tatsch and L. O. J. A. H. S. Siqueira (2019). "Ferritina: biomarcador de doenças cardiovasculares em pacientes diabéticos." **44**(1). Disponível em: <https://doi.org/10.22533/at.ed.7991907107>
- Khan, A., W. M. Khan, M. Ayub, M. Humayun and M. Haroon (2016). "Ferritin Is a Marker of Inflammation rather than Iron Deficiency in Overweight and Obese People." J Obes **2016**: 1937320. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2016/1937320>
- Kim, C., K. M. Bullard, W. H. Herman and G. L. J. D. c. Beckles (2010). "Association between iron deficiency and A1C Levels among adults without diabetes in the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999–2006." **33**(4): 780-785. <https://doi.org/10.2337/dc09-0836>
- Knychala, M. A., M. S. Garrote-Filho, B. Batista da Silva, S. Neves de Oliveira, S. Yasminy Luz, M. O. Marques Rodrigues and N. Penha-Silva (2020). "Red cell distribution width and erythrocyte osmotic stability in type 2 diabetes mellitus." J Cell Mol Med. **00**: 1-12. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jcmm.16184>
- Kung, C. M., Z. L. Tseng and H. L. Wang (2009). "Erythrocyte fragility increases with level of glycosylated hemoglobin in type 2 diabetic patients." Clin Hemorheol Microcirc **43**(4): 345-351. Disponível em: <https://doi.org/10.3233/CH-2009-1245>
- Lemos, G. S. D., L. F. Márquez-Bernardes, L. R. Arvelos, L. F. Paraíso and N. Penha-Silva (2011). "Influence of glucose concentration on the membrane stability of human erythrocytes." Cell biochemistry and biophysics **61**(3): 531-537. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12013-011-9235-z>
- Liu, J., Q. Li, Y. Yang and L. J. J. o. d. i. Ma (2020). "Iron metabolism and type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis and systematic review." **11**(4): 946-955. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jdi.13216>
- Lontchi-Yimagou, E., E. Sobngwi, T. E. Matsha and A. P. J. C. d. r. Kengne (2013). "Diabetes mellitus and inflammation." **13**(3): 435-444. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11892-013-0375-y>
- Matthews, D. R., J. P. Hosker, A. S. Rudenski, B. A. Naylor, D. F. Treacher and R. C. Turner (1985). "Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man." Diabetologia **28**(7): 412-419. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00280883>
- McNamee, A. P., J. T. Horobin, G. D. Tansley and M. J. Simmonds (2018). "Oxidative Stress Increases Erythrocyte Sensitivity to Shear-Mediated Damage." Artif Organs **42**(2): 184-192. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/aor.12997>
- Mohandas, N. and P. G. Gallagher (2008). "Red cell membrane: past, present, and future." Blood **112**(10): 3939-3948. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-161166>
- Ng, J. M., M. Cooke, S. Bhandari, S. L. Atkin and E. S. J. D. c. Kilpatrick (2010). "The effect of iron and erythropoietin treatment on the A1C of patients with diabetes and chronic kidney disease." **33**(11): 2310-2313. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/dc10-0917>
- NM Weijers, R. (2012). "Lipid composition of cell membranes and its relevance in type 2 diabetes mellitus." Current diabetes reviews **8**(5): 390-400. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/157339912802083531>
- Penha-Silva, N., C. B. Firmino, F. G. de Freitas Reis, J. C. da Costa Huss, T. M. T. de Souza, M. V. de Freitas, R. d. C. M. J. M. o. a. Netto and development (2007). "Influence

of age on the stability of human erythrocyte membranes." **128**(7-8): 444-449. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mad.2007.06.007>

Rajagopal, L., S. Ganapathy, V. R. Sundaram Arunachalam, B. J. J. o. c. Ramraj and d. r. JCDR (2017). "Does iron deficiency anaemia and its severity influence HbA1C level in non diabetics? An analysis of 150 cases." **11**(2): EC13. Disponível em: <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/25183.9464>

Remedi, M. S., C. J. D. Emfinger, Obesity and Metabolism (2016). "Pancreatic  $\beta$ -cell identity in diabetes." **18**: 110-116. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/dom.12727>

Sacks, D. B. (2012). "Measurement of Hemoglobin A1c: A new twist on the path to harmony." Diabetes care **35**(12): 2674-2680. Disponível em: <https://doi.org/10.2337/dc12-1348>

Sinha, N., T. Mishra, T. Singh and N. J. A. o. l. m. Gupta (2012). "Effect of iron deficiency anemia on hemoglobin A1c levels." **32**(1): 17-22. Disponível em: <https://doi.org/10.3343/alm.2012.32.1.17>

Sluiter, W., L. Van Essen, W. Reitsma and H. J. T. L. Doorenbos (1980). "Glycosylated haemoglobin and iron deficiency." **316**(8193): 531-532. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(80\)91853-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(80)91853-X)

Soliman, A. T., V. S. De, M. Yassin and N. Soliman (2017). "Iron deficiency anemia and glucose metabolism." Acta bio-medica: Atenei Parmensis **88**(1): 112-118. Disponível em: <https://doi.org/10.23750 / abm.v88i1.6049>

Szablewski, L. and A. Sulima (2017). "The structural and functional changes of blood cells and molecular components in diabetes mellitus." Biological chemistry **398**(4): 411-423. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0196>

Tussing-Humphreys, L., C. Pustacioglu, E. Nemeth, C. J. J. o. t. A. o. N. Braunschweig and Dietetics (2012). "Rethinking iron regulation and assessment in iron deficiency, anemia of chronic disease, and obesity: introducing hepcidin." **112**(3): 391-400. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jada.2011.08.038>

Urrechaga, E. J. D., M. S. C. Research and Reviews (2018). "Influence of iron deficiency on Hb A1c levels in type 2 diabetic patients." **12**(6): 1051-1055. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.06.024>

Van Campenhout, A., C. Van Campenhout, A. R. Lagrou, P. Abrams, G. Moorkens, L. Van Gaal, B. J. D. m. r. Manuel-y-Keenoy and reviews (2006). "Impact of diabetes mellitus on the relationships between iron-, inflammatory-and oxidative stress status." **22**(6): 444-454. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/dmrr.635>

Vinik, A. I., M.-L. Nevoret, C. Casellini and H. Parson (2013). "Diabetic neuropathy." Endocrinology and Metabolism Clinics **42**(4): 747-787. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2013.06.001>

Wang, X., X. Fang, F. J. R. i. E. Wang and M. Disorders (2015). "Pleiotropic actions of iron balance in diabetes mellitus." **16**(1): 15-23. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11154-014-9303-y>

Wu, L., H. Lin, J. Gao, X. Li, M. Xia, D. Wang, Q. Aleteng, H. Ma, B. Pan and X. Gao (2017). "Effect of age on the diagnostic efficiency of HbA1c for diabetes in a Chinese middle-aged and elderly population: The Shanghai Changfeng Study." PLoS One **12**(9): e0184607. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184607>

Ye, S., P. Ruan, J. Yong, H. Shen, Z. Liao and X. Dong (2016). "The impact of the HbA1c level of type 2 diabetics on the structure of haemoglobin." *Sci Rep* **6**: 33352. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/srep33352>