

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**Excesso de ferro altera o *status oxidativo*, a homeostase de
colesterol e glicose e a expressão de PPAR- α em hamsteres.**

AUTORA: Larissa de Freitas bonomo

ORIENTADORA: PROF.^a Dr.^a Maria Lúcia Pedrosa

CO-ORIENTADOR: PROF. Dr. Marcelo Eustáquio Silva

CO-ORIENTADORA: PROF.^a Dr.^a Riva de Paula Oliveira

OURO PRETO

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**Excesso de ferro altera o *status oxidativo*, a homeostase de
colesterol e glicose e a expressão de PPAR- α em hamsteres.**

AUTORA: Larissa de Freitas bonomo

ORIENTADORA: PROF.^a Dr.^a Maria Lúcia Pedrosa

CO-ORIENTADOR: PROF. Dr. Marcelo Eustáquio Silva

CO-ORIENTADORA: PROF.^a Dr.^a Riva de Paula Oliveira

*Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Ouro Preto, como parte
integrante dos requisitos para a obtenção
do título de Mestre, em Ciências Biológicas,
área de concentração: Bioquímica
Estrutural e Fisiológica.*

OURO PRETO

2010

Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular** e no
Laboratório de Nutrição Experimental do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Ouro Preto, com auxílio da *CAPES, FAPEMIG E UFOP*.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,
Maria da Conceição de Souza Freitas
e Élido Bonomo pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Aos meus professores e orientadores **Maria Lúcia Pedrosa e Marcelo Eustáquio Silva**, pela confiança, dedicação e constante estímulo. Mais do que orientadores são amigos, pessoas maravilhosas pelas quais tenho grande admiração. Sou grata por ter tido a oportunidade de conhecer e conviver.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por olhar por mim e guiar os meus passos.

Aos **meus pais e ao meu irmão**, pelo apoio incondicional. Vocês são minha vida, meu exemplo e meu maior orgulho.

À **vovó Zélia**, pelas orações.

A todos os **meus familiares**, por sempre acreditarem em mim.

Ao **Heberth de Paula, Joyce, Maísa Silva e Melina**, grandes amigos. Meus exemplos profissionais a seguir.

Ao **Bruno da Cruz Pádua** por ser mais do que um colega da pós-graduação. Amigo para todas as ocasiões sendo estas boas ou ruins.

Aos **colegas da pós-graduação**, pela agradável convivência.

Ao **Jair Pastor Mota** e a **Maria Aparecida Reis Trópia**, pela dedicação e disponibilidade sempre.

À professora **Riva de Paula Oliveira**, pela orientação de toda a parte técnica e teórica das análises moleculares, pelo incentivo e amizade. Sua colaboração foi de extrema importância e marcou o início de grandes avanços.

À Professora **Daniela Caldeira Costa**, pelo auxílio e colaboração.

A todos os amigos do Laboratório de Nutrição Experimental e demais laboratórios, em especial à **Aline, Bárbara, Emerson, Fabiano, Fabrício, Fernanda, Flávia, Glaucy, Joamyr, Leandro, Lorena, Rogério, Sandra, Simone, Wanda e Washington** o meu agradecimento especial porque sem a ajuda de todos vocês este trabalho não teria sido possível.

Aos meus amigos queridos **Danille (Dadá), Fabiana Fioravante Coelho (Bi), Fabiane Ramos (Faby), Heloísa (bobs), Juliana (Juzão), Larissa de Alcântara Peixoto (Lalá), Regiane Aparecida Santos (Regi), Thaís (Tata)**, pela amizade eterna e por serem sempre presentes em minha vida.

À **República Nascente** pelo carinho. Minha eterna casa.

As **meninas lindas da República Vende-se (Alice, Camila, Débora, Lucila, Maíra, Mara, Marcela, Marina e Sara)**, por todos os momentos juntas e pela amizade enorme que temos. Morar com vocês foi fundamental.

RESUMO

Dietas ricas em lipídios, obesidade e estresse oxidativo estão relacionados ao desenvolvimento de diabetes tipo II e doenças cardiovasculares. Estoques elevados de ferro podem promover aumento da formação de radicais livres e do estresse oxidativo, assim favorecer o desenvolvimento destas doenças, como se observa em populações com estoques aumentados de ferro. Portanto, este estudo objetivou avaliar o efeito do excesso de ferro, da dieta rica em lipídios e da interação entre as duas variáveis sobre fatores de risco para doenças cardiovasculares: lipídios séricos, estresse oxidativo e glicemia. Além disso, analisamos a expressão de RNAm de genes relacionados ao metabolismo de lipídios e a produção de radicais livres por granulócitos. Cinquenta e dois Hamsters *Golden Syrian* machos foram divididos em quatro grupos: C e CF receberam dieta padrão e H e HF receberam dieta hipercolesterolemante. Os grupos CF e HF receberam injeções de ferro dextran (doses diárias de 10mg durante cinco dias) no 45º dia de experimento. Ao final de 60 dias os hamsters foram eutanasiados para coleta de sangue e tecidos. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA). Diferenças de $p < 0,05$ foram consideradas significativas. Como esperado a dieta rica em lipídios promoveu um aumento sérico do colesterol total e de suas frações, além de uma redução na atividade da paraoxonase (PON) e o tratamento com ferro aumentou os níveis séricos e hepáticos de ferro. Observou-se aumento da quantidade hepática de glutationa e da atividade sérica da superóxido dismutase bem como redução da atividade hepática da catalase nos grupos CF, H e HF, sendo o efeito mais pronunciado no grupo HF. O tratamento com ferro ainda aumentou a quantidade de TBARS no fígado e nos rins e a produção de radicais livres por granulócitos. O ferro potencializou o efeito hipercolesterolêmico da dieta, uma vez que o grupo HF apresentou valores séricos de colesterol total superiores ao H ($5,81 \pm 0,57$ e $4,59 \pm 0,32$ respectivamente). A análise de expressão gênica por qPCR de PPAR- α , receptor nuclear importante no controle da homeostase de lipídios e carboidratos, mostrou que o grupo HF apresentou expressão relativa menor que o grupo H. A homeostase de glicose também foi alterada: os animais que receberam tratamento com ferro apresentaram porcentagem de hemoglobina glicosilada superior aos animais não tratados, bem como apresentaram alterações na tolerância à glicose. Concluímos que o excesso de ferro aumenta o estresse oxidativo e interfere na homeostase de colesterol e glicose. Estes efeitos podem ser em parte atribuídos à diminuição na expressão do RNAm de PPAR- α .

ABSTRACT

Diets rich in lipids, obesity and stress are related to the development of type II diabetes and cardiovascular diseases. Iron overload increases formation of free radicals and oxidative stress, thus promoting the development of these diseases, as has been observed in populations with high iron stores. In this study we evaluated the effect of iron overload, high fat diet and the interaction between these two variables on risk factors for cardiovascular disease: serum lipids, oxidative stress and blood glucose. In addition, we also analyzed the expression level of genes related to lipid metabolism and free radical production by granulocytes. Fifty-two male Golden Syrian hamsters were divided into four groups: C and CI received a standard diet while H and HI received high fat diet. CI and HI groups were given injections of iron dextran (daily doses of 10mg for five days) at the 45th day of experiment. After 60 days, hamsters were euthanized and blood and tissue were collected for further investigation. Data were analyzed by variance analysis (ANOVA). $p < 0.05$ were considered significant. As expected the high fat diet caused an increase in total cholesterol and its fractions, and a reduction in paraoxonase activity (PON) and iron treatment increased serum and liver iron stores. There was an increase of hepatic glutathione levels and serum superoxide dismutase activity and a reduction of hepatic catalase activity in the CI groups, H and HI, which was more pronounced in the HI group. Iron treatment also increased the amount of liver and kidney TBARS and free radicals production by granulocytes. Iron acted synergically with the high fat diet, as HI group had serum total cholesterol higher than H (5.81 ± 0.57 and 4.59 ± 0.32 respectively). Gene expression analysis by qPCR of PPAR- α , important nuclear receptor in controlling lipid and carbohydrate homeostasis, showed that HI group had lower expression than H. Glucose homeostasis was also altered and the animals treated with iron showed greater glycated hemoglobin percentage than untreated animals, and had abnormal glucose tolerance. These data suggest that iron overload increases oxidative stress and interferes on cholesterol and glucose homeostasis. These effects can be, in part, attributed to the decreasing of PPAR- α expression.

SUMÁRIO

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1. Ferro e saúde	03
2.2. Estresse oxidativo, excesso de ferro e doenças	03
2.3. Metabolismo de ferro	06
2.3.1. Absorção intestinal de ferro	06
2.3.2. Transporte, captação e estoque de ferro	08
2.3.3. Regulação da homeostase do ferro	11
2.4. Situações em que ocorre excesso de ferro	14
2.5. Metabolismo de colesterol e doenças cardiovasculares	16
2.5.1. Síntese e transporte: o papel das lipoproteínas	16
2.5.2. Retroregulação da HMGCoA redutase e do receptor de LDL pelo colesterol	20
2.5.3. PPAR- α : papel na homeostase de lipídios e controle da resposta inflamatória.	21
3. JUSTIFICATIVA	23
4. OBJETIVOS	24
4.1. Objetivo geral	24
4.2. Objetivos específicos	24
5. MATERIAL E MÉTODOS	25
5.1. Animais	25
5.2. Dietas	25
5.3. Delineamento experimental	26
5.4. Dosagens dos parâmetros bioquímicos	27
5.5. Teste de tolerância oral à glicose	28
5.6. Produção de radicais livres por granulócitos <i>in vivo</i>	28
5.6.1. Isolamento de leucócitos polimorfonucleares	28
5.6.2. Ensaio de quimioluminescência	28
5.7. Análise da expressão de RNAm	29
5.7.1. Coleta do material	29
5.7.2. Extração de RNA total	29
5.7.3. Síntese de cDNA	29
5.7.4. Especificidade dos iniciadores para qPCR	29
5.7.5. PCR em tempo real (qPCR)	30
5.8. Análise estatística	32
6. RESULTADOS	33
6.1. Peso corporal e peso relativo dos órgãos	33
6.2. Biomarcadores de função hepática	34
6.3. Homeostase do ferro	35
6.4. Análise do status oxidativo	36
6.4.1. Defesas antioxidantes e biomarcadores do estresse oxidativo	36
6.4.2. Produção de espécies reativas de oxigênio por granulócitos <i>in vivo</i>	40
6.5. Perfil lipídico	41
6.5.1. Parâmetros bioquímicos séricos	41
6.5.2. Análise da expressão de RNAm de genes relacionados ao metabolismo de colesterol	42

6.5.2.1. Especificidade e eficiência dos iniciadores	43
6.5.2.2. Níveis de expressão relativa PPAR- α /beta-actina no fígado	47
6.6. Perfil glicêmico	48
7. DISCUSSÃO	51
8. CONCLUSÕES	66
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXO	86
Anexo I- Protocolo das dosagens bioquímicas	86
I.1. Alanina aminotransferase	86
I.2. Aspartato aminotransferase	89
I.3. Colesterol HDL	92
I.4. Colesterol total	93
I.5. Triacilgliceróis	95
I.6. Glicose	96
I.7. Hemoglobina	98
I.8. Hemoglobina glicosilada	100
I.9. Ferro sérico	102
I.10. Capacidade latente de ligação de ferro	104
I.11. Grupos sulfidrilas no soro	105
I.12. Paraoxonase-atividade arilesterásica	107
I.13. Paraoxonase-atividade paraoxonásica	108
I.14. Superóxido dismutase no soro	109
I.15. Concentração de glutationa total no fígado	110
I.16. Catalase	113
I.17. Proteína carbonilada	114
I.18. Proteínas totais em tecido-Método de Lowry	115
I.19. TBARS	117
I.20. Digestão e dosagem de ferro nos tecidos	117

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Composição das dietas Padrão e Hipercolesterolemante para hamsters, em gramas para cada 1000g de dieta.....	26
Tabela II: Iniciadores utilizados.....	31
Tabela 1: Peso inicial, peso final, ganho de peso e peso relativo do fígado e dos rins.....	33
Tabela 2: Peso relativo do tecido adiposo marrom (TAM), peso relativo do baço, peso relativo do coração, peso relativo do pâncreas e da gordura abdominal.....	34
Tabela 3: Atividade sérica da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST).....	35
Tabela 4: Concentração sérica de ferro, capacidade latente de ligação do ferro (CLLF), capacidade total de ligação do ferro (CTLF), concentração hepática de ferro e quantidade total de ferro no fígado.....	36
Tabela 5: Atividade hepática da catalase, concentração hepática de glutationa, quantidade total de glutationa no fígado e atividade sérica da superóxido dismutase (SOD).....	37
Tabela 6: Concentração hepática de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), quantidade total de TBARS no fígado, concentração hepática de proteína carbonilada, quantidade total de proteína carbonilada no fígado e concentração sérica de sulfidrilas totais.....	38
Tabela 7: Parâmetros relacionados ao estresse oxidativo e defesa antioxidante nos rins. Atividade da catalase, concentração de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), quantidade total de TBARS, concentração de proteína carbonilada, quantidade total de proteína carbonilada.....	39
Tabela 8: Concentração sérica de colesterol total, colesterol HDL, colesterol não-HDL, atividade sérica da Paraoxonase utilizando o substrato paraoxon (Pon-paraoxon) e o substrato fenilacetato (Pon-fenilacetato), e concentração sérica de triacilgliceróis.....	42
Tabela 9: Concentração de hemoglobina e porcentagem de hemoglobina glicosilada no sangue total e concentração sérica de glicose.....	49
Tabela 10: Glicemia de jejum, teste oral de tolerância à glicose após 30 minutos de ingestão de uma solução de glicose 2,5g/Kg (TOTG 30min) e teste oral de tolerância à glicose após 60 minutos (TOTG 60min) de ingestão de uma solução de glicose 2,5g/Kg.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura I: Mecanismos envolvidos na absorção intestinal de ferro.....	08
Figura II: Transporte de ferro nos hepatócitos.....	10
Figura III: A tradução do RNAm da ferritina é regulada por IRP.....	12
Figura IV: A degradação do RNAm do receptor da trasferrina (TfR) é regulada por IRP.....	13
Figura V: Transporte exógeno de colesterol e síntese <i>de novo</i>	18
Figura VI: Transporte reverso de colesterol.....	19
Figura VII: Ações do PPAR- α sobre a parede dos vasos e fígado.....	22
Figura 1: Produção de espécies reativas de oxigênio por granulócitos <i>in vivo</i>	40
Figura 2: Especificidade dos iniciadores.....	44
Figura 3: Especificidade dos iniciadores.....	45
Figura 4: Curva de amplificação.....	47
Figura 5: Níveis de expressão relativa PPAR- α / β -actina no fígado.....	48

ABREVIATURAS

- ALT- Alanina aminotransferase
AST- Aspartato aminotransferase
C- Grupo que recebeu dieta padrão
CAT- Catalase
CETP- Proteína transferidora de éteres de colesterol
CF- Grupo que recebeu dieta padrão e injeções de ferro dextran
CLLF- Capacidade latente de ligação do ferro
CTLF- Capacidade total de ligação do ferro
CYP7A1- Colesterol-7 α -hidroxilase
EROS- Espécies reativas de oxigênio
FA - Ácido graxo
FFA - Ácido graxo livre
FPN- Ferroportina
GSH-PX - Glutationa peroxidase
H- Grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiante
HDL- Lipoproteína de alta densidade
HIPER- Dieta hipercolesterolemiante
HF- Grupo que recebeu dieta hipercolesterolemiante e injeções de ferro dextran
HFE- Proteína da hemocromatose humana
HMGCoA redutase - HidroximetilglutarilcoenzimaA redutase
IDL- Lipoproteína de densidade intermediária
iNOS- Óxido nítrico sintase induzível
IRE- Elemento de resposta ao ferro
IRP- Proteína reguladora de ferro
LCAT - Lecitina-colesterol aciltransferase
LDL - Lipoproteína de baixa densidade
LDL-R - Receptor hepático da lipoproteína de baixa densidade
LPL- Lipase lipoprotéica
Nrf2- Fator nuclear derivado de eritróide 2
PL- Lipase pancreática
PON- Paraoxonase
PPARs- Receptores ativadores da proliferação peroxissomal

qPCR- PCR em tempo real

RQ- Remanescentes de quilomícrom

SOD- Superóxido dismutase

SRE- Elemento de resposta a esterol

SREBP- Proteína de ligação ao elemento de resposta a esterol

TBARS- Substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico

Tf - Transferrina

TfR receptor de transferrina

TG- Triacilgliceróis

TOTG- Teste oral de tolerância à glicose

VLDL- Lipoproteína de muito baixa densidade

1- INTRODUÇÃO

Espécies reativas de oxigênio (EROS) influenciam muitos processos fisiológicos incluindo, sistemas de defesa do hospedeiro, biossíntese hormonal, fertilização e sinalização celular. A produção aumentada de EROS e não balanceada pelas defesas antioxidantas (denominada como estresse oxidativo), tem sido relacionada ao desenvolvimento de várias patologias, incluindo hipertensão, aterosclerose, diabetes e doença renal crônica (Paravicini *et al.*, 2008).

Como mencionado, o termo estresse oxidativo descreve condições que envolvem níveis aumentados de EROS. Estas espécies reativas de oxigênio, também denominadas oxidantes, são produzidas como intermediários em reações de oxirredução que formam H₂O a partir de O₂, assim como ocorre na cadeia respiratória. As EROS estão compreendidas em dois grandes grupos: radicais livres (como, por exemplo, o ânion superóxido [·O₂⁻] e o radical hidroxil [·OH]) e não radicais derivados do O₂ (como, por exemplo, H₂O₂) (Dröge, 2002; Fridovich, 1997).

Agentes oxidantes não mitocondriais podem ser formados por vários mecanismos, dentre eles está a reação de Fenton, caracterizada pela degradação do H₂O₂ por íons de ferro bivalentes gerando radical hidroxil (·OH) (Gilca *et al.*, 2007).

Neste contexto o ferro atua como uma molécula pró-oxidante capaz de gerar espécies altamente reativas. Lucesoli *et al.* (1999) demonstraram que o excesso de ferro em ratos induz estresse oxidativo de maneira dependente da quantidade de ferro suplementada e também do consequente acúmulo tecidual.

Brandsch *et al.* (2002) demonstraram que dietas com altas concentrações de ácidos graxos insaturados estimulam a formação de produtos da oxidação de colesterol no fígado e que o excesso de ferro dietético simultâneo potencializa este efeito em ratos.

Cornejo *et al.* (2005) demonstraram que o excesso de ferro crônico obtido por suplementação dietética pode desencadear estresse oxidativo hepático em curto prazo, com aumento da expressão de iNOS (óxido nítrico sintase induzível) envolvendo a via de sinalização ERK/NF-κB (quinase regulada por sinal extracelular/fator nuclear kappa/B) em longo prazo em ratos.

Atualmente, práticas de suplementação indiscriminadas de ferro em alimentos têm sido frequentes. Este fato é preocupante, uma vez que estudos epidemiológicos têm estabelecido que a sobrecarga de ferro esteja associada ao aumento do risco para doenças cardiovasculares, pela promoção da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), uma lipoproteína que exerce papel crítico na aterogênese (Brunet *et al.*, 2000). Pouco é conhecido sobre o efeito

direto do estresse oxidativo/ferro sobre o metabolismo de lipídios sem o envolvimento de LDL.

Receptores ativadores da proliferação peroxissomal (PPARs), incluindo PPAR- α , PPAR- β/δ e PPAR- γ são fatores de transcrição que regulam o metabolismo de lipídios, homeostase de glicose e o desenvolvimento e diferenciação de adipócitos (Fruchart *et al.*, 2009).

A ativação de PPAR- α induz a expressão de genes chaves do metabolismo de lipídios, como o da HidroximetilglutarilcoenzimaA redutase (HMGCoA redutase) e do receptor hepático da lipoproteína de baixa densidade (LDL-R) (Huang *et al.*, 2008), assim como reprime a expressão gênica da colesterol-7 α -hidroxilase (CYP7A1) (Li & Chiang, 2009). Tanto ligantes de PPAR- α quanto de PPAR- γ apresentam ação antiaterogênica em camundongos modelos para aterosclerose (Li *et al.*, 2000; Duez *et al.*, 2002).

Proteínas de ligação ao elemento de resposta a esterol (SREBPs) são fatores de transcrição que também regulam a expressão de genes relacionados à síntese de colesterol, ácidos graxos e triacilgliceróis (Brown & Goldstein, 1999).

Trabalhos realizados em nosso laboratório demonstraram que uma dieta rica em lipídios eleva os níveis de colesterol total e que o aumento de estoques de ferro no fígado potencializa este efeito em hamsteres (Silva *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2007).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos bioquímicos do excesso de ferro sobre parâmetros relacionados ao estresse oxidativo e mecanismos de defesas antioxidantes, perfil lipídico e glicêmico de hamsteres alimentados com dieta padrão ou rica em lipídios. Além disso, nós partimos do pressuposto que o excesso de ferro possa afetar a expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipídios, como o da HMGCoA redutase, da CYP7A1, do LDL-R, do SREBP-2 e do PPAR- α . Então, nós também objetivamos avaliar os níveis de expressão destes genes no fígado dos animais.

Para a realização deste estudo, utilizamos o hamster como modelo experimental, uma vez que é um modelo reconhecido para a pesquisa em aterosclerose, porque algumas linhagens desenvolvem lesões vasculares juntamente com hiperlipidemia em resposta a uma dieta rica em colesterol e ácidos graxos saturados (Nistor *et al.*, 1987; Auger *et al.*, 2005).

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Ferro e saúde

O ferro é um dos minerais essenciais requeridos para a manutenção estrutural e funcional de várias moléculas, assim como para a sobrevivência, crescimento e proliferação celular. A homeostase do ferro é resultante da regulação estreitamente coordenada por diferentes proteínas envolvidas na sua captação, estoque e tráfego intracelular. Apesar de ser essencial, o ferro pode ser tóxico quando em quantidades excessivas (Kohgo *et al.*, 2008). Através da reação de Fenton, o ferro como um metal de transição, pode gerar várias espécies reativas de oxigênio e/ou de nitrogênio. Portanto, o metabolismo anormal do ferro pode levar a diversas patologias crônicas. Como não existe um mecanismo ativo de excreção do ferro, este é facilmente acumulado em condições de excesso de ferro bem como por fatores hereditários, por transfusões de sangue repetitivas e/ou por outras condições patológicas. Este acúmulo tem sido associado a algumas doenças crônico-degenerativas. O estresse oxidativo é um dos principais fatores causadores destas doenças, sendo que entre elas estão o diabetes e as complicações diabéticas. Evidências crescentes têm indicado que o excesso de ferro não somente aumenta o risco para a resistência à insulina e diabetes (Liu *et al.*, 2009), como também para doenças cardiovasculares (Shah & Alam, 2003).

2.2- Estresse oxidativo, excesso de ferro e doenças.

Radicais livres são moléculas com um elétron desemparelhado na última camada orbital. Apresentam importante papel na origem da vida e na evolução biológica, com efeitos benéficos nos organismos (McCord *et al.*, 2000). Radicais de oxigênio estão envolvidos em muitas atividades bioquímicas das células, como na transdução de sinais, transcrição gênica e regulação da atividade da guanilato ciclase solúvel. O óxido nítrico é uma molécula sinalizadora importante que essencialmente regula as células musculares lisas, a adesão de leucócitos, a agregação plaquetária, a angiogênese, a trombogênese, o tônus vascular e a hemodinâmica (Zheng & Storz, 2000).

Radicais livres e espécies reativas não radicais existem em células e tecidos biológicos a baixas concentrações, porém mensuráveis (Sies, 1993). A concentração destas espécies é determinada pelo equilíbrio entre suas taxas de produção e de *clearance* por vários compostos e enzimas antioxidantes. Halliwell & Gutteridge (1990) definiram antioxidantes como substâncias que são capazes de competir com substratos oxidáveis e então, impedir ou inibir significativamente a oxidação destes substratos mesmo em concentrações relativamente baixas. Nesta definição estão incluídas as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutationa

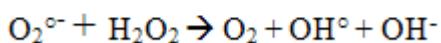
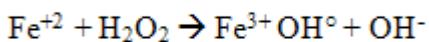
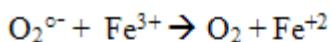
peroxidase (GSH-PX) e catalase (CAT), assim como os compostos não enzimáticos como, por exemplo, α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C) e glutathiona.

No entanto, uma superprodução de radicais livres ou uma diminuição das defesas antioxidantes pode favorecer o aumento do estresse oxidativo, com consequente dano a biomoléculas (lipídios, proteínas, DNA), eventualmente levando a muitas doenças crônicas como aterosclerose, câncer, diabetes, artrite reumatóide, injúria pós perfusão isquêmica, infarto no miocárdio, doenças cardiovasculares, inflamação crônica, choque séptico, envelhecimento e outras doenças degenerativas em humanos (Fang *et al.*, 2002).

Existem dois tipos principais de fontes de oxidantes: fontes mitocondriais e fontes não-mitocondriais. As fontes mitocondriais são representadas pela cadeia transportadora de elétrons e pela reação da óxido nítrico sintase. Uma redução eletrônica de O_2 para formar ânion superóxido (O_2^-) e a conversão deste em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ocorre durante a respiração mitocondrial. A mitocôndria também está envolvida na geração de óxido nítrico pela reação da enzima óxido nítrico sintase. O ânion superóxido e o óxido nítrico reagem para formar o radical hidroxil (OH), ainda mais agressivo (Gilca *et al.*, 2007).

Dentre as fontes não-mitocondriais de EROS estão: as reações enzimáticas do citocromo p450 microssomal, cujas enzimas catalisam a oxidação ou redução de compostos xenobióticos com simultânea formação de ânion superóxido (O_2^-) (Halliwell & Gutteridge, 1989); a explosão respiratória de células fagocíticas que é fonte de O_2^- via reação da NADPH oxidase durante condições inflamatórias ou infecciosas (Franceschi & Ottaviani, 1997); a β -oxidação peroxissomal de ácidos graxos a qual gera H_2O_2 que apesar de ser decomposto pela catalase no peroxissomo, com o envelhecimento este apresenta reduzida habilidade de manter o balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes (Legakis *et al.*, 2002).

Outra fonte importante de geração de EROS é a reação de Fenton catalizada por íons de ferro bivalentes e que leva a formação do radical hidroxila (OH) (Halliwell & Gutteridge, 1990), de acordo com a reação abaixo:



Muitos trabalhos têm demonstrado que existe relação entre estoques elevados de ferro e o aumento do estresse oxidativo. Dal-Pizzol *et al.* (2001) observaram que a exposição neonatal ao ferro induz estresse oxidativo em ratos por aumentar TBARS (substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico) e proteína carbonilada na substância nigra do cérebro, assim como por reduzir a atividade da superóxido dismutase o que também ocorre em outras desordens neurodegenerativas (Ihara *et al.*, 1999). Estes achados sugerem que espécies reativas de oxigênio possam estar envolvidas no dano neuronal e nas alterações comportamentais induzidas pelo tratamento com ferro no período crítico neonatal.

Cornejo *et al.* (2005) demonstraram que o excesso crônico de ferro, obtido por suplementação dietética em ratos pode desencadear estresse oxidativo hepático à curto prazo, com aumento da expressão de iNOS envolvendo a via ERK/NF-κB à longo prazo, desta forma aumentando a atividade da óxido nítrico sintase hepática.

Vários trabalhos realizados em modelos animais mostram que o excesso de ferro pode aumentar os níveis de TBARS no fígado (Cockell *et al.*, 2005; Domitrović *et al.*, 2006; Fischer *et al.*, 2002).

Desta forma, nota-se que o papel do excesso de ferro na patogênese de várias doenças está na facilidade com que ele é reversivelmente oxidado e reduzido, o que apesar de ser essencial para suas funções metabólicas, faz com que o ferro seja potencialmente danoso devido à sua habilidade em gerar espécies reativas e induzir estresse oxidativo celular.

Um estudo populacional de caso/controle revelou que o excesso de ferro dietético está associado com o risco na doença de Parkinson (Powers *et al.*, 2003).

Estoques elevados de ferro, medidos pela concentração plasmática de ferritina, podem aumentar o risco de alterações fibrocíticas no epitélio mamário, e a ingestão dietética de ferro também pode aumentar o risco de progressão das lesões no câncer de mama (Moore *et al.*, 2009).

Estudos demonstram que níveis elevados de ferritina estão associados com obesidade central (Gillum *et al.*, 2001), hipertensão (Piperno *et al.*, 2002) e dislipidemia (Williams *et al.*, 2002). Estoques aumentados de ferro no fígado têm sido associados ao sobrepeso e às alterações no metabolismo de lipídios e glicose. Estas anormalidades são características da síndrome metabólica, que está intimamente relacionada à resistência à insulina, afetando um grande número de adultos em países ocidentais, e que está associada com a doença hepática gordurosa não-alcoólica, agora considerada uma manifestação da síndrome metabólica (Kotronen & Yki-Järvinen, 2008). Esta forma de excesso de ferro tem sido denominada

dismetabólica ou síndrome da resistência à insulina por excesso hepático de ferro (IR-HIO) (Mendler *et al.*, 1999).

Tuomainen *et al.* (1997) reportaram que as concentrações séricas de ferritina são correlacionadas com a concentração sérica de glicose e insulina. Além disso, altos estoques de ferro estão associados a aumento do risco para diabetes tipo 2 em mulheres saudáveis, independentemente do conhecimento de fatores de risco para diabetes (Jiang *et al.*, 2004).

Desde 1981, quando Sullivan propôs que a depleção de ferro protege contra doença isquêmica do coração, estudos têm demonstrado que o excesso de ferro pode ser um fator de risco para doenças cardiovasculares (Lauffer 1991; Burt *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2008).

O mecanismo sugerido para a participação do ferro na progressão da lesão aterosclerótica está no seu potencial em gerar radicais livres e promover o dano oxidativo às lipoproteínas de baixa densidade (LDL). As partículas de LDL nativas podem atravessar as paredes arteriais sem causar dano, mas quando estas são oxidadas, são reconhecidas como substâncias estranhas por receptores *scavenger* de macrófagos teciduais. O acúmulo de lipídios oxidados em macrófagos leva à formação de células espumosas. Partículas de LDL oxidadas também induzem dano celular endotelial, promovem a migração de monócitos para a parede dos vasos e previnem a saída de macrófagos da íntima dos vasos (de Valk & Marx, 1999).

Trabalhos realizados em nosso laboratório demonstraram que uma dieta rica em lipídios eleva os níveis de colesterol total e que estoques elevados de ferro no fígado potencializam este efeito em hamsteres (Silva *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2007).

Estes dados em conjunto mostram a importância de se ter cautela quanto à suplementação dietética de ferro, principalmente em indivíduos que apresentam desordens metabólicas relacionadas ao metabolismo de lipídios, que apresentam riscos para doenças cardiovasculares ou algum quadro já estabelecido e em indivíduos diabéticos.

2.3- Metabolismo de ferro

2.3.1- Absorção intestinal de ferro

A absorção do ferro ocorre predominantemente na superfície apical do duodeno e jejuno superior. As duas formas de ferro dietético, denominadas ferro hemínico e ferro iônico são absorvidas pelo enterócito não competitivamente (figura I).

Shayegi *et al.* (2005) identificaram uma proteína de membrana denominada proteína carreadora de heme 1 (HCP1) a qual medeia a captação de grupos heme para a célula. Assim

que um grupo heme entra na célula, este tem seu anel hemínico aberto por uma heme oxigenase (HO) para liberar o Fe^{+2} .

O ferro não hemínico existe preferencialmente no estado de Fe^{+3} . O íon férrico é convertido a íon ferroso antes de ser transportado através do epitélio intestinal. Este processo ocorre com auxilio de outros componentes dietéticos e de uma citocromo b redutase duodenal (Dcytb) que é altamente expressa na borda em escova dos enterócitos (Mckie *et al.*, 2001)

O Fe^{+2} é transportado da membrana apical para dentro da célula através de um transportador de metal divalente (DMT1). O DMT1 é expresso na borda em escova duodenal onde ele controla a captação de ferro dietético (Andrews, 1999). Outra via para o transporte de Fe^{+3} se dá através do complexo integrina-mobilferrina (IM). Este complexo Fe^{+3} -IM se combina com a flavina monooxigenase e β 2-microglobulina no citosol para formar a paraferritina. O Fe^{+3} é convertido a Fe^{+2} pela atividade ferrirredutase inerente à paraferritina e é transportado como Fe^{+2} pelo DTM1 o qual está também presente na paraferritina (Conrad & Umbreit, 2002).

O Fe^{+2} dentro da célula pode seguir dois caminhos: pode ser estocado como ferritina ou transportado da superfície basolateral para a corrente sanguínea. O mecanismo pelo qual o Fe^{+2} alcança a membrana basolateral é pouco compreendido. Os fatores que decidem se o ferro será estocado na célula intestinal ou transportado para o plasma ainda não estão claros, mas estão sendo entendidos aos poucos.

O ferro dentro da célula é exportado para fora desta por uma proteína transportadora denominada ferroportina (FPN), também conhecida como transportador duodenal de ferro regulado (IREG1) (Mckie *et al.*, 2000). Hefaestina (Hp), uma ferroxidase dependente de cobre, trabalha juntamente com a FPN na exportação de ferro dos enterócitos (Donovan *et al.*, 2000). A hefaestina é uma proteína transmembrana homóloga a ceruloplasmina altamente expressa no intestino (Kuo *et al.*, 2004). Ela atua na oxidação de Fe^{+2} fazendo com que este seja captado pela transferrina. Sob condições de estresse a ceruloplasmina também exerce papel na oxidação de Fe^{+2} (Cherukuri *et al.*, 2005).

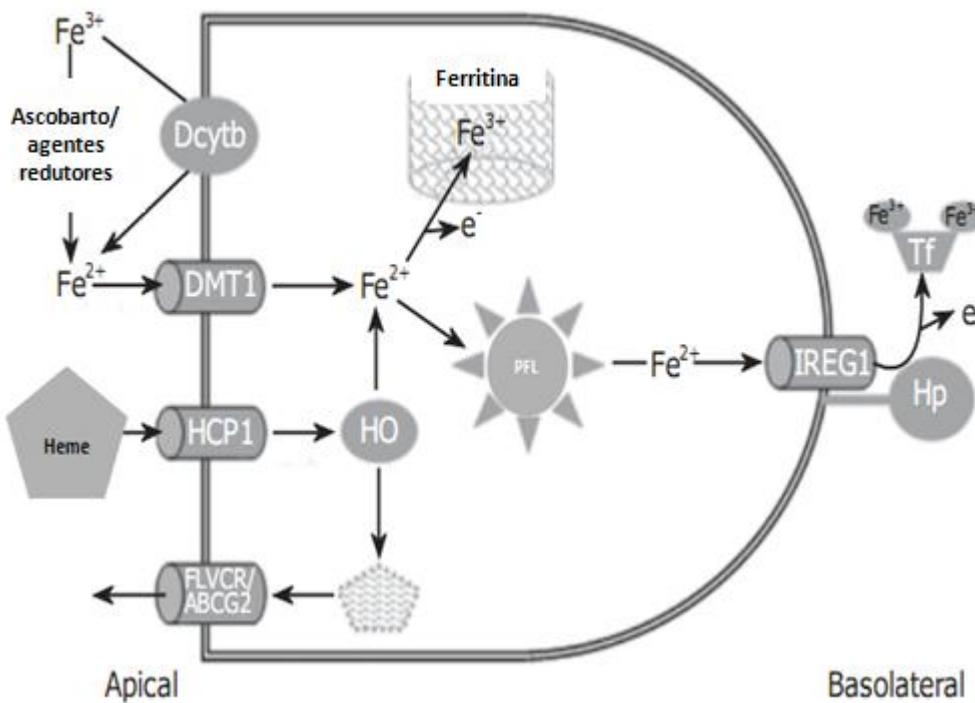


Figura I: Mecanismos envolvidos na absorção intestinal de ferro. Ferro dietético não hemínico (em sua maioria férrica) é reduzido pela ação da ferriredutase (Dcytb) e agentes redutores da dieta a Fe^{2+} , o qual subseqüentemente entra nos enterócitos via DMT1. O heme é absorvido via HCP1, quebrado pela heme oxigenase 1 (HO) para liberar Fe^{2+} (este se junta ao pool de ferro livre da rota não hemínica) e bilirrubina (a qual pode ser removida da célula pelas proteínas de efluxo: proteína carreadora do vírus C da leucemia felina- FLVCR e a proteína cassette ligadora de ATP 2- ABCG2). O ferro pode então ser estocado na forma de ferritina, ou passar pelo pool de ferro livre e ser processado para efluxo via IREG1 (como Fe^{2+}). O ferro exportado é reoxidado a Fe^{3+} pela hefaestina (Hp) para que este seja captado pela transferrina (Tf).

Fonte: Adaptado de Sharp & Srai 2007.

2.3.2- Transporte, captação e estoque de ferro

A transferrina (Tf) recebe e se liga ao ferro para entregá-lo aos receptores nas células recipientes. A Apotransferrina é bilobular e cada um dos lobos duplicados se liga a um átomo de Fe(III) e um ânion carbonato para se transformar em Tf. Esta proteína transfere o ferro às células se ligando aos receptores de transferrina (TfRs), em seguida a apotransferrina retorna ao plasma para novamente funcionar como uma transportadora de ferro (Ponka *et al.*, 1998).

A captação de ferro pelas células é essencial para o crescimento e proliferação celular e ocorre principalmente via TfR (figura II). O TfR1 tem sido estudado extensivamente (Caroline *et al.*, 1996). Este promove a captação de ferro ligado a Tf, e é o principal sistema regulatório da homeostase do ferro (Aisen *et al.*, 2001; Richardson & Ponka, 1997). Quando o ferro ligado a Tf se liga ao TfR1, esta interação promove a invaginação da membrana celular

e formação intracelular de endossomos contendo o complexo Tf-TfR1. A bomba de prótons presente na membrana endossomal bombeia íons H⁺ de dentro do endossomo para o citoplasma, o que induz uma mudança conformacional da Tf e de seu receptor, resultando na liberação do ferro. O Fe⁺³ liberado é convertido em Fe⁺² pelo antígeno epitelial transmembrana da próstata 3 (STEAP3), uma metaloredutase presente nos endossomos (Ohgami *et al.*, 2005; Ohgami *et al.*, 2006). O Fe⁺² é então transportado para fora dos endossomos pelo DMT1.

Existem evidências de que possam existir diferentes mecanismos alternativos para o transporte de ferro. Sob circunstâncias normais, a captação de ferro ligado à transferrina é a forma predominante de captação de ferro pelas células. Porém, recentemente, foi demonstrado que o TfR2 em células CHO e Zip 14 (Slc39a14) em células HEK293 atuam como transportadores de ferro livre (Graham *et al.*, 2008; Liuzzi *et al.*, 2006).

Normalmente, 95% do ferro estocado no tecido hepático são encontrados nos hepatócitos na forma de ferritina. Hemossiderina constitui os 5% restantes e é encontrada predominantemente nos remanescentes lisossomais das células de Kupffer. A expressão de ferritina é regulada principalmente a nível pós-transcricional pelas proteínas reguladoras de ferro (IRP1 e IRP2) (Irace *et al.*, 2005).

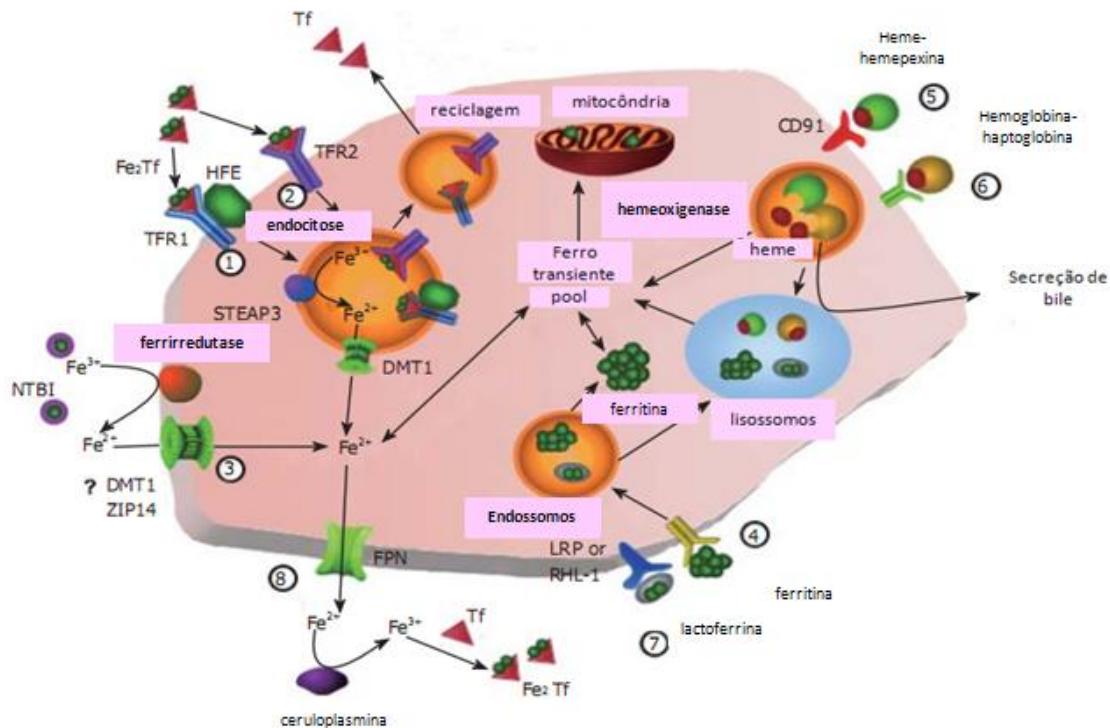


Figura II: Transporte de ferro nos hepatócitos. (1) Captação de transferrina diférrica mediada pelo TfR1. A transferrina diférrica se liga a seu receptor específico e é endocitada. O endossomo é acidificado e Fe^{+3} é reduzido pela STEAP3. O ferro é liberado e transportado para fora do endossomo via DMT1 e a apotransferrina é exocitada. (2) Captação de transferrina mediada por TRf2. Este mecanismo é similar ao mecanismo específico de TfR1, com a diferença de que, neste caso, a transferrina se liga ao TfR2. (3) Captação de NTBI. O ferro é reduzido e transportado para a célula por um processo mediado por carreadores. (4) Captação de ferritina. A ferritina se liga a seu receptor específico e é endocitada. O endossomo é direcionado aos lisossomos e o ferro é transferido para o “pool” de ferro livre ou para a ferritina endógena. (5) Captação de heme-hemopexina. O complexo heme-hemopexina se liga a seu receptor específico CD91 e é endocitado. O heme é removido e degradado pela heme oxigenase. (6) Captação de hemoglobina-haptoglobina. O complexo hemoglobina-haptoglobina se liga a seu receptor específico. Segue-se a endocitose, o complexo pode ser direcionado à membrana canalicular para liberação na bile ou aos lisossomos para degradação. (7) Captação de lactoferrina. A lactoferrina se liga a LRP ou RHL-1 e é endocitada e levada aos lisossomos para degradação lisossomal. (8) Liberação do ferro. O ferro é liberado pela FPN, oxidado pela ceruloplasmina para então se ligar à apotransferrina. TfR1, receptor de transferrina 1; TfR2, receptor de transferrina 2; STEAP3, antígeno epitelial transmembrana da próstata 3; DMT1, transportador de metal divalente 1; NTBI, ferro não ligado à transferrina; ZIP14, transportador regulado por zinco e proteína transportadora regulada por ferro 14; LRP, proteína relacionada ao receptor da lipoproteína de baixa densidade; RHL-1, lecitina-1 hepática de ratos (subunidade do receptor da superfície basolateral de hepatócitos); FPN, ferroportina; CD 91, grupamento de diferenciação 91.

Fonte: Adaptado de Graham *et al.*, 2007.

2.3.3- Regulação da homeostase do ferro

Como o ferro não pode ser excretado eficientemente, a regulação da sua homeostase ocorre principalmente durante a absorção.

A homeostase celular do ferro é dependente da regulação coordenada de proteínas envolvidas na captação, estoque, utilização e exportação de ferro. As células reagem à deficiência de ferro pelo aumento do TfR para maximizar a internalização de ferro ligado à transferrina. O metabolismo de ferro intracelular é principalmente controlado a nível pós-transcricional pelo sistema de elementos responsivos ao ferro (IRE)/IRP e este permanece sendo o sistema melhor caracterizado da expressão gênica pós-transcricional (Rouault 2006).

A regulação pós- transcricional dos níveis intracelulares de ferro envolve a interação entre as proteínas de resposta ao ferro (IRPs) e motivos estruturais conhecidos como elementos de resposta ao ferro (IREs). Estes são encontrados no RNAm que codifica proteínas envolvidas no estoque de ferro, síntese de heme eritróide, ciclo do ácido cítrico, exportação e captação de ferro. Os IREs foram primeiramente identificados na região 5'UTR (região não traduzida 5') do RNAm das cadeias leve e pesada da ferritina e foram notados mediante inibição do RNAm da ferritina em células privadas de ferro (Hentze *et al.*, 1987). A formação do complexo IRE-IRP na região 5'UTR do gene da ferritina resulta na inibição do processo traducional (figura III).

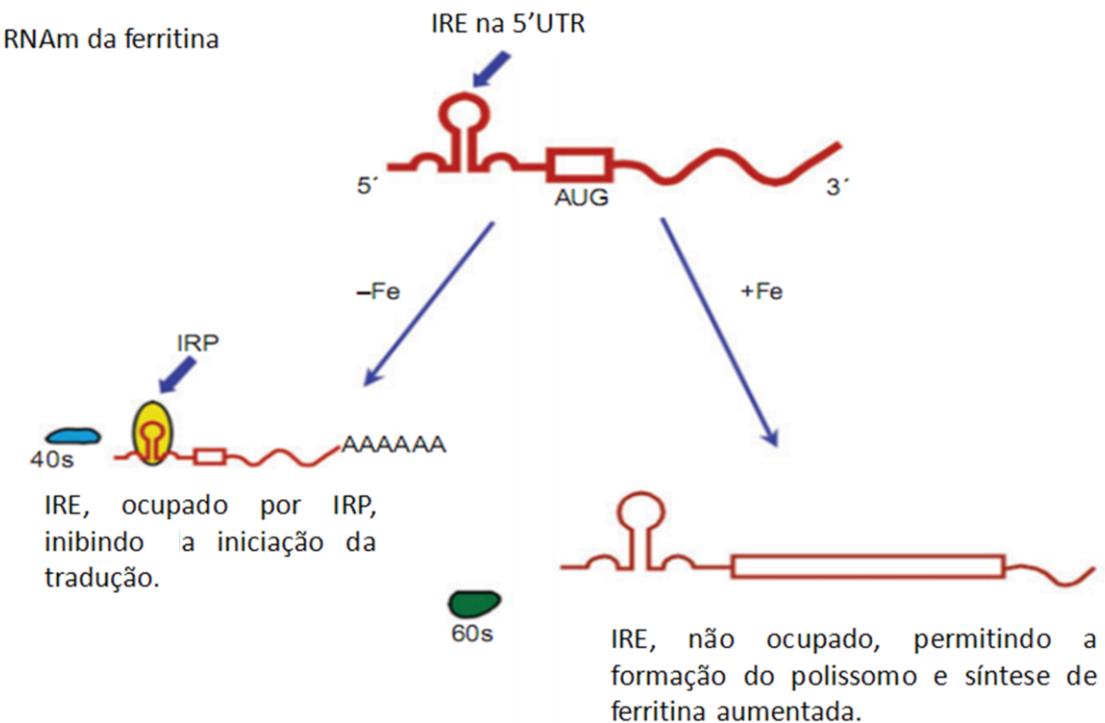


Figura III: A tradução do RNAm da ferritina é regulada por IRP. Em células depletadas de ferro, a ligação da IRP ao IRE na região 5'UTR do RNAm interfere na iniciação da tradução. Fonte: Adaptado de Rouault *et al.*, 2006.

O complexo IRE/IRP em alguns casos atua como inibidor da ligação do complexo de pré-iniciação 43S. Alternativamente a interação entre IRP e IRE na região 3'UTR resulta na estabilização do RNAm do TfR1 (figura IV). Em células deficientes de ferro as IREs se tornam alvo para as IRPs as quais se ligam a estes com grande afinidade, resultando na estabilização do RNAm instável do TfR1 e inibição traducional do RNAm que codifica as cadeias de ferritina. Isto permite à célula, aumentar a captação de ferro ligado à transferrina pelo TfR e minimizar o sequestro de ferro na forma de ferritina. Em contraste, em células com ferro suficiente, a interação entre IRE/IRP falha, resultando em diminuição da captação de ferro e aumento do seu estoque (Muckenthaler & Hentze, 1997).

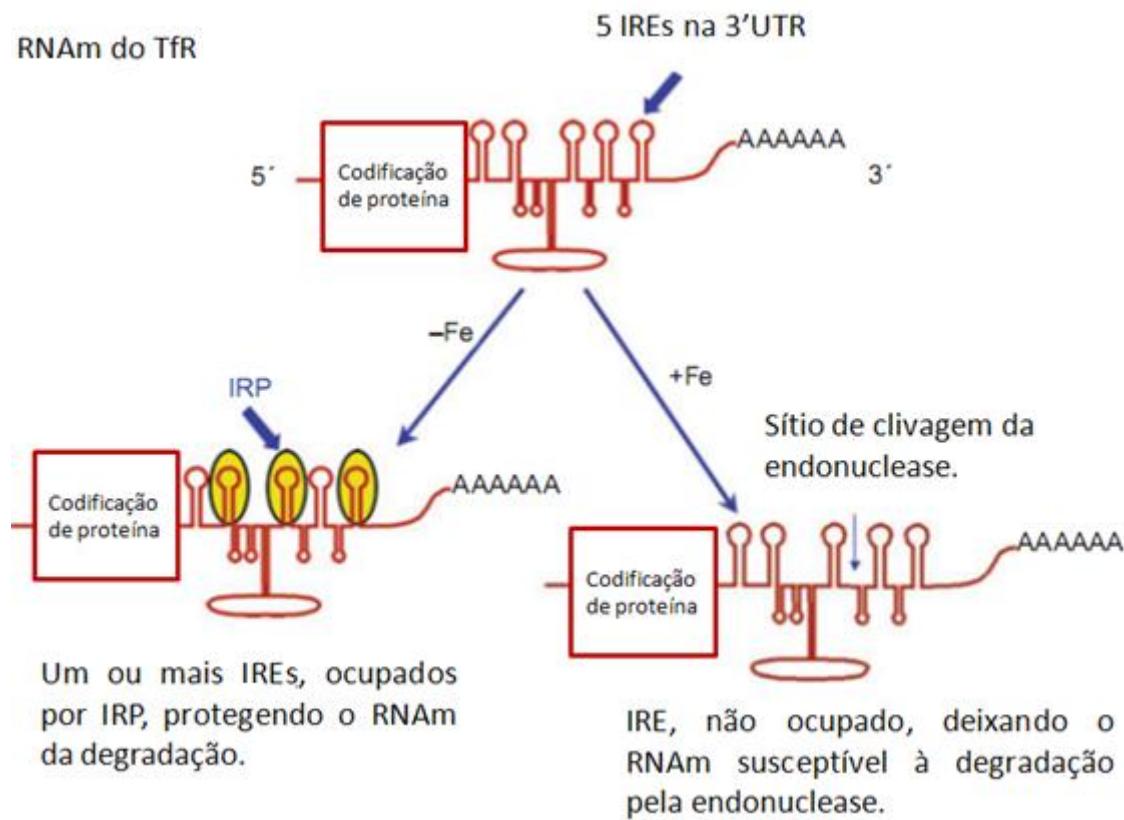


Figura IV: A degradação do RNAm do receptor da transferrina (TfR) é regulada por IRP. A ligação de IRPs aos IREs na região 3'UTR do RNAm do TfR protege o transcrito da clivagem pela endonuclease e da posterior degradação. A seta marca o sítio onde uma endonuclease desconhecida cliva o transcrito do TfR em células repletas de ferro quando não há a proteção pela ligação da IRP.

Fonte: Adaptado de Rouault *et al.*, 2006.

A procura por efetores regulatórios que modulem a absorção e a liberação de ferro dos estoques teciduais tem tido considerável progresso com a identificação de genes envolvidos na hemocromatose (HFE- proteína da hemocromatose humana, TfR2-receptor de transferrina 2 e HJV- hemojuvelina) e a descoberta da hepcidina.

A hepcidina é primariamente expressa no fígado e representa um regulador central da homeostase do ferro (Pigeon *et al.*, 2001). Sob condições fisiológicas, a hepcidina regula negativamente a absorção de ferro no duodeno e o transporte de ferro nas células reticuloendoteliais por se ligar à ferroportina (FPN) destas células. Ao se ligar à ferroportina na membrana basolateral dos enterócitos duodenais e de macrófagos, a hepcidina provoca a internalização desta, resultando na inibição do transporte de ferro (Nemeth *et al.*, 2004). A hepcidina também inibe a expressão de DMT1 (Mena *et al.*, 2008).

A expressão hepática de hepcidina é diminuída em resposta a baixos estoques de ferro, anemia e hipóxia (Nicolas *et al.*, 2002), assim como por uma atividade eritropoética alta

(Origa *et al.*, 2007). Contrariamente, a hepcidina é induzida por excesso de ferro (Pigeon *et al.*, 2001) e por sinais inflamatórios (Lee *et al.*, 2004).

HFE, HJV e TfR2 são moduladores da hepcidina. A descoberta de que HFE associava-se ao TfR2 foi a primeira indicação de que HFE pudesse modular o metabolismo de ferro (Cheng *et al.*, 2004). A hemocromatose associada à HFE tem sido descrita como uma desordem da regulação de ferro no enterócito, onde há um aumento crônico na taxa de transferência de ferro do enterócito para a corrente sanguínea. Sabe-se que HFE interage com uma proteína na via de transdução de sinal que estimula a hepcidina (Nicolas *et al.*, 2003).

A hemojuvelina (HJV) é um importante regulador da hepcidina que foi descoberto recentemente. O papel da HJV na homeostase do ferro tem sido confirmado em modelos de deleção para este gene, os quais manifestam aumento na deposição de ferro no fígado, pâncreas e coração (Niederkofler *et al.*, 2005).

Diferentemente do TfR1, o papel do TfR2 não está claramente elucidado. Sabe-se que a transferrina férrica também se liga a ele, e que tem papel importante na homeostase sistêmica de ferro. É altamente expresso no fígado e mutações em seu gene resultam em hemocromatose (Deaglio *et al.*, 2002). Uma disfunção em TfR2 causa diminuição da produção de hepcidina, e por isso parece estar envolvido na regulação da mesma. O aumento da saturação da transferrina no soro, resulta na liberação da HFE do complexo HFE-TfR1 e ligação ao TfR2. Isto inicia uma cascata de sinalização que resulta na produção de hepcidina. Mutação ou ausência de HFE ou TfR2 afeta esta cascata de sinalização, levando a uma alteração da homeostase sistêmica do ferro (Goswami & Andrews, 2006).

2.4- Situações em que ocorre excesso de ferro.

Algumas manifestações de excesso de ferro podem ocorrer de duas formas características. Quando o conteúdo plasmático de ferro excede a capacidade de ligação à transferrina, as células parenquimais do fígado rapidamente captam o ferro. À medida que os níveis de ferro aumentam, cardiomiócitos, células acinares pancreáticas e outras células o acumulam. Por outro lado, quando o excesso de ferro é resultante do catabolismo aumentado de eritrócitos (por exemplo, pacientes que recebem transfusões sanguíneas frequentes), o ferro se acumula primeiro no retículo endotelial de macrófagos, e somente depois se deposita nas células parenquimais (Andrews, 2000).

Existem desordens genéticas onde o excesso de ferro ocorre, como na hemocromatose. O gene responsável pela maioria dos casos de hemocromatose hereditária é o HFE. Grandes grupos que pesquisam o gene HFE e doenças clínicas encontraram que aproximadamente

0,8% da população carregam uma mutação conhecida para este gene, com aproximadamente 50% destes apresentando evidências de acúmulo de ferro (McDonnell *et al.*, 1999).

Nem todos os pacientes com desordens de hemocromatose familiar apresentam uma mutação no gene *hfe*. Apesar da identificação de mutações patogênicas no gene *hfe* estarem implicadas no diagnóstico da hemocromatose hereditária, há condições onde o excesso de ferro não está relacionado a este gene (Pietrangelo *et al.*, 1999; Roetto *et al.*, 1999).

O excesso de ferro também ocorre em algumas áreas da África subsariana onde mais de 10% da população apresenta predisposição ao acúmulo de ferro (Gordeuk, 1992), na hemocromatose neonatal (Goldfischer *et al.*, 1981), na aceruloplasminemia (Morita *et al.*, 1995), na Doença de Hallervorden-Spatz (Angelini *et al.*, 1992), em transfusões de sangue múltiplas (Schafer *et al.*, 1981), na inalação de ferro como em minerações e soldagem de aço (Crawford, 1995), em mulheres que entraram na menopausa (Sullivan, 1981) e na ausência de transferrina (Weinberg, 1990).

Apesar de existirem mecanismos para a regulação da absorção de ferro, situações menos drásticas de excesso de ferro podem ser observadas quando uma grande quantidade de ferro é ingerida na dieta. Isto pode ser observado na Suécia onde o enriquecimento de alimentos com ferro foi feito por 50 anos, 5% dos homens tiveram elevações dos níveis séricos de ferro e 2% apresentaram níveis consoantes com estágios iniciais de hemocromatose (Olsson *et al.*, 1995). Fleming (2002) observou que o consumo de ferro acima de 30mg/dia (relativo à ingestão de mais de 21 porções de fruta por semana e mais de 7 porções de carne vermelha por semana) aumenta os estoques de ferro. O consumo crônico de suplementos contendo altas quantidades de ferro também tem sido descrito como causa de sobrecarga de ferro (Green *et al.*, 1989).

No Brasil, assim como em outros países da América Latina, existe desde 2004, um programa de combate à deficiência de ferro pela fortificação de todas as farinhas com ferro e ácido fólico. Considerando o potencial oxidante do ferro e o aumento da expectativa de vida do brasileiro, acredita-se que haja um risco desta fortificação indiscriminada aumentar a prevalência de doenças crônico-degenerativas em indivíduos com “status” nutricional adequado de ferro. Uma pesquisa realizada em 2008, não encontrou estoques elevados de ferro na população brasileira, mas sugeriu que com o passar do tempo este excesso possa ocorrer (Mendes *et al.*, 2009).

2.5- Metabolismo de colesterol e doenças cardiovasculares

2.5.1- Síntese e transporte: o papel das lipoproteínas

A síntese do colesterol ocorre no citoplasma das células com enzimas do citosol e retículo endoplasmático. O pool total de colesterol hepático é o resultado do balanço entre o colesterol adquirido exogenamente, produzido endogenamente e o colesterol eliminado do fígado. O colesterol adquirido exogenamente provém da dieta e o produzido endogenamente provém de sua síntese nos tecidos extra-hepáticos ou a partir da síntese de novo no fígado (figura V). A eliminação do colesterol do fígado se dá como colesterol inalterado na bile, como um componente das lipoproteínas do plasma enviadas aos tecidos periféricos ou como sais biliares secretados na luz intestinal (Champe & Harvey, 2002).

O precursor de todos os átomos de carbono do colesterol e dos seus derivados esteróides é o grupo acetil da molécula de acetil-CoA. Os passos na biossíntese do colesterol envolvem uma via complexa com cerca de 21 etapas. A condensação de três grupos acetila leva à formação do mevalonato, que contém seis carbonos. A descarboxilação do mevalonato produz uma unidade isopreno de cinco carbonos, que é um ponto fundamental na biossíntese dos esteróides e de muitos outros compostos. Seis unidades de isopreno condensam-se para formar o esqualeno, que contém 30 átomos de carbono. Este sofre ciclização para formar o lanosterol, que após a perda de três grupos metila, origina o colesterol. É importante ressaltar que a reação catalisada pela enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA (HMG-CoA) redutase, que converte acetil-CoA em mevalonato, é fundamental para a formação de colesterol (Campbell, 2001).

Como citado anteriormente, o colesterol pode ser fornecido ao organismo através da síntese endógena e através da dieta (exógena). Na circulação, o colesterol é transportado pelas lipoproteínas, as quais apresentam tamanho, forma, composição, função e principalmente contribuição para doenças vasculares diferenciados.

As lipoproteínas responsáveis pelo transporte dos lipídios da dieta (via exógena) são os quilomícrons. O transporte de lipídios de origem hepática ocorre por meio das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e pelas lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que characteristicamente contém apolipoproteínaB-100 (apoB-100) (via endógena). Os triacilgliceróis das VLDL, assim como os dos quilomícrons, são hidrolizados pela lipase lipoprotéica. Os ácidos graxos são liberados para os tecidos podendo ser metabolizados ou estocados na forma de triacilgliceróis. Os quilomícrons se transformam em remanescentes (RQ) que são removidos pelo fígado por receptores específicos, sendo que o mais aparente é o receptor da LDL. Uma parte das VLDL se transforma em partículas de densidade

intermediária (IDL) e, em seguida, em LDL após a perda de componentes de superfície lipídicos e protéicos. As VLDL trocam triacilgliceróis por ésteres de colesterol com as lipoproteínas de alta densidade (HDL) e LDL por intermédio da proteína transferidora de éteres de colesterol (CETP).

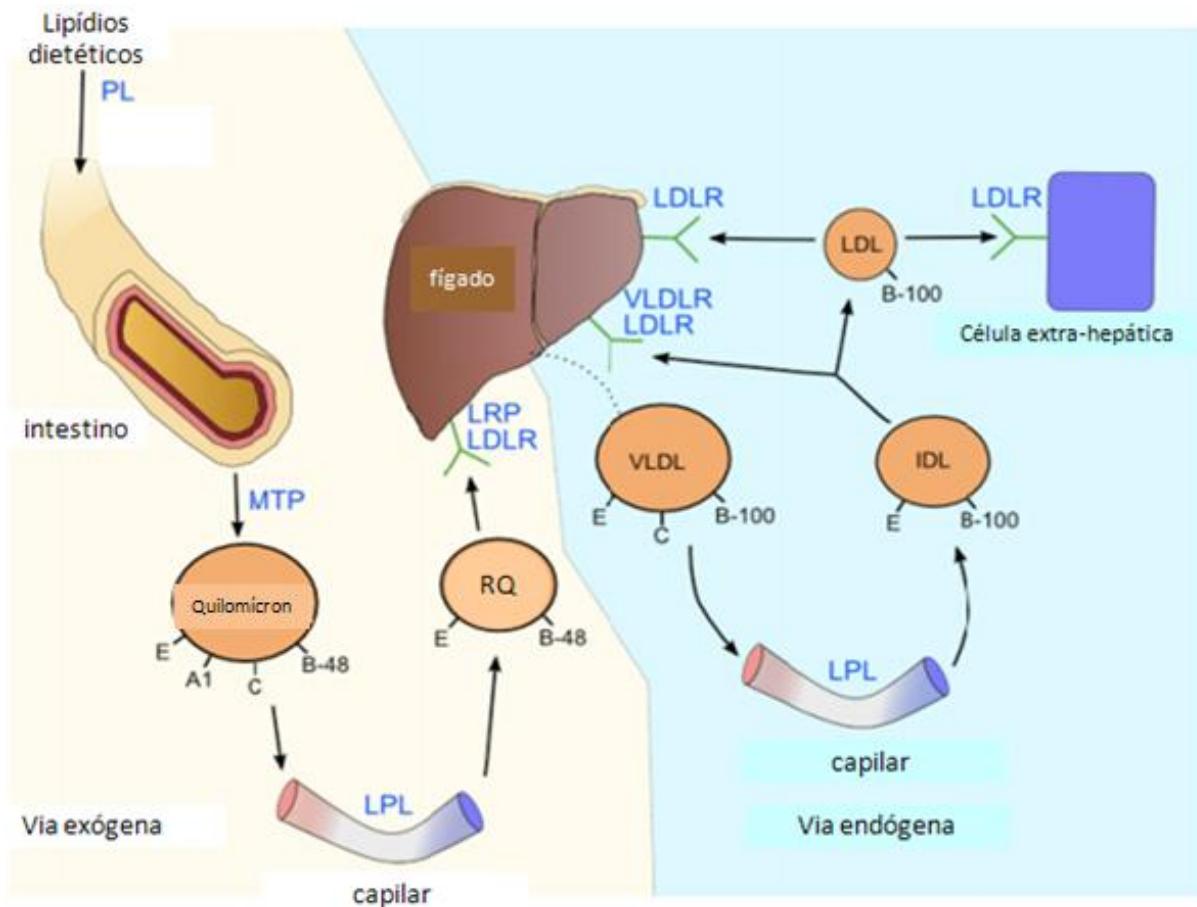


Figura V: Transporte de colesterol exógeno e síntese *de novo*. Lipase pancreática (PL), proteína transferidora de triacilglicerol microsomal (MTP), remanescente de quilomícrom (RQ), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), receptor de LDL (LDLR), receptor de VLDL (VLDLR), proteína relacionada à LDL (LRP), apolipoproteína E (E), apolipoproteína A1 (A1), apolipoproteína C (C), apolipoproteína B-48 (B-48), apolipoproteína B-100 (B-100).
Fonte: adaptado de Daniels *et al.*, 2009.

A HDL participa do transporte reverso do colesterol (figura VI). O principal componente protéico das HDL é a apolipoproteína 1 (apoA1). Funcionalmente, a apoA1 forma a estrutura inicial da HDL discoidal (Castro & Fielding, 1988), e é reconhecida por algumas das mais importantes proteínas envolvidas no transporte reverso do colesterol, incluindo: lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), a qual é responsável pela formação de ésteres de colesterol por catalisar a transferência do grupo acila da lecitina para o grupo hidroxila do colesterol (Jauhainen & Dolphin, 1986); proteína cassette ligadora de ATP A1 (ABCA1), que promove o efluxo de colesterol por catalisar a transferência de colesterol e fosfolipídios de células potencialmente aterogênicas nos tecidos periféricos para a HDL discoidal (Wang *et al.*, 2000) e o receptor *scavenger* classe B1 (SR-BI), que catalisa a

captação de colesterol das partículas de HDL ricas em lipídios para os hepatócitos, onde estas serão convertidas em ácidos biliares (Rigotti *et al.*, 1997). A conversão do colesterol devolvido ao fígado via HDL em ácidos biliares é iniciada pela modulação enzimática do colesterol hepático à 7- α -hidroxicolesiterol pela ação da enzima colesterol 7- α -hidroxilase (CYP7A1) (Russell & Setchell, 1992).

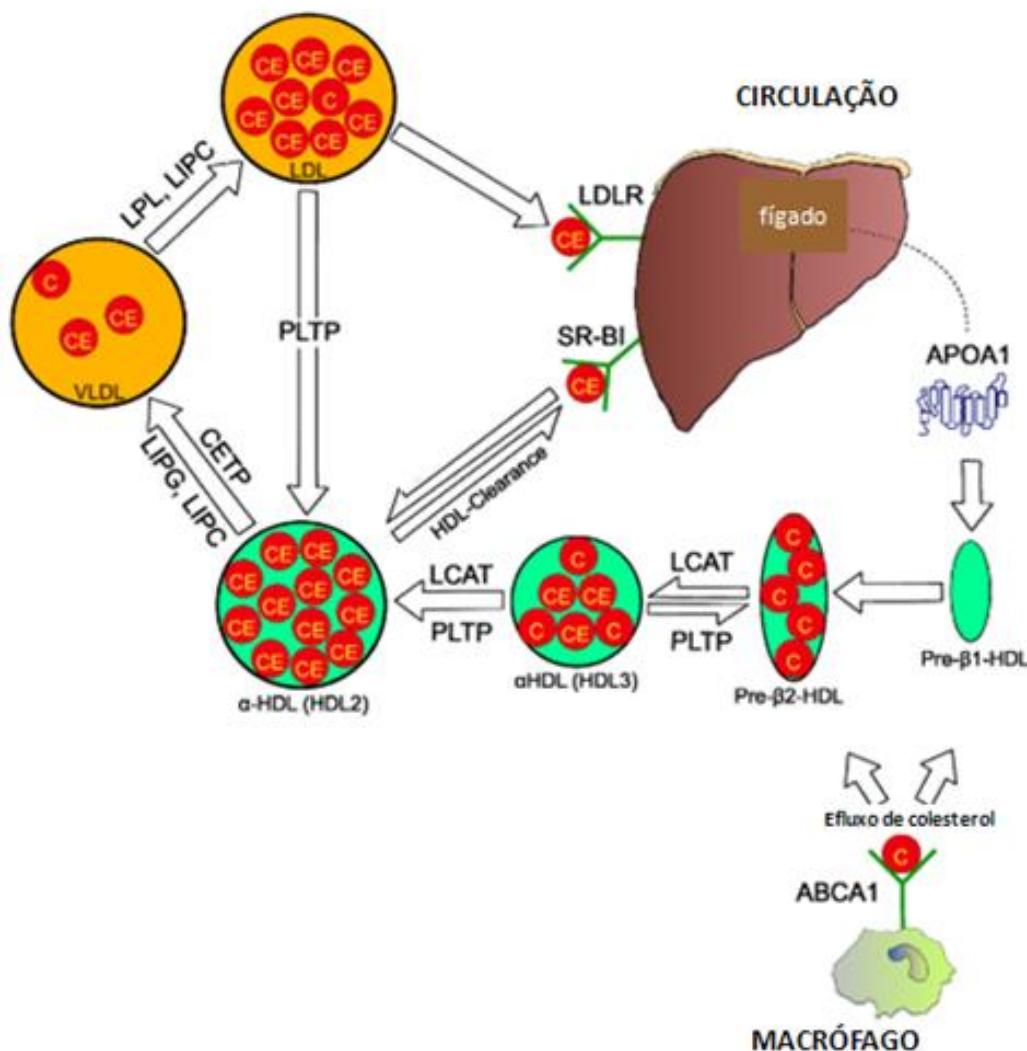


Figura VI: Transporte reverso de colesterol. As setas indicam a movimentação de colesterol e a maturação da partícula. Colesterol (C), ésteres de colesterol (CE), lecitina colesterol acil-transferase (LCAT), proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP), lipase endotelial (LIPG), lipase hepática (LIPC), proteína transferidora de fosfolipídios (PLTP), receptor *scavenger* classe B1 (SR-BI), proteína *cassete* ligadora de ATP A1 (ABCA1), apolipoproteína 1 (ApoA1), receptor de LDL (LDLR), lipase lipoprotéica (LPL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de alta densidade (HDL).

Fonte: adaptado de Daniels *et al.*, 2009.

2.5.2- Retroregulação da HMGCoA redutase e do receptor de LDL pelo colesterol

A expressão dos níveis da hidroximetilglutaril coenzima A redutase (HMGCoA redutase) assim como do receptor de LDL (LDLR) são negativamente controladas pelos níveis intracelulares de colesterol, o qual como resultado, comanda um poderoso sistema de auto-regulação.

Os níveis transcricionais de ambos os genes da HMGCoA redutase e LDLR são controlados por promotores que apresentam os elementos de resposta à esterol (SREs), os quais estão presentes em mais de 30 genes envolvidos com a síntese e captação lipídica (Horton *et al.*, 2003).

A seqüência SRE no promotor da HMGCoA redutase é homóloga à seqüência do LDLR, com uma substituição de uma guanina por uma citosina central no lado 3' (Osborne *et al.*, 1988). Em ambos os promotores, a ligação por fatores de transcrição denominados proteínas ligadoras aos elementos de resposta à esterol (SREBPs) é requerida para a produção eficiente da transcrição. Existem três tipos de SREBP (SREBP1a, SREBP1c e SREBP2), o qual é codificado por dois genes. Das três isoformas, SREBP1a e SREBP2 são mais importantes na homeostase de colesterol do que o SREBP1c, o qual altera principalmente a expressão de genes relacionados à síntese de ácidos graxos (Horton *et al.*, 2002).

Cada novo SREBP traduzido é inserido à membrana do retículo endoplasmático rugoso, onde seu domínio regulatório C-terminal se liga à porção C-terminal da proteína ativadora de clivagem do SREBP denominada (SCAP) (Horton *et al.*, 2002). Enquanto associado com o SREBP, a SCAP se liga à outra proteína ligada ao retículo endoplasmático conhecida como gene 1 induzido por insulina (INSIG) (Yang *et al.*, 2002). Interações entre SCAP e INSIG mantêm o complexo protéico firmemente conectado ao retículo endoplasmático rugoso. Esta interação é sensível ao colesterol, que então age como um sensor deste sistema (Brown *et al.*, 2002).

Em condições de abundância de colesterol, os domínios transmembrana da SCAP se ligam ao colesterol causando uma mudança conformacional no domínio citosólico desta, resultando no aumento da afinidade pela INSIG (Brown *et al.*, 2002). Na ausência de colesterol a conformação da SCAP não favorece sua ligação à INSIG deixando o complexo SREBP/SCAP livre para deixar o retículo endoplasmático rugoso em vesículas e migrar para o Golgi (Goldstein *et al.*, 2006). Uma vez no Golgi, a porção N-terminal do SREBP é clivada por duas proteases site-1 e site-2 (S1P e S2P, respectivamente) (Nohturfft *et al.*, 2000). A forma nuclear da SREBP migra para o núcleo e ativa genes incluindo o da HMGCoA redutase e do receptor de LDL, levando ao aumento da concentração do colesterol celular.

2.5.3- PPAR- α : papel na homeostase de lipídios e controle da resposta inflamatória.

Receptores ativadores da proliferação peroxissomal (PPARs) são fatores de transcrição nucleares. O receptor ativador da proliferação peroxissomal alfa (PPAR- α) é predominantemente expresso no fígado, tecido adiposo e coração, e tem sido relacionado à regulação da energética celular. Muitos genes alvo de PPAR- α estão envolvidos na β -oxidação peroxissomal e mitocondrial de ácidos graxos, incluindo os genes que codificam a carnitina palmitoiltransferase 1B e a acil-coenzima A oxidase (Dreyer *et al.*, 1993).

Em resposta a uma ativação por ligante, os PPARs sofrem uma alteração conformacional que facilita a formação de um complexo heterodimérico com outro receptor nuclear ativado por ligante, o receptor retinóide (RXR) (Kliewer *et al.*, 2001). Após a heterodimerização com RXR o complexo se liga aos elementos responsivos à PPARs (PPREs) presentes na região promotora de genes alvo (Shulman & Mangelsdorf, 2005).

PPAR- α é alvo molecular de fibratos, uma classe de fármacos hipolipidêmicos usados no tratamento de dislipidemias humanas (Forman *et al.*, 1997). Ligantes endógenos de PPAR- α incluem ácidos graxos poliinsaturados como o ácido linoléico, derivados de leucotrienos e VLDLs na presença da lipase lipoprotéica (Castrillo & Tontonoz, 2004).

A ativação de PPAR- α por seus ligantes resulta em aumento da lipólise e do “clearance” de lipoproteínas aterogênicas ricas em triacilgliceróis através da ativação da lipase lipoprotéica e da apolipoproteína AV (ApoAV) e redução da produção do inibidor da lipase lipoprotéica: a apolipoproteína CIII (ApoCIII) (Chapman, 2006).

A terapia com ativadores de PPAR- α também promove a β -oxidação de ácidos graxos, reduzindo a biodisponibilidade destes para a síntese de triacilgliceróis, inibe a síntese de novo de ácidos graxos através da redução da atividade da acetil-CoA carboxilase e da ácido graxo sintase e aumenta a síntese das apolipoproteínas AI e AII (ApoAI e ApoAII) (Schoonjans *et al.*, 1996).

Indução da expressão de genes chaves do metabolismo de lipídios, como o da HidroximetilglutarilcoenzimaA redutase (HMGCoA) e do receptor hepático da lipoproteína de baixa densidade (LDL-R) (Huang *et al.*, 2008), assim como repressão da expressão gênica da colesterol-7 α -hidroxilase (CYP7A1) são observadas durante a ativação de PPAR- α (Li *et al.*, 2009).

Existem consideráveis evidências de que PPAR- α apresente ações anti-ateroscleróticas e antiinflamatórias (Figura VII), devido ao aumento da expressão de ApoAI e ABCA1 e à diminuição de endotelina 1, do fator tissular e da molécula de adesão da célula vascular 1

(VCAM-1) (Marx *et al.*, 1999). Em particular, VCAM-1 tem um papel crítico no desenvolvimento da aterosclerose por permitir a adesão de monócitos ao endotélio e iniciar os processos de desenvolvimento da placa aterosclerótica.

Trabalhos mostram que agonistas de PPAR- α reduzem a concentração plasmática do fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interferon gama (IFN- γ), interleucina 6 (IL-6) e expressão de IL-6 induzida pela interleucina 1 (IL-1) (Madej *et al.*, 1998).

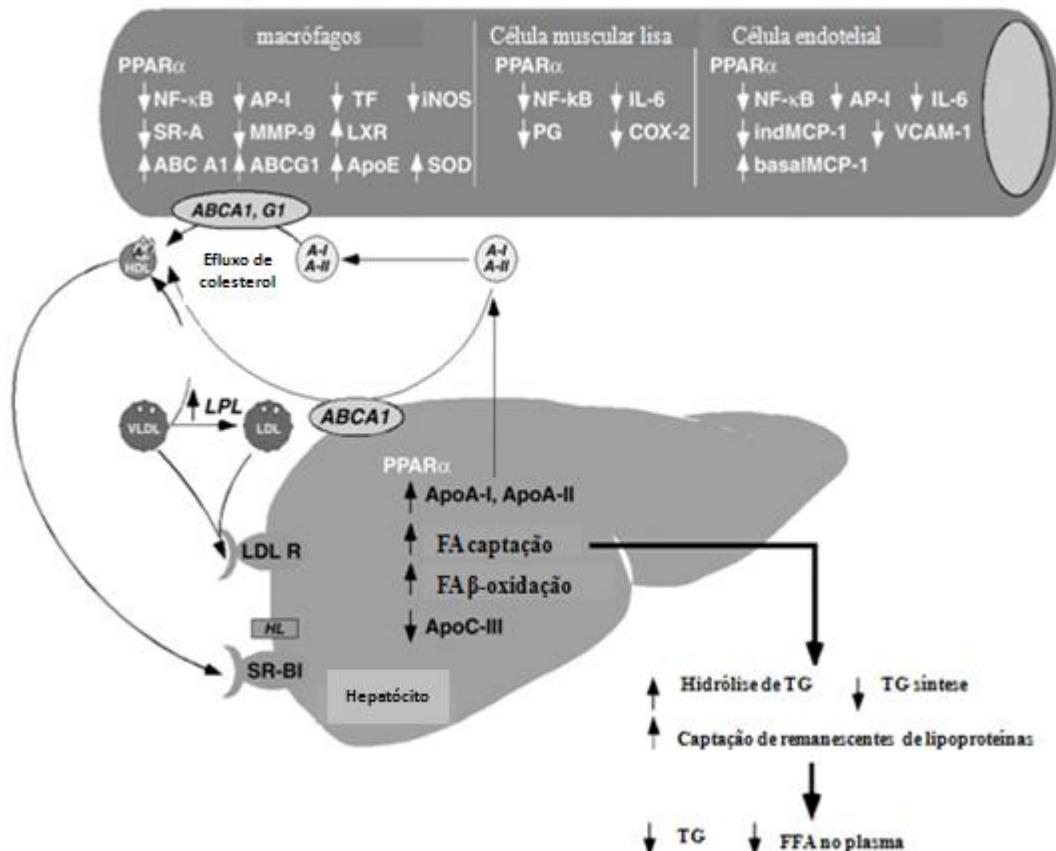


Figura VII: Ações do PPAR- α sobre a parede dos vasos e fígado. Fator nuclear B (NFkB); Proteína ativadora 1 (AP-1); Fator tissular (TF); Óxido nítrico sintase induzível (iNOS); Receptor scavenger A (SR-A); metaloproteinase de matrix 9 (MMP-9); Receptor X do fígado (LXR); Transportador cassette ligador de ATP 1 e G1 (ABCA1, ABCG1); Superóxido dismutase (SOD); Interleucina 6 (IL-6); Prostaglandinas (PG); Ciclooxygenase 2 (COX-2); Proteína quimioatrativa de monócitos induzível e basal (1ndMCP-1 e basalMCP-1); Mólecula de adesão celular vascular (VCAM-1); Receptor scavenger B-I (SR-BI); Ácido graxo (FA); Ácido graxo livre (FFA); Triacilgliceróis (TG).

Fonte: Adaptado de Francis *et al.*, 2003.

3- JUSTIFICATIVA

O ferro é um elemento essencial para o organismo, já que este atua como cofator de várias enzimas, entre elas a catalase, enzima antioxidante que catalisa a formação de oxigênio e água a partir de peróxido de hidrogênio. No entanto, em situações onde o excesso de ferro está estabelecido, a formação de radicais livres é favorecida, o que pode promover o aumento do dano oxidativo celular.

No Brasil, práticas de suplementação de alimentos com ferro têm sido indiscriminadas e não se sabe, a longo prazo, quais serão os efeitos do excesso de ferro sobre a população, principalmente sobre indivíduos que apresentem desordens metabólicas relacionadas ao metabolismo de lipídios, que apresentem riscos para doenças cardiovasculares ou algum quadro já estabelecido, e em indivíduos diabéticos.

Baseados nas evidências de que o excesso de ferro está envolvido no desenvolvimento de várias doenças crônico-degenerativas, incluindo as doenças cardiovasculares, principalmente devido ao aumento do estresse oxidativo celular e diante dos seguintes fatos: a ativação de PPAR- α está relacionada com efeitos anti-ateroscleróticos e antiinflamatórios; este receptor nuclear pode regular a expressão de proteínas chaves na homeostase de colesterol como a HMGCoA redutase, LDLR e CYP7A1; e o excesso de estoque de ferro pode atuar sobre o metabolismo de lipídios, uma vez que este é capaz de agir sinergicamente com a dieta hipercolesterolemante aumentando ainda mais os níveis séricos de colesterol em hamsters hipercolesterolêmicos (Silva *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2007), a hipótese deste trabalho é de que o excesso de ferro possa estar alterando, direta ou indiretamente, através do aumento do estresse oxidativo, a expressão de PPAR- α ou de alguns de seus genes alvos sobre o metabolismo de colesterol.

4- OBJETIVOS

4.1- Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do excesso de ferro sobre parâmetros bioquímicos e moleculares relacionados ao metabolismo de lipídios em um modelo animal de hipercolesterolemia induzida pela dieta.

4.2- Objetivos Específicos

Em hamsters alimentados com dieta hipercolesterolemiantre ou padrão e tratados ou não com injeções de ferro dextran avaliar:

- I. Homeostase de ferro;
- II. *Status* antioxidante e biomarcadores do estresse oxidativo;
- III. Produção de espécies reativas por granulócitos;
- IV. Perfil lipídico sérico;
- V. Expressão do RNAm de genes relacionados ao metabolismo de lipídios;
- VI. Perfil glicêmico;
- VII. Função hepática, determinada através das atividades séricas das aminotransferases.
- VIII. Ganho de peso e peso relativo dos órgãos.

5- MATERIAL E MÉTODOS

5.1- Animais

Foram utilizados no experimento 52 hamsteres *Golden Syrian*, albinos, machos com aproximadamente 60 dias de idade e peso médio de 110g, provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Alimentos, Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, dispostas em ambiente arejado com controle de temperatura, umidade e luminosidade. Durante o experimento o manejo dos mesmos foi de acordo com os princípios e diretrizes descritas no Canadian Council on Animal Care (1984) e os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Ouro Preto (Protocolo (OF) 013).

5.2- Dietas

Os animais foram alimentados com dieta padrão AIN-93M, 4% óleo de soja (Reeves *et al.*, 1993), ou dieta hipercolesterolemante com 17% de óleo de soja e 0,5% de colesterol. A composição das dietas experimentais está descrita na Tabela I. Os teores de óleo e colesterol da dieta hipercolesterolemante foram definidos a partir de Turbino-Ribeiro (2003) e adaptados à dieta AIN-93M.

Todas as dietas foram confeccionadas no Laboratório de Nutrição Experimental, Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto. Acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em freezer. Durante o experimento, as dietas e a água foram oferecidas aos animais *ad libitum*.

Tabela I: Composição das dietas Padrão e Hipercolesterolemianta para hamsteres, em gramas para cada 1000g de dieta.

Ingredientes	Dieta Padrão (g)	Dieta Hipercolesterolemianta (g)
Caseína	167*	167*
Mistura mineral	35	35
Mistura vitamínica	10	10
Celulose	50	50
Óleo	40	170
Colesterol	0	5
Colina	2,5	2,5
Sacarose	100	100
Amido de milho	595,5	460,5

* Valor corrigido para uma caseína com 72% de pureza.

¹**Mistura de minerais** (expresso por g/kg da mistura): NaCl – 139,3 / KI- 0,79 / MgSO₄·7H₂O- 57,3 / CaCO₃- 381,4 / MnSO₄·H₂O – 4,01 / FeSO₄·7H₂O – 0,548 / CuSO₄·5H₂O – 0,477 / CoCl₂·6H₂O – 0,023 / KH₂PO₄ – 389,0. Os sais foram adquiridos do Reagen, Rio de Janeiro, Brasil.

²**Mistura de vitaminas** (expresso por em mg/kg da mistura): Acetato de retinol – 690; colecalciferol – 5; ácido *p*-amino benzóico – 10 000; inositol – 10 000; niacina – 4000; riboflavina – 800; tiamina HCL – 500; ácido fólico – 200; botina – 40; cianocobalamina – 3; *dl*-α - tocoferol – 6 700; sacarose – q.s.p. 1000. As vitaminas foram adquiridas da Merck, Darmstadt, Alemanha.

5.3- Delineamento Experimental

Os animais foram divididos em quatro grupos de 13 animais de acordo com a dieta recebida e com o tratamento ou não com injeções de ferro dextran: os grupos C e CF receberam dieta padrão e os grupos H e HF receberam dieta hipercolesterolemianta. No quadragésimo quinto dia de experimento, os grupos CF e HF receberam injeções intraperitoneais de ferro dextran (doses diárias de 10mg durante cinco dias). Aos grupos que não receberam ferro foram administradas injeções de salina. Ao final de sessenta dias os hamsteres foram eutanasiados após oito horas de jejum, para coleta de sangue e tecidos. Os animais foram pesados semanalmente durante todo o experimento.

O sangue foi recolhido em tubos de polipropileno (com 2,0mL de capacidade) com ou sem 15 μ L de anticoagulante Glistab® (Labtest cat. 29) para obtenção do plasma ou soro, respectivamente. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 13000 rpm por 15 minutos e o plasma ou soro guardados sob refrigeração (-12°C). As diversas dosagens bioquímicas foram realizadas imediatamente ou em até três dias. Os órgãos: fígado, baço, coração e rins, bem como a gordura abdominal foram extraídos e posteriormente pesados. Pedaços de fígado e rim foram estocados em tubos de polipropileno (com 1,5mL de capacidade) e imediatamente congelados em nitrogênio líquido durante a eutanásia. Posteriormente foram estocados à -80°C até a realização das análises teciduais. Pedaços de fígado também foram retirados, estocados em tubos de polipropileno e imediatamente congelados em nitrogênio líquido para posterior estocagem à -80°C para análise da expressão de RNAm.

5.4- Dosagens dos Parâmetros Bioquímicos

Neste trabalho realizamos dosagens bioquímicas utilizando kits Labtest Diagnóstica S.A.: Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST), Colesterol-HDL, Colesterol Total, Triacilgliceróis (TAG), hemoglobina, glicose, ferro sérico e capacidade latente de ligação do ferro (CLLF). Utilizamos Kit Katal para análise hemoglobina glicosilada. Foram determinadas ainda: concentração de grupos sulfidrilas totais (Sedlak e Lindsay, 1968), atividade da paraoxonase (Eckerson *et al.*, 1983; Beltowski *et al.*, 2002), atividade da SOD (kit Fluka # 19160 USA), concentração de glutationa total (kit Sigma # CS0260), atividade da catalase (Aebi, 1984), concentração de proteína carbonilada (Levine *et al.*, 1994), concentração de proteínas totais em tecido (Lowry *et al.*, 1951), concentração de TBARS (Buege & Aust, 1978) e a concentração de ferro no fígado (AOAC, 1980).

Os princípios das dosagens e seus respectivos protocolos estão descritos no Anexo I deste trabalho. Para determinação da concentração do colesterol não-HDL foi feita a subtração da concentração do colesterol total pela concentração do colesterol HDL.

$$\text{Colesterol não-HDL (mmol/L)} = \text{Colesterol Total (mmol/L)} - \text{Colesterol HDL (mmol/L)}$$

Para a determinação da capacidade total de ligação do ferro (CLLF) foi realizado o somatório da concentração de ferro sérico com a capacidade latente de ligação de ferro (CLLF).

$$\text{CLLF (\mu mol/L)} = \text{CLLF (\mu mol/L)} + \text{ferro sérico (\mu mol/L)}$$

5.5- Teste de tolerância oral à glicose

Os animais permaneceram 12 horas em jejum antes de receberem uma solução de 2,5g de glicose por kg, em 1mL, por gavagem. Amostras de sangue foram coletadas nos momentos 0, 30 e 60 depois da administração da solução de glicose. Os níveis de glicose foram determinados usando o aparelho Accu- Chek® Active da Roche.

5.6- Produção de radicais livres por granulócitos *in vivo*

5.6.1- Isolamento de leucócitos polimorfonucleares

Os granulócitos foram obtidos a partir do sangue periférico por hemorragia do plexo braquial segundo a técnica descrita por Bicalho *et al.*, 1981. Resumidamente, 4 ml de sangue periférico heparinizado, foram adicionados sobre 6 ml de gradiente duplo de Ficoll-hypaque (densidade = 1,08 e 1,12, respectivamente) em tubos siliconizados. Após centrifugação a 100 G por 20 minutos foram obtidas duas fases distintas separadas por dois anéis interfásicos, sendo o anel superior formado por células mononucleares e o inferior por granulócitos. O anel rico em granulócitos foi colocado em tubo siliconizado, com o auxílio de uma pipeta. Em seguida, esse anel foi lavado duas vezes em PBS pH 7,4. Após as duas lavagens as células foram ressuspensas em 1,0 ml de PBS pH 7,4. Os granulócitos foram utilizados para o ensaio de quimioluminescência. A viabilidade celular foi avaliada pela exclusão com azul de Tripan e mostrou-se sempre superior a 95%.

5.6.2 – Ensaio de quimioluminescência

Para avaliar a geração de EROS foi realizado um ensaio de quimioluminescência amplificado por luminol durante a ativação das células fagocíticas, como descrito por Chaves, *et al.*, 2000. O ensaio de quimioluminescência permite avaliar, diretamente, a atividade da NADPH-oxidase, a enzima responsável pela geração de espécies reativas de oxigênio, durante a ativação das células fagocíticas (Babior, 1994). Esta técnica baseia-se na reação entre luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4phthalozinedione) e as espécies reativas geradas. A reação ocorre no interior de um sistema de catôdo e anôdo, o que permite a captação e registro dos fótons emitidos pelo α-aminoftalato.

Para a realização do procedimento experimental, granulócitos de hamsteres *Golden Syrian* (1×10^6 células em solução PBS pH 7,4) foram incubados com 500 µL de luminol (10^{-4} M) por 30 min, em tubos siliconizados. Os fótons emitidos neste intervalo foram registrados de 1 em 1 min pela impressora interna do luminômetro durante os 30min. Ao final dos ensaios, obtivemos as médias, cujos valores foram expressos em RLU/min.

5.7- Análise da expressão de RNAm

5.7.1- Coleta do material

Após a eutanásia dos animais, pedaços do fígado foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos à -80°C até serem processados.

5.7.2- Extração de RNA total

A extração do RNA total foi feita de acordo com as recomendações do kit RNAGents® Promega-Total RNA Isolation System- (Madison, USA). Resumidamente, cada 50 mg de fígado foi homogeneizada com 600 µl de solução desnaturante A separação da fase aquosa desta mistura foi obtida adicionando 60µl de 2M acetato de sódio e 600µl fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugado a 10.000 RPM por 20 minutos a 4°C. Para precipitação do RNA, adicionou-se à fase aquosa igual volume de isopropanol que foi incubada a -20°C por 20 minutos e depois centrifugada a 10000 RPM a 4°C. O pellet foi lavado com etanol 75% e seco a temperatura ambiente por 15 minutos e posteriormente ressuspendido com 100 µl de água DEPC. A concentração e pureza do RNA total foi verificada a 260 e 280 nm no espectofotômetro NanoVue da GE Healthcare (United Kingdom).

5.7.3- Síntese do cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total utilizando o kit GeneAmp® RNA PCR da Applied Biosystems (Foster City, USA). O cDNA foi preparado em uma reação (20 µl) contendo de 1 a 5 µg de RNA total, 2 µl do Tampão 10x (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 25 mM MgCl₂, pH 8.3), 0,8 µl mistura de 100mM dNTP, 1µl de 2,5 µM Oligo d(T)₁₆, 1 µl da enzima Transcriptase Reversa MultiScribe™ (50 U/ µl). A reação foi incubada no termociclador Biocycler modelo MJ96+ por 10 minutos a 25°C, seguido de 120 minutos a 37°C e 5 minutos a 85°C.

5.7.4- Especificidade dos iniciadores para qPCR

Os iniciadores utilizados para os genes da β-actina e PPARα foram escolhidos de acordo com a literatura enquanto que para os genes CYP-7, SREBP e HMG-CoA foram selecionados a partir do genoma de rato utilizando o programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) (Tabela II).

Antes de realizar o PCR quantitativo (qPCR), cada iniciador foi testado tanto quanto a sua especificidade quanto à sua eficiência de amplificação. O teste de especificidade foi

realizado através da RT-PCR para verificar o tamanho dos fragmentos amplificados. Cada reação de 12,5 µl consistiu de uma mistura de 2µl de cDNA, 1,25 µl de tampão RB 10 X (500mM KCl, 100mM tris-HCl pH 8,4, 1% Triton X-100), 0,3 µl de Taq DNA Polimerase (5U/ µl) da Phoneutria (Belo Horizonte, MG) ,1 µl de 1mM de dNTP e 1,5 µl de 10 µM de cada iniciador. A reação foi incubada no termociclador Biocycler modelo MJ96+ por 40 ciclos, sendo que cada ciclo possui um passo de desnaturação de 30 segundos a 94°C, um passo de anelamento de 30 segundos a 50°C, e um passo de extensão de 1 minuto a 72°C. Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo.

5.7.5- PCR em Tempo Real (qPCR)

A análise da expressão gênica foi feita através da qPCR usando o cálculo relativo ΔCt . O Ct é o primeiro ciclo de amplificação no qual a fluorescência é detectada acima da linha basal. Para esta análise é necessário inicialmente comprovar a eficiência de cada iniciador. Iniciadores com eficiência entre 90-110% serão utilizados. A eficiência dos iniciadores foi realizada através de uma curva usando diluições seriadas de 1000, 100, 10, 1, 0,1, 0,01 nanogramas do cDNA preparado. Cada reação de 25 µl foi feita em triplicata e consistiu de uma mistura de 12,5 µl de 2X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1 µl de 10 µM de iniciador e 2 µl de cDNA de concentração correspondente. A reação foi incubada na máquina de PCR Tempo Real ABI 7300 (Applied Biosystems). Depois de uma etapa inicial de 50°C por 2 min para ativação da ampUNG e 95°C por 10 min para inativação ampUNG e ativação da TaqGOLD, foram feitos 40 ciclos de 60 e 95°C por 1 min cada um. Em seguida, o programa 7300 Fast System criou um gráfico a partir dos valores do Ct e da concentração da amostra em cada uma das diluições. O cálculo da eficiência da PCR é feita a partir da inclinação das retas para cada diluição utilizando a seguinte equação (Rasmussen, 2001):

$$E=10^{-\frac{1}{\text{inclinação}}}-1$$

Após o cálculo da eficiência dos iniciadores, cada reação de 25 µl foi feita em duplicata e consistiu de uma mistura de 12,5 µl de 2X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1 µl de 10 µM de iniciador e 2 µl de cDNA. A reação foi incubada na máquina de PCR Tempo Real ABI 7300 (Applied Biosystems) e seguiu a mesma programação descrita

acima com exceção da curva de dissociação. A seguir foi feita a determinação do Ct para a quantificação relativa. A partir dos valores de Ct, foi calculado o ΔCt de cada amostra onde o valor do Ct do gene controle (β -actina) foi subtraído do Ct do gene alvo:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene controle}$$

Para análise estatística, os valores de $2^{-\Delta Ct}$, encontrados para todas as amostras pertencentes a um mesmo grupo foram reunidos para análise de variância bivariada (ANOVA- *two way*).

Finalmente, os produtos de PCR foram submetidos a uma curva de dissociação para verificar a pureza dos produtos. O corante SYBR Green se liga ao DNA dupla fita de uma maneira independente da sequência, e assim a fluorescência pode ser emitida tanto para produtos específicos quanto inespecíficos. A curva de dissociação é normalmente realizada para excluir a análise de produtos não específicos. A desnaturação do produto de PCR provoca uma rápida redução no sinal da fluorescência perto da temperatura de desnaturação (Tm) do produto de PCR. Assim, após a amplificação, as reações foram lentamente aquecidas 0,1 °C/s de 60 a 95 °C e as curvas de dissociação foram analisadas.

Tabela II: Iniciadores utilizados

Gene/Nome	Sequência dos iniciadores (5' → 3')	Tamanho do fragmento	Refefênciia ou Acesso GeneBank
PPAR α	F – TGTCGAATATGTGGGGACAA	215 pb	Palou <i>et al.</i> (2008)
	R – AAACGGATTGCATTGTGTGA		
CYP-7	F – TGTCCCTGGAAGACTCTTGCG	115 pb	NM012942.1
	R – ACTGGTCTAGAGGGGGACAC		
SREBP-2	F – TTCTTAAATCGTGCCCAGAG	124 pb	NM001033694.1
	R – CTGACTTGTGATCGACCAGCTT		
HMGCoA-R	F – ACAGAATGTGGGGAGTTCAA	139 pb	NM013134.2
	R – TTGCTGAGGTAGAAGGTTGG		
LDL-R	F – GACTCCTGGAGATGTGATGG	144 pb	NM175762.2
	R – CCAGTCTTGGTCACACACAA		
Actina	F – ACTGGCATTGTGATGGACTC	165pb	Bonefeld <i>et al.</i> (2008)
	R – GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC		

5.8- Análise estatística

Os dados foram analisados pelo teste de normalidade Kolmogorov–Smirnov. Todos os dados seguiram uma distribuição normal e foram analisados pela análise de variância bivariada (ANOVA- *two way*), os fatores de classificação foram a dieta, o tratamento com ferro e também sua interação. O teste de Tukey foi usado para determinar as diferenças entre os grupos quando a interação entre dieta e ferro foi observada ($p < 0,05$). Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. O parâmetro de produção de radicais livres por granulócitos foi analisado pela análise de variância univariada (ANOVA- *one way*) sendo considerada diferença significativa quando $p < 0,05$. O *software* utilizado para realização destas análises foi o GraphPad Prism 4.

6- RESULTADOS

6.1- Peso corporal e peso relativo dos órgãos

De acordo com a tabela 1, não observamos diferença estatística entre os grupos para o peso inicial e final dos animais. Houve interação entre os tratamentos para o ganho de peso, onde o grupo HF ($5,20 \pm 2,37$ g) apresentou menor média, os grupos C ($14,83 \pm 8,23$ g), CF ($16,48 \pm 3,06$ g) e H ($14,73 \pm 2,06$ g) apresentaram as maiores médias e não apresentaram diferença estatística entre si. O peso relativo do fígado foi aumentado pelos dois tratamentos. Não foi observada diferença estatística entre os grupos para o peso relativo dos rins.

Tabela 1: Peso inicial, peso final, ganho de peso e peso relativo do fígado e dos rins de hamsteres tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e injeções de ferro dextran (CF), dieta hipercolesterolemante (H) e dieta hipercolesterolemante e injeções de ferro dextran (HF).

Grupos	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganho de peso (g)	Peso relativo do fígado (%)	Peso relativo dos rins (%)
C	$110,63 \pm 11,03$	$125,45 \pm 9,73$	$14,83 \pm 8,23^a$	$2,79 \pm 0,18$	$0,64 \pm 0,11$
CF	$109,63 \pm 13,14$	$126,10 \pm 11,02$	$16,48 \pm 3,06^a$	$3,19 \pm 0,40^*$	$0,69 \pm 0,09$
H	$109,14 \pm 6,91$	$123,87 \pm 7,19$	$14,73 \pm 2,06^a$	$4,12 \pm 0,37\#$	$0,68 \pm 0,03$
HF	$113,75 \pm 13,56$	$118,95 \pm 12,14$	$5,20 \pm 2,37^b$	$4,91 \pm 0,50^{*\#}$	$0,69 \pm 0,09$
Valor de p					
Dieta	>0,05	>0,05	<0,05	<0,05	>0,05
Ferro	>0,05	>0,05	<0,05	<0,05	>0,05
Interação	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05

Os dados foram analisados por análise de variância bivariada, quando a interação foi significativa ($P<0,05$) o teste de Tukey foi utilizado para determinar as diferenças específicas entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey, $p<0,05$. Na coluna, valores estatisticamente diferentes foram marcados com letras sobrescritas diferentes, apenas quando uma interação entre os fatores foi observada ($P < 0,05$). # Efeito da dieta; *Efeito do ferro.

De acordo com a tabela 2, observamos diminuição do peso relativo do tecido adiposo marrom pela dieta hipercolesterolemante (hiper). O peso relativo do baço foi aumentado pelo tratamento com ferro. Não houve diferença estatística entre os grupos para o peso relativo do coração e do pâncreas. O peso relativo da gordura abdominal foi diminuído pela dieta hiper.

Tabela 2: Peso relativo do tecido adiposo marrom (TAM), peso relativo do baço, peso relativo do coração, peso relativo do pâncreas e da gordura abdominal de hamsteres tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e injeções de ferro dextran (CF), dieta hipercolesterolemante (H) e dieta hipercolesterolemante e injeções de ferro dextran (HF).

Grupos	Peso relativo do TAM (%)	Peso relativo do baço (%)	Peso relativo do coração (%)	Peso relativo do pâncreas (%)	Peso relativo da gordura abdominal (%)
C	0,19 ± 0,04	0,11 ± 0,02	0,40 ± 0,07	0,4 ± 0,07	1,05 ± 0,27
CF	0,20 ± 0,04	0,15 ± 0,08*	0,39 ± 0,02	0,40 ± 0,06	0,92 ± 0,27
H	0,14 ± 0,04#	0,11 ± 0,03	0,36 ± 0,02	0,44 ± 0,08	0,83 ± 0,14#
HF	0,16 ± 0,04#	0,17 ± 0,06*	0,40 ± 0,06	0,39 ± 0,07	0,76 ± 0,19#
Valor de p					
Dieta	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05
Ferro	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Interação	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Os dados foram analisados por análise de variância bivariada, quando a interação foi significativa ($P<0,05$) o teste de Tukey foi utilizado para determinar as diferenças específicas entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey, $p<0,05$. Na coluna, valores estatisticamente diferentes foram marcados com letras sobrescritas diferentes, apenas quando uma interação entre os fatores foi observada ($P < 0,05$). # Efeito da dieta; *Efeito do ferro.

6.2- Biomarcadores de função hepática

Analisamos a atividade sérica da alanina aminotransferase (ALT) e da aspartato aminotransferase (AST) como biomarcadores de lesão hepática.

De acordo com a tabela 3, em relação à atividade da ALT, observamos que houve interação entre os tratamentos, onde o grupo HF ($25,77 \pm 3,73$ UI) apresentou a maior atividade, seguido do grupo H ($20,84 \pm 1,82$ UI). Os grupos C ($15,77 \pm 2,32$ UI) e CF ($16,22 \pm 1,4$ UI) apresentaram as menores médias e não apresentaram diferença estatística entre si. Também observamos interação entre os tratamentos para a atividade da AST, onde o grupo HF apresentou maior média ($25,01 \pm 9,62$ UI) seguido dos grupos C ($15,65 \pm 4,29$ UI), CF ($14,8 \pm 3,26$ UI) e H ($15,96 \pm 2,44$ UI) que não apresentaram diferença estatística entre si.

Tabela 3: Atividade sérica da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) de hamsters tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e injeções de ferro dextran (CF), dieta hipercolesterolemante (H) e dieta hipercolesterolemante e injeções de ferro dextran (HF).

Grupos	ALT (UI)	AST (UI)
C	15,77 ± 2,32 ^c	15,65 ± 4,29 ^b
CF	16,22 ± 1,40 ^c	14,80 ± 3,26 ^b
H	20,84 ± 1,82 ^b	15,96 ± 2,44 ^b
HF	25,77 ± 3,73 ^a	25,01 ± 9,62 ^a
Valor de p		
Dieta	<0,05	<0,05
Ferro	<0,05	>0,05
Interação	<0,05	<0,05

Os dados foram analisados por análise de variância bivariada, quando a interação foi significativa ($P<0,05$) o teste de Tukey foi utilizado para determinar as diferenças específicas entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey, $p<0,05$. Na coluna, valores estatisticamente diferentes foram marcados com letras sobrescritas diferentes, apenas quando uma interação entre os fatores foi observada ($P < 0.05$). # Efeito da dieta; *Efeito do ferro.

6.3- Homeostase do ferro

Os parâmetros relacionados à homeostase do ferro foram analisados com o objetivo de avaliarmos a eficácia do tratamento com ferro dextran sobre os níveis séricos de ferro, capacidade latente de ligação do ferro (CLLF), capacidade total de ligação do ferro (CTLF) e ferro total no fígado.

De acordo com a tabela 4, observamos que tanto a dieta quanto o tratamento com ferro aumentaram a concentração de ferro no soro. Houve interação entre os tratamentos para a CLLF, onde o grupo H apresentou a maior média ($19,39 \pm 2,57 \mu\text{mol/L}$), seguido do grupo C ($13,79 \pm 1,55 \mu\text{mol/L}$), seguido dos grupos CF ($8,39 \pm 0,69 \mu\text{mol/L}$) e HF ($10,43 \pm 1,27 \mu\text{mol/L}$) que não apresentaram diferença estatística entre si. A dieta hiper e o tratamento com ferro aumentaram a CTLF. Houve interação entre os tratamentos para a concentração hepática de ferro, onde o grupo CF ($50,77 \pm 7,13 \mu\text{mol/L}$) apresentou a maior média, seguido do grupo HF ($35,96 \pm 8,04 \mu\text{mol/L}$), seguido dos grupos C ($6,61 \pm 1,83 \mu\text{mol/L}$) e H ($7,44 \pm 1,72 \mu\text{mol/L}$) que não apresentaram diferença estatística entre si para este parâmetro.

Acreditamos que a dieta hiper tenha causado um acúmulo hepático de gordura, fato que justifica o aumento do peso relativo do fígado nos animais que receberam esta dieta, e desta forma, sugerimos que o ferro esteja diluído no fígado. Este fato pode ser constatado quando

avaliamos a quantidade de ferro total no fígado que como esperado, foi aumentada pelo tratamento com ferro (tabela 4).

Tabela 4: Concentração sérica de ferro, capacidade latente de ligação do ferro (CLLF), capacidade total de ligação do ferro (CTLF), concentração hepática de ferro e quantidade total de ferro no fígado de hamsteres tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e injeções de ferro dextran (CF), dieta hipercolesterolemante (H) e dieta hipercolesterolemante e injeções de ferro dextran (HF).

Grupos	Concentração de ferro no soro ($\mu\text{mol/L}$)	CLLF ($\mu\text{mol/L}$)	CTLF ($\mu\text{mol/L}$)	Concentração de ferro no fígado ($\mu\text{mol/L}$)	Ferro total no fígado (μmol)
C	$67,20 \pm 8,78$	$13,79 \pm 1,55^{\text{b}}$	$81,00 \pm 8,08$	$6,61 \pm 1,83^{\text{c}}$	$2,31 \pm 0,60$
CF	$83,13 \pm 11,65^*$	$8,39 \pm 0,69^{\text{c}}$	$91,59 \pm 12,23^*$	$50,77 \pm 7,13^{\text{a}}$	$20,19 \pm 2,36^*$
H	$81,76 \pm 10,98^{\#}$	$19,39 \pm 2,57^{\text{a}}$	$101,14 \pm 9,98^{\#}$	$7,44 \pm 1,72^{\text{c}}$	$3,81 \pm 1,02$
HF	$110,77 \pm 7,68^{\#*}$	$10,43 \pm 1,27^{\text{c}}$	$120,20 \pm 8,06^{\#*}$	$35,96 \pm 8,04^{\text{b}}$	$19,34 \pm 3,11^*$
Valor de p					
Dieta	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05
Ferro	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Interação	>0,05	<0,05	>0,05	<0,05	>0,05

Os dados foram analisados por análise de variância bivariada. Quando a interação foi significativa ($P<0,05$) o teste de Tukey foi utilizado para determinar as diferenças específicas entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey, $p<0,05$. Na coluna, valores estatisticamente diferentes foram marcados com letras sobrescritas diferentes, apenas quando uma interação entre os fatores foi observada ($P < 0,05$). # Efeito da dieta; *Efeito do ferro.

6.4- Análise do status oxidativo

6.4.1- Defesas antioxidantes e biomarcadores do estresse oxidativo

A atividade hepática e renal da catalase, assim como a concentração hepática de glutationa total e a atividade sérica da superóxido dismutase (SOD) foram os parâmetros antioxidantes avaliados neste trabalho. Como biomarcadores do estresse oxidativo, avaliamos a formação de lipoperóxidos medida pela concentração de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a concentração de proteína carbonilada tanto no fígado quanto nos rins, bem como a produção de espécies reativas de oxigênio por granulócitos. Os níveis séricos de sulfidrilas totais também foram determinados.

De acordo com a tabela 5, em relação à atividade hepática da catalase, observamos que tanto o tratamento com ferro quanto a dieta hiper diminuíram a atividade desta enzima no fígado. Houve interação entre os tratamentos para a concentração hepática de glutationa, sendo que o grupo C ($34,75 \pm 2,60 \text{ nmol/mL}$) apresentou a maior média e o grupo H ($26,96 \pm$

3,26 nmol/mL) apresentou a menor média. Avaliamos ainda, a quantidade de glutationa total no fígado, já que a concentração poderia estar diminuída devido ao acúmulo de gordura no órgão. Com relação à quantidade de glutationa total no fígado houve interação entre os tratamentos, onde o grupo HF apresentou a maior média ($1666,58 \pm 187,72$ nmoles) para este parâmetro e os demais grupos não apresentaram diferença estatística entre si. A atividade sérica da superóxido dismutase também foi aumentada tanto pela dieta quanto pelo tratamento com ferro, porém não houve interação entre ambos.

Em resumo estes dados demonstram que hamsters tratados com ferro apresentam uma alteração das defesas antioxidantes.

Tabela 5: Atividade hepática da catalase, concentração hepática de glutationa, quantidade total de glutationa no fígado e atividade sérica da superóxido dismutase (SOD) de hamsters tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e injeções de ferro dextran (CF), dieta hipercolesterolemante (H) e dieta hipercolesterolemante e injeções de ferro dextran (HF).

Grupos	Catalase no fígado (U/mg de proteína)	Concentração de Glutationa no fígado (nmol/mL)	Glutationa total no fígado (nmoles)	SOD no soro (%)
C	$498,14 \pm 158,92$	$34,75 \pm 2,60^a$	$1214,75 \pm 112,38^b$	$60,82 \pm 9,56$
CF	$435,16 \pm 75,84^*$	$31,6 \pm 2,45^{a,b}$	$1262,70 \pm 105,35^b$	$68,94 \pm 5,27^*$
H	$408,05 \pm 62,90^{\#}$	$26,96 \pm 3,26^c$	$1367,12 \pm 147,16^b$	$71,78 \pm 13,40^{\#}$
HF	$295,18 \pm 49,47^{\#\ast}$	$28,66 \pm 3,18^{b,c}$	$1666,58 \pm 187,72^a$	$76,28 \pm 5,80^{\#\ast}$
Valor de p				
Dieta	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Ferro	<0,05	>0,05	<0,05	<0,05
Interação	>0,05	<0,05	<0,05	>0,05

Os dados foram analisados por análise de variância bivariada, quando a interação foi significativa ($P<0,05$) o teste de Tukey foi utilizado para determinar as diferenças específicas entre os grupos.

Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey, $p<0,05$. Na coluna, valores estatisticamente diferentes foram marcados com letras sobrescritas diferentes, apenas quando uma interação entre os fatores foi observada ($P < 0,05$). # Efeito da dieta; *Efeito do ferro.

De acordo com a tabela 6, em relação à concentração de TBARS no fígado, observamos interação entre os tratamentos, sendo que o grupo CF ($1,85 \pm 0,31$ nmol/mg de proteína) apresentou a maior média, seguido do grupo HF ($0,73 \pm 0,24$ nmol/mg de proteína). Já os grupos C ($0,40 \pm 0,10$ nmol/mg de proteína) e H ($0,31 \pm 0,12$ nmol/mg de proteína) apresentaram as menores médias e não apresentaram diferença estatística entre si. Da mesma forma houve interação entre os tratamentos para a quantidade total de TBARS no fígado, sendo que o grupo CF ($446,86 \pm 75,41$ nmoles) apresentou a maior média, seguido do grupo

HF ($233,59 \pm 80,75$ nmoles). Os grupos C ($89,3 \pm 24,05$ nmoles) e H ($89,72 \pm 36,24$ nmoles) apresentaram as menores médias e não apresentaram diferença estatística entre si. Observamos que tanto a dieta hiper quanto o tratamento com ferro diminuíram a concentração de proteína carbonilada no fígado. Porém, quando avaliamos a quantidade total de proteína carbonilada no fígado, observamos que os animais que receberam dieta hiper (H + HF) apresentaram aumento destes níveis em relação aos animais que receberam dieta padrão (C + CF). Houve interação entre os tratamentos para a concentração sérica de sulfidrilas totais, onde os grupos HF ($325,56 \pm 15,05$ $\mu\text{mol/L}$), CF ($389,49 \pm 51,48$ $\mu\text{mol/L}$) e C ($372,37 \pm 54,21$ $\mu\text{mol/L}$) apresentaram as maiores médias seguidos do grupo H ($240,71 \pm 54,9$ $\mu\text{mol/L}$) que apresentou a menor média para este parâmetro.

Tabela 6: Concentração hepática de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), quantidade total de TBARS no fígado, concentração hepática de proteína carbonilada, quantidade total de proteína carbonilada no fígado e concentração sérica de sulfidrilas totais de hamsteres tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e injeções de ferro dextran (CF), dieta hipercolesterolemante (H) e dieta hipercolesterolemante e injeções de ferro dextran (HF).

Grupos	Concentração de TBARS no fígado (nmol/mg de proteína)	Quantidade total de TBARS no fígado (nmoles)	Concentração de Proteína carbonilada no fígado (nmol/mg de proteína)	Quantidade total de Proteína carbonilada no fígado (nmoles)	Sulfidrilas totais no soro ($\mu\text{mol/L}$)
C	$0,40 \pm 0,10^{\text{c}}$	$89,30 \pm 24,05^{\text{c}}$	$3,13 \pm 0,34$	$405,74 \pm 67,85$	$372,37 \pm 54,21^{\text{a}}$
CF	$1,85 \pm 0,31^{\text{a}}$	$446,86 \pm 75,41^{\text{a}}$	$2,91 \pm 0,40^*$	$410,38 \pm 73,96$	$389,49 \pm 51,48^{\text{a}}$
H	$0,31 \pm 0,12^{\text{c}}$	$89,72 \pm 36,24^{\text{c}}$	$2,97 \pm 0,29^{\#}$	$527,26 \pm 73,01^{\#}$	$240,71 \pm 54,90^{\text{b}}$
HF	$0,73 \pm 0,24^{\text{b}}$	$233,59 \pm 80,75^{\text{b}}$	$2,48 \pm 0,14^{\#*}$	$496,36 \pm 67,55^{\#}$	$325,56 \pm 15,05^{\text{a}}$
Valor de p					
Dieta	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Ferro	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05	<0,05
Interação	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05	<0,05

Os dados foram analisados por análise de variância bivariada, quando a interação foi significativa ($P < 0,05$) o teste de Tukey foi utilizado para determinar as diferenças específicas entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey, $p < 0,05$. Na coluna, valores estatisticamente diferentes foram marcados com letras sobrescritas diferentes, apenas quando uma interação entre os fatores foi observada ($P < 0,05$). # Efeito da dieta; *Efeito do ferro.

Na tabela 7 estão representados os parâmetros relacionados ao estresse oxidativo e defesa antioxidante nos rins. Em relação à atividade da catalase, não observamos diferença estatística entre os grupos. A média da concentração de TBARS dos animais tratados com ferro (CF + HF) foi aumentada aproximadamente 4,5 vezes em relação à média dos animais

não tratados (C + H). O mesmo aconteceu com a média da quantidade total de TBARS. Não houve diferença estatística entre os grupos para a concentração de proteína carbonilada assim como também não houve diferença estatística para a quantidade total de proteína carbonilada neste órgão.

Em conjunto os dados demonstram que hamsteres tratados com ferro apresentam aumento de biomarcadores do estresse oxidativo, principalmente com relação ao marcador de oxidação de lipídios (TBARS). As análises da quantidade total de ferro, glutationa, TBARS e proteína carbonilada no fígado foram necessárias porque em todos os casos o tratamento com a dieta hiper diminuiu a concentração destes marcadores, o que provavelmente ocorreu devido ao acúmulo de gordura no órgão, já que nos rins o mesmo efeito não foi observado para a concentração de TBARS e proteína carbonilada.

Tabela 7: Parâmetros relacionados ao estresse oxidativo e defesa antioxidante nos rins. Atividade da catalase, concentração de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), quantidade total de TBARS, concentração de proteína carbonilada, quantidade total de proteína carbonilada de hamsteres tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e injeções de ferro dextran (CF), dieta hipercolesterolemiante (H) e dieta hipercolesterolemianta e injeções de ferro dextran (HF).

Grupos	Catalase nos rins (U/mg de proteína)	Concentração de TBARS nos rins (nmol/mg de proteína)	Quantidade total de TBARS nos rins (nmoles)	Concentração de Proteína carbonilada nos rins (nmol/mg de proteína)	Quantidade total de Proteína carbonilada nos rins (nmoles)
C	81,44 ± 14,68	0,40 ± 0,08	15,77 ± 4,26	1,92 ± 0,44	50,29 ± 15,30
CF	86,02 ± 13,01	1,84 ± 0,43*	71,42 ± 17,83*	1,96 ± 0,35	55,40 ± 14,23
H	87,47 ± 11,95	0,37 ± 0,07	14,43 ± 3,36	2,00 ± 0,56	54,90 ± 17,58
HF	97,35 ± 8,66	1,61 ± 0,48*	60,28 ± 16,84*	2,18 ± 0,63	58,42 ± 22,50
Valor de p					
Dieta	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Ferro	>0,05	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05
Interação	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Os dados foram analisados por análise de variância bivariada, quando a interação foi significativa ($P < 0,05$) o teste de Tukey foi utilizado para determinar as diferenças específicas entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey, $p < 0,05$. Na coluna, valores estatisticamente diferentes foram marcados com letras sobrescritas diferentes, apenas quando uma interação entre os fatores foi observada ($P < 0,05$). # Efeito da dieta; *Efeito do ferro.

6.4.2- Produção de espécies reativas de oxigênio por granulócitos *in vivo*

Espécies reativas de oxigênio podem ser produzidas por células fagocíticas como mecanismo de defesa do hospedeiro contra organismos invasores, porém existem situações em que este sistema não se encontra balanceado, produzindo efeitos deletérios ao organismo em diferentes tipos de doenças, como por exemplo, processos inflamatórios crônicos (artrite reumatóide e resposta auto-imune), doenças do sistema cardiovascular incluindo aterosclerose, dano hepático e cerebral e câncer (Payá *et al.*, 1993). Para verificarmos se os tratamentos estudados aumentam o estresse oxidativo celular também avaliamos a produção de espécies reativas de oxigênio por granulócitos *in vivo*.

A produção de espécies reativas de oxigênio por granulócitos (figura 1) foi maior no grupo CF. O grupo HF apresentou produção intermediária e o grupo C apresentou a menor produção de espécies reativas de oxigênio por granulócitos.

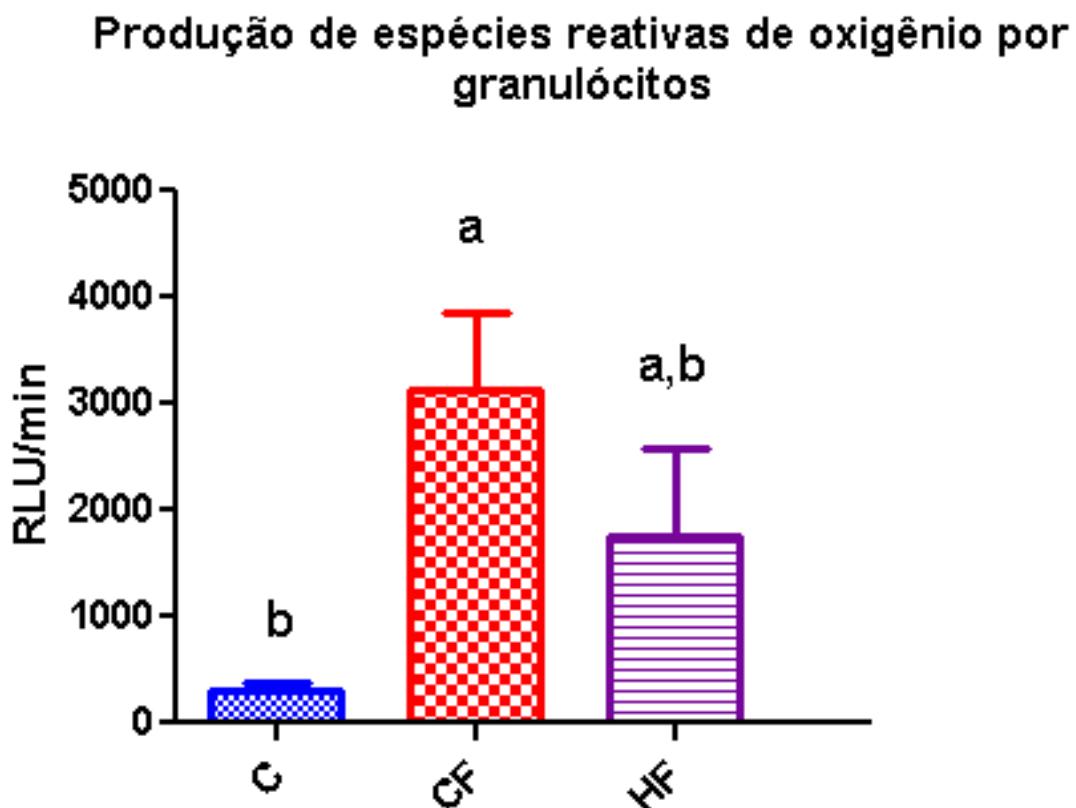


Figura 1: Produção de espécies reativas de oxigênio por granulócitos *in vivo*. Os dados foram analisados por análise de variância univariada, quando as alterações foram significativas o teste de Tukey foi usado para determinar as diferenças específicas entre as médias. A diferença de $p<0,05$ foi considerada significativa. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p<0,05$). C- controle (n=3), CF- controle + ferro (n=4), HF- hiper + ferro (n=3). RLU- Unidade relativa de luz.

6.5- Perfil lipídico

6.5.1- Parâmetros bioquímicos séricos

Os parâmetros analisados para avaliação do perfil lipídico foram: concentração de colesterol total, colesterol HDL, colesterol não-HDL, a atividade da Paraoxonase (PON) e a concentração de triacilgliceróis. A análise destes parâmetros é de extrema importância desde que existem evidências de que o excesso de ferro esteja relacionado com o risco para doenças cardiovasculares.

De acordo com a tabela 8, em relação à concentração sérica de colesterol total, observamos interação entre os tratamentos, sendo que o grupo HF ($5,81 \pm 0,57$ mmol/L) apresentou a maior média, seguido do grupo H ($4,59 \pm 0,32$ mmol/L), seguido dos grupos C ($2,87 \pm 0,37$ mmol/L) e CF ($2,66 \pm 0,38$ mmol/L) que não apresentaram diferença estatística entre si. O mesmo perfil foi observado para a concentração de colesterol HDL, onde o grupo HF ($3,59 \pm 0,37$ mmol/L) apresentou a maior média, seguido do grupo H ($2,35 \pm 0,14$ mmol/L), seguido dos grupos C ($1,46 \pm 0,13$ mmol/L) e CF ($1,61 \pm 0,10$ mmol/L) que também não apresentaram diferença estatística entre si para este parâmetro. A concentração sérica do colesterol não-HDL foi aumentada pela dieta hiper. A dieta hiper diminuiu os níveis séricos de triacilgliceróis. Os animais que receberam dieta hiper (H + HF) apresentaram menor atividade sérica da paraoxonase utilizando o substrato paraoxon (Pon-paraoxon), assim como utilizando o substrato fenilacetato (Pon-fenilacetato), em relação aos animais que receberam dieta padrão (C + CF).

Tabela 8: Concentração sérica de colesterol total, colesterol HDL, colesterol não-HDL, atividade sérica da Paraoxonase utilizando o substrato paraoxon (Pon-paraoxon) e o substrato fenilacetato (Pon-fenilacetato), e concentração sérica de triacilgliceróis de hamsters tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e injeções de ferro dextran (CF), dieta hipercolesterolemante (H) e dieta hipercolesterolemante e injeções de ferro dextran (HF).

Grupos	Colesterol Total (mmol/L)	Colesterol HDL (mmol/L)	Colesterol não-HDL (mmol/L)	Pon-Paraoxon (U/mL)	Pon-fenilacetato (U/mL)	Triacilgliceróis (mmol/L)
C	2,87 ± 0,37 ^c	1,46 ± 0,13 ^c	1,41 ± 0,34	49,21 ± 7,59	18,03 ± 2,99	1,84 ± 0,41
CF	2,66 ± 0,38 ^c	1,61 ± 0,10 ^c	1,05 ± 0,37	48,69 ± 5,37	19,68 ± 2,39	1,94 ± 0,26
H	4,59 ± 0,32 ^b	2,35 ± 0,14 ^b	2,24 ± 0,28#	27,53 ± 3,39#	12,10 ± 1,31#	1,26 ± 0,10#
HF	5,81 ± 0,57 ^a	3,59 ± 0,37 ^a	2,22 ± 0,56#	27,34 ± 2,53#	12,94 ± 1,31#	1,01 ± 0,08#
Valor de p						
Dieta	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Ferro	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Interação	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Os dados foram analisados por análise de variância bivariada, quando a interação foi significativa ($P<0,05$) o teste de Tukey foi utilizado para determinar as diferenças específicas entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey, $p<0,05$. Na coluna, valores estatisticamente diferentes foram marcados com letras sobrescritas diferentes, apenas quando uma interação entre os fatores foi observada ($P < 0.05$). # Efeito da dieta; *Efeito do ferro.

6.5.2- Análise da expressão de RNAm de genes relacionados ao metabolismo de colesterol

Neste trabalho, observamos que os animais que receberam tratamento com dieta rica em lipídios e injeções de ferro dextran (grupo HF) apresentaram níveis de colesterol total e colesterol-HDL superiores aos animais que receberam somente a dieta rica em lipídios (grupo H). Desta forma, percebemos que o ferro além de aumentar o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica, também aumenta os níveis de colesterol total, o que favorece o risco para doenças cardiovasculares.

Os mecanismos pelo qual o ferro poderia estar atuando para potencializar os efeitos da dieta hiper ainda não estão claros, porém partimos da hipótese de que o ferro esteja atuando sobre a expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipídios, dentre eles está o gene do receptor ativador da proliferação peroxissomal alfa (PPAR- α).

6.5.2.1- Especificidade e eficiência dos iniciadores

Primeiramente avaliamos a especificidade dos iniciadores para PPAR- α , LDL-R, SREBP-2, HMGCoA-redutase e CYP-7A1 e β -actina. Para isto, dois procedimentos foram realizados: determinação da curva de dissociação de cada iniciador por qPCR e visualização da banda de amplificação dos genes estudados após realização de amplificação gênica por PCR convencional (figuras 2 e 3). É importante ressaltar que para a realização destes procedimentos foi utilizada a mesma amostra experimental.

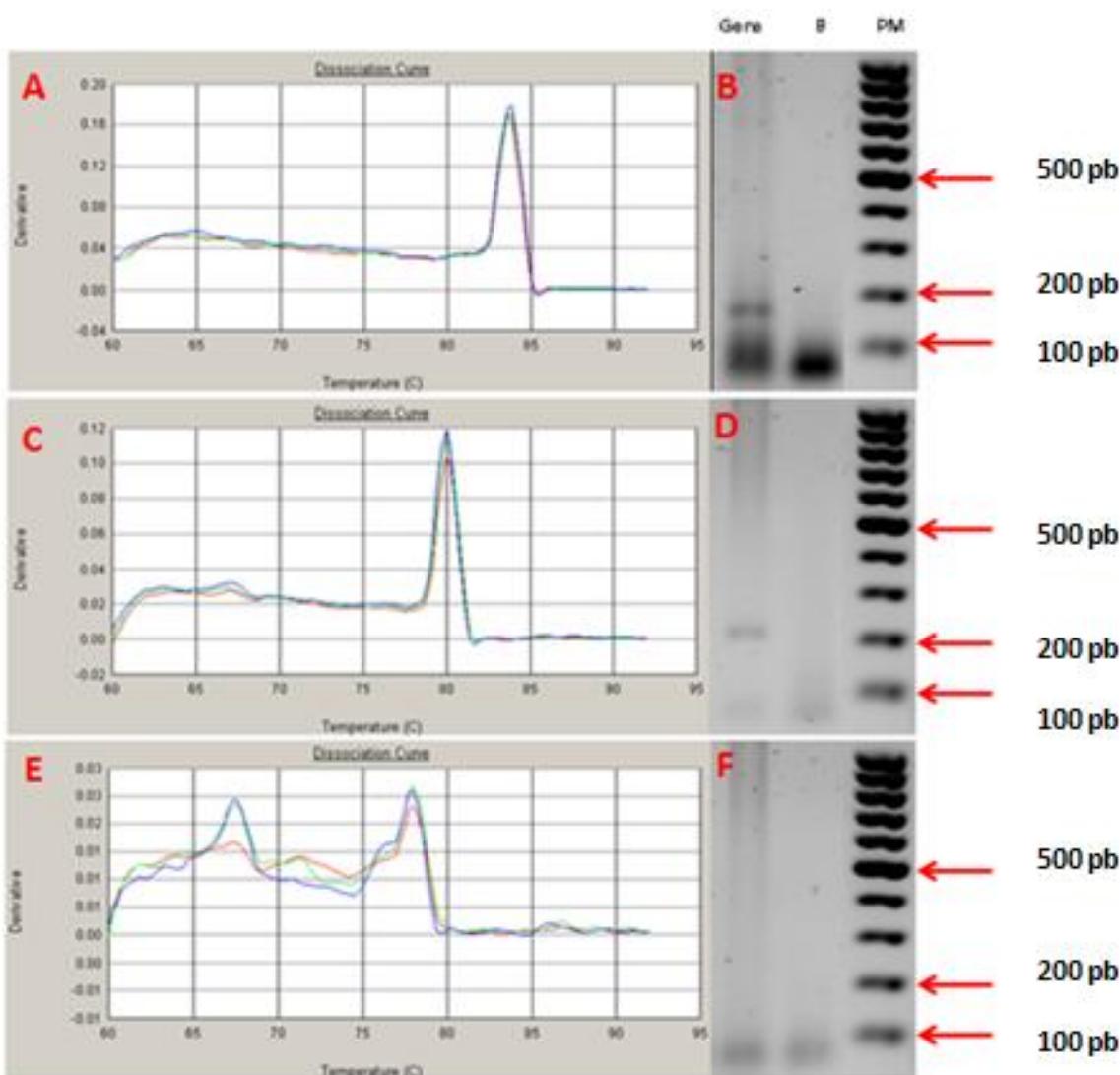


Figura 2: Especificidade dos iniciadores. Curva de dissociação do iniciador e foto reprodução do gel de agarose da PCR convencional dos genes β -actina (A e B), PPAR- α (C e D) e HMGCoA- redutase (E e F). Em todos os casos a quantidade inicial de RNAm foi 100ng. Na foto reprodução, B representa o controle negativo sem cDNA.

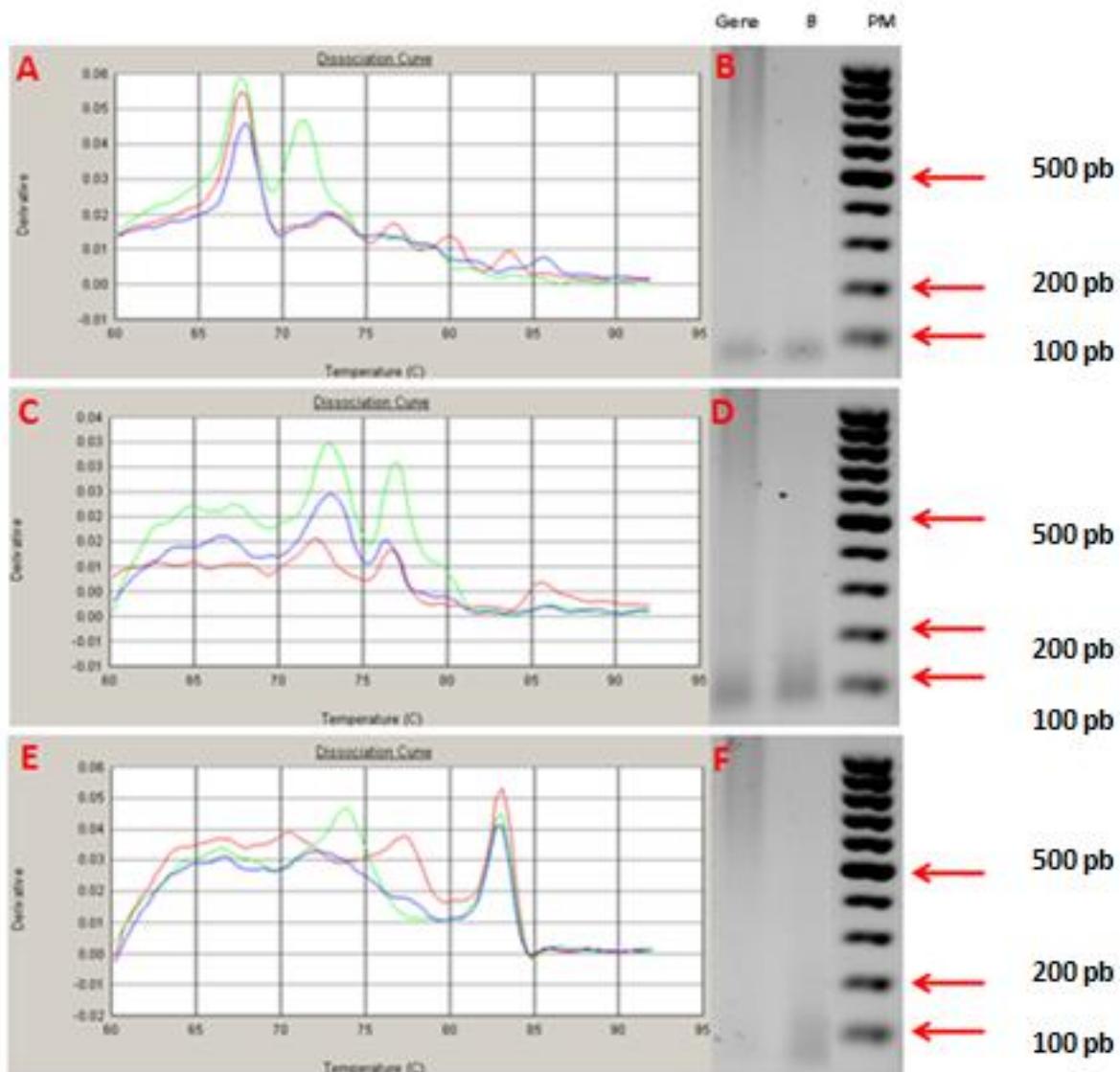


Figura 3: Especificidade dos iniciadores. Curva de dissociação do iniciador e foto reprodução do gel de agarose da PCR convencional dos genes LDLR (A e B), CYP7 (C e D) e SREBP-2 (E e F). Em todos os casos a quantidade inicial de RNAm foi 100ng. Na foto reprodução, B representa o controle negativo sem cDNA.

Analisando a curva de dissociação dos iniciadores para os genes acima relacionados, observamos que somente os iniciadores da β -actina e PPAR- α apresentaram picos em temperatura superior a 80°C. Picos de dissociação a temperaturas iguais ou maiores que 80°C correspondem a produtos de amplificação gênica, enquanto picos abaixo de 80°C correspondem aos dímeros de iniciadores. A presença de picos em diferentes temperaturas também determina inespecificidade. A especificidade para estes iniciadores também foi confirmada pela presença de uma única banda, com peso molecular correspondente aos fragmentos de amplificação (165pb e 215pb β -actina e PPAR- α respectivamente) no gel de agarose.

O iniciador para o gene do SREBP-2 apresentou um pico entre 80 e 85°C, porém em escala de fluorescência 10x inferior à escala apresentada pelos iniciadores para β -actina e PPAR- α . Além disso, este iniciador também apresentou picos a temperaturas inferiores, o que indica formação de dímeros de iniciadores. Ainda não observamos banda de amplificação do produto da PCR convencional utilizando 100ng de RNA inicial. Estes dados em conjunto demonstram que este iniciador não foi específico para a análise do gene em questão.

Tendo em vista que somente os iniciadores da β -actina e PPAR- α funcionaram, o próximo passo foi calcular o R^2 da curva de eficiência para os mesmos (figura 4). Os iniciadores para a β -actina e PPAR- α e apresentaram eficiências de 97,6% e 89,2%, respectivamente. Na literatura não se tem sequências descritas para o genoma do modelo experimental hamster. Desta forma utilizamos referências bibliográficas que analisaram a expressão de RNAm de hamsters utilizando iniciadores específicos para ratos, o que certamente interferiu na eficiência e na especificidade destes.

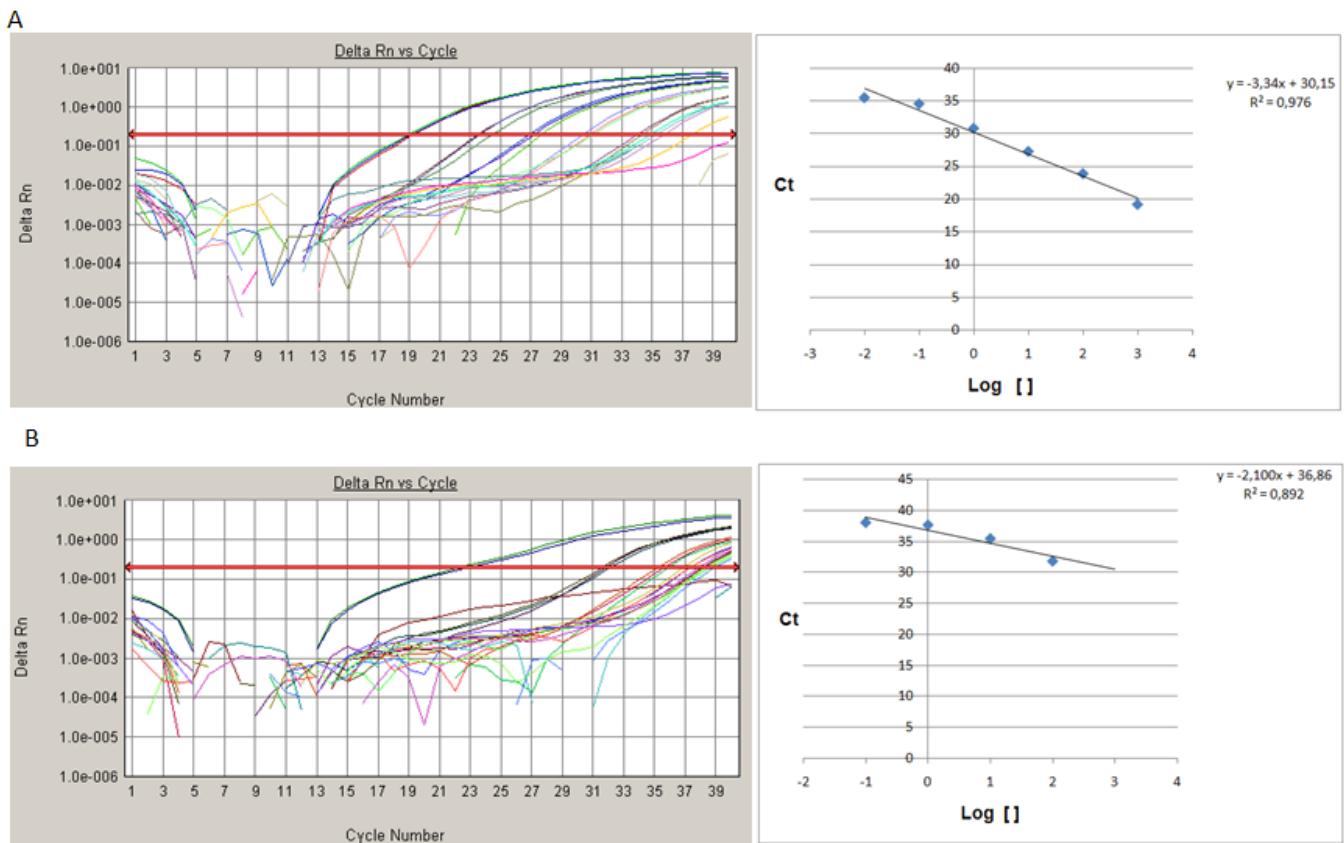


Figura 4: **A-** Curva de amplificação em triplicata para o gene da β -actina utilizando diferentes quantidades de cDNA (1000; 100; 10; 1; 0,1 e 0,01ng) seguida da curva de eficiência para o iniciador deste mesmo gene . **B-** Curva de amplificação em triplicata para o gene do PPAR- α utilizando diferentes quantidades de cDNA (1000; 100; 10; 1; 0,1 e 0,01ng) seguida da curva de eficiência para o iniciador deste mesmo gene.

6.5.2.2- Níveis de expressão relativa PPAR- α / β -actina no fígado

Após a determinação da especificidade e eficiência dos iniciadores avaliamos a expressão relativa do gene PPAR- α no fígado dos animais experimentais. Os níveis de expressão relativa PPAR- α / β -actina (figura 5) foram diminuídos pelo ferro e houve interação entre os tratamentos, sendo que o efeito do ferro foi mais uma vez mais pronunciado quando ambos os tratamentos foram associados. Observamos uma tendência do grupo que recebeu apenas dieta rica em lipídios apresentar níveis de expressão relativa PPAR- α / β -actina aumentados no fígado e uma reversão deste efeito pelo tratamento com ferro.

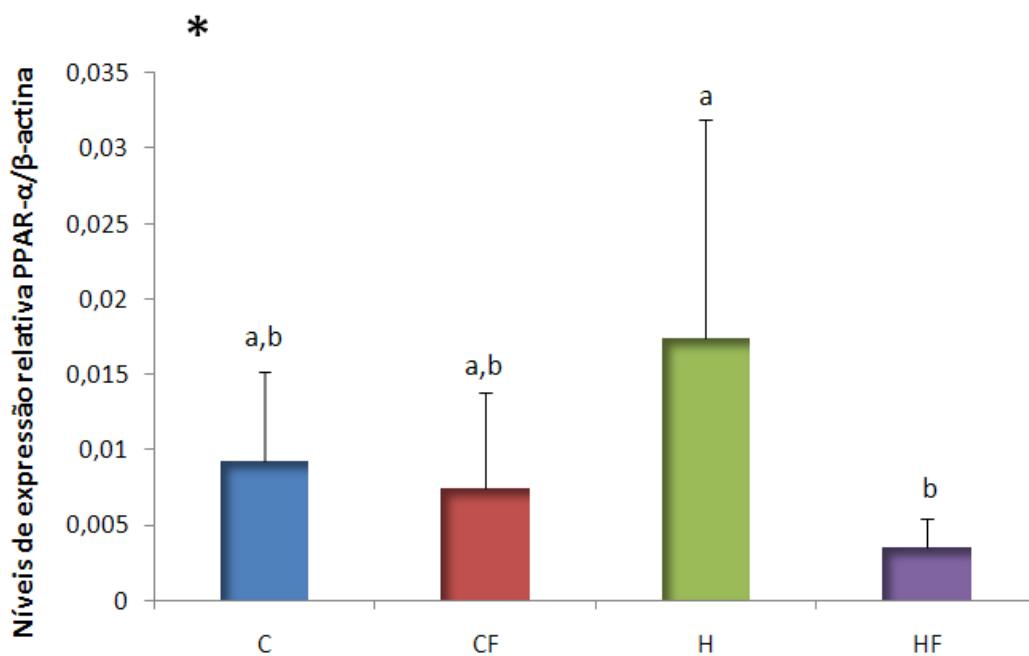


Figura 5: Níveis de expressão relativa PPAR- α / β -actina no fígado. Os dados foram analisados por análise de variância bivariada, quando a interação foi significativa ($P<0,05$) o teste de Tukey foi utilizado para determinar as diferenças específicas entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey, $p<0,05$. Valores estatisticamente diferentes foram marcados com letras diferentes, apenas quando uma interação entre os fatores foi observada ($P < 0,05$). *Efeito do ferro. C (n=5), CF (n=6), H (n=6), HF (n=6).

6.6- Perfil glicêmico

Desde que dados da literatura sugerem que o excesso de ferro tenha influência sobre a homeostase de glicose, a determinação do perfil glicêmico através da análise da porcentagem de hemoglobina glicosilada no sangue total, da glicemia de jejum e do teste de tolerância oral à glicose foi realizada.

De acordo com a tabela 9, observamos interação entre a dieta e o tratamento com ferro, onde o grupo HF ($20,71 \pm 1,22 \mu\text{mol/L}$) apresentou os menores níveis para este parâmetro e não apresentou diferença estatística em relação ao grupo H ($22,17 \pm 1,15 \mu\text{mol/L}$), este por sua vez não apresentou diferença estatística em relação ao grupo C ($22,6 \pm 0,96 \mu\text{mol/L}$). O grupo CF apresentou a maior média ($24,28 \pm 1,83 \mu\text{mol/L}$), porém também não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle. O ferro aumentou a porcentagem de hemoglobina glicosilada no sangue total, porém não houve diferença estatística entre os grupos para a glicemia de jejum posterior à eutanásia dos animais.

Tabela 9: Concentração de hemoglobina e porcentagem de hemoglobina glicosilada no sangue total e concentração sérica de glicose de hamsters tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e injeções de ferro dextran (CF), dieta hipercolesterolemante (H) e dieta hipercolesterolemante e injeções de ferro dextran (HF).

Grupos	Hemoglobina ($\mu\text{mol/L}$)	Hb glicosilada (%)	Glicose (mmol/L)
C	$22,60 \pm 0,96^{\text{a,b}}$	$1,82 \pm 0,12$	$6,68 \pm 1,63$
CF	$24,28 \pm 1,83^{\text{a}}$	$2,21 \pm 0,29^*$	$6,21 \pm 1,33$
H	$22,17 \pm 1,15^{\text{b,c}}$	$1,84 \pm 0,06$	$5,95 \pm 0,86$
HF	$20,71 \pm 1,22^{\text{c}}$	$2,27 \pm 0,35^*$	$6,84 \pm 1,31$
Valor de p			
Dieta	<0,05	>0,05	>0,05
Ferro	>0,05	<0,05	>0,05
Interação	<0,05	>0,05	>0,05

Os dados foram analisados por análise de variância bivariada, quando a interação foi significativa ($P<0,05$) o teste de Tukey foi utilizado para determinar as diferenças específicas entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey, $p<0,05$. Na coluna, valores estatisticamente diferentes foram marcados com letras sobrescritas diferentes, apenas quando uma interação entre os fatores foi observada ($P < 0.05$). # Efeito da dieta; *Efeito do ferro.

De acordo com a tabela 10, em relação à glicemia de jejum anterior ao teste de tolerância oral à glicose não houve diferença estatística entre os grupos. A glicemia após 30 minutos da administração de uma solução de glicose 2,5g/kg foi aumentada pelo tratamento com ferro. A glicemia após 60 minutos da administração desta mesma solução não foi alterada por nenhum dos tratamentos.

Tabela 10: Glicemia de jejum, teste oral de tolerância à glicose após 30 minutos de ingestão de uma solução de glicose 2,5g/Kg (TOTG 30min) e teste oral de tolerância à glicose após 60 minutos (TOTG 60min) de ingestão de uma solução de glicose 2,5g/Kg de hamsteres tratados com dieta padrão (C), dieta padrão e injeções de ferro dextran (CF), dieta hipercolesterolemante (H) e dieta hipercolesterolemante e injeções de ferro dextran (HF).

Grupos	Glicemia de jejum (mmol/L)	TOTG 30min (mmol/L)	TOTG 60min (mmol/L)
C	3,16 ± 0,68	7,50 ± 2,20	5,64 ± 0,95
CF	3,89 ± 0,53	10,89 ± 1,42*	5,06 ± 1,00
H	3,81 ± 1,50	8,84 ± 2,07	5,59 ± 1,75
HF	2,84 ± 0,61	10,05 ± 1,88*	5,47 ± 0,67
Valor de p			
Dieta	>0,05	>0,05	>0,05
Ferro	>0,05	<0,05	>0,05
Interação	>0,05	>0,05	>0,05

Os dados foram analisados por análise de variância bivariada, quando a interação foi significativa ($P<0,05$) o teste de Tukey foi utilizado para determinar as diferenças específicas entre os grupos. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey, $p<0,05$. Na coluna, valores estatisticamente diferentes foram marcados com letras sobreescritas diferentes, apenas quando uma interação entre os fatores foi observada ($P < 0,05$). # Efeito da dieta; *Efeito do ferro.

7- DISCUSSÃO

O ferro é um metal essencial para o metabolismo do organismo. No entanto, estoques aumentados de ferro causam disfunções em diferentes órgãos devido à produção de espécies reativas de oxigênio, agindo desta forma na patogênese de diversas doenças.

A doença gordurosa não-alcólica do fígado (NAFLD) é considerada uma manifestação hepática da síndrome metabólica, intimamente relacionada aos aspectos clínicos da obesidade visceral e é caracterizada pela resistência à insulina, dislipidemia e hipertensão (Marchesini *et al.*, 2003). Com o rápido aumento da prevalência da síndrome metabólica na população em geral, a NAFLD tem se tornado a causa mais comum de doenças hepáticas em países ocidentais (Angulo, 2002).

A NAFLD compreende desde uma simples esteatose hepática até uma esteatohepatite não alcoólica (NASH), fibrose e cirrose. Obesidade, hiperglicemias e diabetes tipo 2 são os fatores de risco mais importantes. NAFLD pode progredir para o carcinoma hepatocelular (HCC) ou à falência hepática, ambos os eventos podem levar a morte precoce (Wei *et al.*, 2008).

Altunkaynak & Ozbek (2009) investigaram os efeitos de uma dieta rica em gordura sobre a morfometria do fígado de ratos. Os autores demonstraram que a dieta rica em gordura causou alterações hepáticas como, por exemplo, hepatomegalia acompanhada por alterações histológicas.

Não somente a ingestão de uma dieta rica em lipídios, mas também o excesso de ferro tem sido correlacionado à patogênese da NASH. O ferro parece ser um importante cofator na patogênese e progressão de alguns casos de NASH. Apesar de este dado não ser universal, muitos estudos correlacionam o excesso de ferro com as formas mais agressivas de NASH. Este fato foi demonstrado por Kirsch *et al.* (2004) e Lieber *et al.* (2004) que avaliaram os efeitos do ferro sobre o metabolismo de lipídios correlacionando-os à NAFLD, através da utilização de modelos de NAFLD, como por exemplo, roedores geneticamente obesos, ou modelos animais alimentados com dieta rica em lipídios.

Os níveis séricos das enzimas ALT e da AST são marcadores muito sensíveis empregados no diagnóstico de doenças hepáticas. Quando a membrana hepatocelular é danificada, estas enzimas predominantemente presentes no citosol (ALT) ou na mitocôndria (AST) são liberadas para a corrente sanguínea. Desta forma podem ser quantificadas para se determinar o tipo e a extensão da lesão (Sallie *et al.*, 1991).

Tan *et al.* (2009) investigaram o papel da via de transdução de sinal da c-jun N-terminal quinase (JNK) na doença gordurosa não-alcólica do fígado (NAFLD) em ratos. Esta

alteração hepática foi causada pela ingestão de uma dieta rica em gordura. Os ratos alimentados com dieta rica em gordura apresentaram a atividade da ALT e da AST extremamente elevadas comparados a animais alimentados com dieta padrão.

Vários outros trabalhos demonstram aumento da atividade sérica da ALT e AST pela dieta rica em lipídios em modelos experimentais (Wu *et al.*, 2008; Fukushima *et al.*, 2009; Amin & Nagy, 2009). Trabalhos avaliando os efeitos da suplementação com ferro em modelos animais também demonstram que este aumenta a atividade sérica da ALT (Tsukamoto *et al.*, 1995; Lou *et al.*, 2009). Nossos dados corroboram com estes trabalhos, uma vez que tanto o tratamento com a dieta hiper quanto com o ferro aumentaram a atividade destas transaminases. Este aumento foi mais pronunciado no grupo HF que recebeu ambos os tratamentos.

Esses dados sugerem que tanto o ferro quanto a dieta rica em gordura provavelmente tenham conduzido a um dano hepático, promovendo hepatomegalia e um aumento na atividade das aminotransferases. O aumento do peso relativo do fígado nos animais tratados com dieta hiper e ferro pode ter ocorrido devido ao acúmulo de gordura, representando um quadro de esteatose hepática, o que corrobora com outros trabalhos da literatura (Story & Baldino, 1981; Rosa *et al.*, 1998 ;Silva *et al.*, 2008).

Existe uma sofisticada regulação do metabolismo do ferro corporal quanto ao seu estoque e transporte, a qual envolve vários fatores, entre eles a hepcidina (Ganz, 2004). Como dito anteriormente, não existe nenhum mecanismo de excreção ativa do ferro. Desta forma, o ferro é facilmente estocado em algumas situações de excesso de ferro como por fatores hereditários, repetidas transfusões sanguíneas ou outras condições patológicas.

Valores séricos elevados de ferritina e/ou de saturação da transferrina são condições clínicas que auxiliam no diagnóstico do excesso de ferro. No entanto, várias condições onde a concentração de ferritina encontra-se elevada na corrente sanguínea não estão relacionadas ao excesso de ferro, porém podem estar relacionadas a desordens severas (como inflamação e neoplasias), alteração da síntese de ferritina, sobrecarga de ferro secundária à aceruloplasminemia (Finch & Huebers, 1982; Halliday & Powell, 1982; Girelli *et al.*, 1995) e à síndrome dismetabólica associada à síndrome de sobrecarga hepática de ferro (Moirand *et al.*, 1997). Todas estas desordens são caracterizadas por níveis baixos ou normais de saturação da transferrina.

Na literatura, estoques aumentados de ferro em modelos experimentais são conseguidos através da suplementação de ferro na dieta ou de injeções de formulações contendo ferro. Para aumentar os estoques de ferro, em hamsteres, utilizamos injeções intraperitoneais de ferro

dextran. Desta forma, tentamos evitar que os mecanismos de regulação da absorção do ferro dificultassem o aumento dos estoques. Não há relatos sobre o metabolismo do ferro dextran em hamsteres. Em camundongos, o ferro ligado a esse polímero de glicose é rapidamente removido da circulação pelas células do sistema retículo endotelial. Existem dois períodos importantes que se seguem à administração do ferro: nas primeiras 6 horas o conteúdo sérico de ferro se encontra elevado, depois de 24 horas da injeção há diminuição do ferro no soro e aumento nas células do sistema retículo endotelial do fígado e baço; o ferro ligado ao dextran é processado pelas células do sistema retículo endotelial antes de ser liberado para o *pool* de transferrina, sendo distribuído aos demais tecidos (Holbein, 1980).

Nossos dados demonstram que o tratamento com injeções de ferro dextran foi eficaz em promover excesso de ferro no fígado e no soro dos animais tratados, já que a média da concentração de ferro sérico dos animais que receberam injeções de ferro dextran foi aproximadamente 30% maior que a média dos animais que não receberam tratamento com ferro. No fígado, a média da quantidade total de ferro dos animais tratados com ferro foi aproximadamente 6,4 vezes maior que a dos animais não tratados.

Knutson *et al.* (2000), trabalhando com ratos alimentados com dieta suplementada com ferro durante 21 dias, observaram nestes um aumento de ferro nos tecidos de 2,8 vezes quando comparados aos animais alimentados com dieta padrão. Kirk *et al.* (2001) verificaram em camundongos deficientes de ApoE e também alimentados com dieta suplementada com ferro carbonílico, um aumento hepático de ferro 13 vezes nesses animais comparados aos seus respectivos controles. Turbino-Ribeiro *et al.* (2003) observaram um aumento hepático de ferro de 2,3 vezes em ratos tratados com injeções de ferro dextran e de 4,2 vezes nos animais tratados com injeções de ferro dextran e dieta rica em colesterol, quando comparados aos seus respectivos controles. A sobrecarga de ferro encontrada no presente trabalho pode ser considerada moderada, quando comparada aos trabalhos citados acima e quando comparada à sobrecarga encontrada em pacientes com hemocromatose sintomática, os quais apresentam níveis de ferro entre 16 e 30 vezes maiores do que pacientes controles (Tavill *et al.*, 1990). A quantidade hepática total de ferro apresentada neste trabalho também está abaixo do limiar crítico (22 vezes aumentada), no qual danos hepatocelulares são observados (Park *et al.*, 1987). Sabendo-se que estoques elevados de ferro estão relacionados à patogênese de diversas doenças, principalmente por promover o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, este trabalho avaliou o efeito do excesso de ferro sobre as defesas antioxidantes e biomarcadores do estresse oxidativo.

Enzimas antioxidantes são freqüentemente utilizadas como biomarcadores do status oxidativo (Gutteridge, 1995). Entre estes biomarcadores está a catalase (CAT). A catalase é encontrada nos peroxissomos do fígado e dos rins e catalisa a conversão de peróxido de hidrogênio, um subproduto tóxico de reações metabólicas, à água e oxigênio livre (Knight, 1997).

Amin & Nagy (2009) investigaram o desenvolvimento da obesidade em ratos em resposta a uma dieta rica em lipídios e demonstraram que esta aumentou o estresse oxidativo hepático. Um dos marcadores analisados foi a atividade hepática da catalase a qual se encontrava diminuída nos animais alimentados com a dieta rica em lipídios em relação aos animais alimentados com dieta padrão.

Amin & Abd El-Twab (2009) investigando os efeitos da atorvastatina e da canela sobre o estresse oxidativo em ratos hipercolesterolêmicos observaram que estes animais apresentavam a atividade da catalase diminuída no fígado.

Cetin *et al.* (2008) objetivando avaliar um possível efeito protetor de um extrato de semente de uva sobre a toxicidade induzida por radiação no fígado de ratos, observaram que a radiação promoveu uma diminuição da atividade da catalase nos homogenatos de fígado. Os autores concluíram então, que a diminuição hepática de defesas antioxidantes é um dos possíveis mecanismos da citotoxicidade induzida pela radiação.

Outro grupo de pesquisadores avaliando o potencial hepatoprotetor de um extrato etanólico de *Fructus Piperis Longi* sobre o fígado de ratos submetidos à radiação observou que o tratamento radioativo diminuiu a atividade da catalase no fígado desses animais (Mansour & El-Kabany, 2009).

Turoczi *et al.* (2003) trabalhando com camundongos *knockout* para o gene HFE e que receberam excesso de ferro através da dieta, observaram um aumento na deposição de ferro no coração destes animais, assim como um aumento de espécies reativas de oxigênio o qual foi evidenciado pelo aumento da formação de produtos de lipoperoxidação e redução da atividade de enzimas antioxidantes como a catalase e a glutationa peroxidase.

Patere *et al.* (2009) demonstraram que a suplementação da dieta com ferro carbonílico aumentou os níveis séricos de ferro e também diminuiu a atividade hepática da catalase em ratos. Nossos dados corroboram com estes trabalhos, já que também encontramos uma diminuição da atividade hepática da catalase tanto pela dieta hiper quanto pelo tratamento com ferro.

Outra enzima antioxidante importante na remoção de espécies reativas de oxigênio é a superóxido dismutase (SOD). A SOD converte superóxidos altamente tóxicos em peróxido de

hidrogênio (Fridovich, 1989). O peróxido de hidrogênio produzido pela SOD é mantido em concentrações seguras pelo sistema da glutationa. Para exercer sua função antioxidant a GSH-PX utiliza a glutationa reduzida (GSH) como cofator e em consequência desta utilização produz a glutationa oxidada (GSSG).

A produção dessas defesas celulares é induzida pela exposição às espécies reativas de oxigênio, através de um mecanismo regulado a nível transcrecional (Kensler *et al.*, 2007).

O Nrf2 é membro de uma família de fatores de transcrição e reconhece elementos de resposta a antioxidantes (ARES) na região promotora de genes alvo (Yu & Kensler, 2005). Normalmente, sobre condições basais Nrf2 está ligado à Keap1 no citoplasma (Tong *et al.*, 2006). Keap1 funciona como uma proteína intermediadora da interação entre Nrf2 e um complexo relacionado à ubiquitina, levando à ubiquitinação do Nrf2 e consequente degradação pelo complexo proteassomal (Cullinan *et al.*, 2004).

A exposição a agentes indutores de estresse leva a uma dissociação do Nrf2 da Keap1. Desta forma impedindo que Nrf2 seja degradado e permitindo a sua translocação para o núcleo. Tais agentes estressores incluem tanto ativadores endógenos como espécies reativas de oxigênio (EROS), espécies reativas de nitrogênio, aldeídos lipídicos e prostaglandinas quanto agentes exógenos como, por exemplo, metais pesados e xenobióticos eletrofílicos e seus metabólitos (Dinkova-Kostova *et al.*, 2005). Experimentos têm demonstrado dois mecanismos distintos responsáveis pela dissociação do Nrf2 da Keap1. Keap1 contém cisteínas reativas que formam ligações proteína-proteína, reações com eletrófilos levam à dissociação da interação Keap1-Nrf2 e liberação do Nrf2 (Wakabayashi *et al.*, 2004). O segundo mecanismo envolve proteínas secundárias e ativação de vias de sinalização de proteína quinase, resultando na fosforilação do Nrf2, e assim aumentando sua estabilidade e/ou liberação da Keap1 (Huang *et al.*, 2002).

Uma vez dentro do núcleo, o Nrf2 se dimeriza com pequenas proteínas Maf o que propicia sua ligação aos AREs presentes na região promotora de genes alvo, acarretando na ativação transcrecional destes genes (Motohashi *et al.*, 2004). A ativação do Nrf2-ARE aumenta a expressão de enzimas da conjugação de eletrófilos incluindo a glutationa-S-transferase, epóxido hidrolase, NADPH-quinona oxidorredutase, UDP-glicuronosiltransferase e aldeído desidrogenase. Esta ativação também aumenta a expressão de enzimas antioxidantas como a glutationa redutase, peroxirredoxina, tiorredoxina, tiorredoxina redutase, catalase, cobre/zinco superóxido dismutase e glutationa peroxidase (Thimmulappa *et al.*, 2002; Kwak *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2006; Leonard *et al.*, 2006).

Brandsch *et al.* (2002), avaliando o efeito da suplementação de ferro na dieta sobre o status antioxidant de ratos alimentados com dieta rica em gordura observaram que a concentração hepática de glutationa foi influenciada tanto pela dieta rica em gordura quanto pelo ferro. Ambos os tratamentos aumentaram a concentração de glutationa total e glutationa oxidada no fígado dos animais.

Vicent *et al.* (2001) observaram aumento do conteúdo de lipídios, da atividade de SOD e dos níveis de tióis não protéicos (glutationa) no coração de animais obesos alimentados com dieta rica em lipídios em relação aos animais controle.

Birkner *et al.* (2005), estudando os efeitos de uma dieta rica em lipídios e com baixa concentração de carboidratos em relação a uma dieta padrão sobre a função hepática de coelhos, observaram que esta promove alterações metabólicas e oxidativas por induzir esteatose hepática. Entre as alterações oxidativas, os autores demonstraram que a dieta rica em lipídios e com baixa concentração de carboidratos aumenta a atividade hepática da GSH-PX e da SOD.

Desta forma podemos sugerir que tanto a dieta hiper quanto o tratamento com ferro aumentaram a produção de EROS com consequente ativação da via Nrf2-ARE para que o organismo contornasse o quadro de estresse aumentando, a atividade sérica da superóxido dismutase e os níveis hepáticos de glutationa total.

Como mencionado anteriormente, o estresse oxidativo é causado pelo desequilíbrio entre espécies reativas e a capacidade de neutralização destas pelas defesas antioxidantes do organismo. Outra maneira de se monitorar o status oxidativo celular é analisar os produtos gerados durante os processos oxidativos. Substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) são biomarcadores indicativos de peroxidação lipídica e o aumento do estresse oxidativo pode levar ao aumento de TBARS (Kunitomo *et al.*, 2009).

Vários trabalhos realizados em modelos animais mostram que o excesso de ferro pode aumentar os níveis de TBARS no fígado (Fischer *et al.*, 2002; Cockell *et al.*, 2005; Domitrović *et al.*, 2006). Nossos dados desta forma corroboram com dados da literatura, desde que observamos aumento nos níveis de TBARS no fígado e nos rins dos animais tratados com ferro.

Proteínas também podem sofrer modificações oxidativas. A formação de radicais livres é uma das principais causas destas modificações, o que acarreta na inativação e rápida degradação das mesmas. Entre as várias modificações oxidativas que podem ocorrer nos resíduos de aminoácidos das proteínas, a formação de grupos carbonila têm sido frequentemente descrita. Cátions como Fe^{+2} ou Cu^{+2} podem se ligar a sítios de ligação de

cátions nas proteínas, favorecendo o ataque por H_2O_2 ou O_2^- . Este ataque pode transformar vários resíduos de aminoácidos presentes nas cadeias laterais das proteínas em carbonilas (Reznick & Packer, 1994). Um aumento na formação destes grupos devido à oxidação protéica catalisada por metal pode ser detectado no fígado de ratos adultos (Starke-Reed & Oliver, 1989).

Dados da literatura demonstram que o excesso de ferro aumenta a concentração de proteína carbonilada em hepatócitos e no fígado de ratos (Ye *et al.*, 2007; Arruda *et al.*, 2009). Por outro lado, Cockell *et al.* (2005), investigando parâmetros de estresse oxidativo em ratos alimentados com três tipos de dieta (deficiente em cobre, suplementada com ferro ou ambas as situações) não observaram efeito do excesso de ferro sobre os níveis hepáticos de proteína carbonilada.

Carmiel-Haggai *et al.* (2005) observaram que ratos obesos alimentados com dieta rica em lipídios apresentaram níveis elevados de proteína carbonilada no fígado comparados a animais obesos alimentados com dieta padrão. No presente estudo verificamos aumento dos níveis hepáticos de proteína carbonilada somente pelo tratamento com a dieta rica em lipídios, o que corrobora com dados da literatura.

A maioria das propriedades biológicas e funções envolvendo estrutura de proteínas, catálise enzimática e vias de sinalização de oxirredução dependem das propriedades de grupos tióis presentes tanto em proteínas quanto em moléculas de baixo peso molecular (Bindoli *et al.*, 2008). Foi demonstrado que os níveis de grupos tióis também podem ser considerados biomarcadores do estresse oxidativo (Kadota *et al.*, 1991; Quinlan *et al.*, 1994), uma vez que esses grupos contribuem significativamente para a capacidade antioxidante do plasma. São representados principalmente pela albumina (principal fonte de grupos tióis ligados à proteína) e por tióis de baixo peso molecular como a glutationa reduzida (GSH) e a cisteína (CSH) que quando oxidados formam a glutationa oxidada (GSSG) e a cistina (CSSC), respectivamente (Koehler, 2003).

A albumina é a proteína mais abundante do compartimento intravascular. Ela possui um grupamento tiol, e devido à sua abundância, os grupos tióis presentes nas moléculas de albumina representam aproximadamente 80% dos grupos tióis no plasma. A albumina ainda apresenta ação antioxidante, atribuída principalmente por seus grupos tióis e por sua habilidade de reagir com espécies oxidantes. Em adição, outra propriedade antioxidante da albumina inclui o seqüestro de moléculas pró-oxidantes e metais assim como a ligação a antioxidantes potenciais como a bilirrubina (Turell *et al.*, 2009).

O status redox de tióis celulares é controlado por dois sistemas principais, o sistema da tiorredoxina e da glutationa. A glutationa representa o grupo tiol não protéico predominante nas células, onde esta age como substrato enzimático e como agente protetor contra compostos xenobióticos e oxidantes e quando mantida em seu estado reduzido pela glutationa redutase é capaz de transferir seus equivalentes redutores a varias enzimas, como a glutationa peroxidase (GSH-PX), glutationa transferases (GSTs) e glutarredoxinas (Dickinson & Forman, 2002).

Alturfan *et al.* (2009) estudando os efeitos do consumo de pistache (*Pistacia vera L.*) sobre lipídios sanguíneos, atividade antioxidante e estresse oxidativo em ratos alimentados com dieta rica em colesterol demonstraram que a dieta rica em lipídios diminuiu significativamente a concentração sérica de grupos tióis totais no grupo hipercolesterolemico comparado ao grupo controle.

Nesse trabalho observamos que houve interação entre o tratamento com ferro e a dieta hiper, resultando em menor concentração de grupos sulfidrilas no gupo H. Esse efeito não foi observado no grupo HF. Desta forma, pode-se sugerir que a redução nos grupos sulfidrilas ocasionado pela dieta hiper foi revertida pelo tratamento com ferro.

Cada vez mais se torna evidente que a aterosclerose é também uma doença inflamatória, que envolve hiperlipemia, oxidação de LDL, aumento do estresse oxidativo e recrutamento e infiltração de leucócitos (Ross, 1999; Libby, 2002). Uma forte correlação entre altos níveis de LDL, ativação de neutrófilos e leucócitos foi reportado por Chan *et al.* (1998) em pacientes com aterosclerose.

A formação de espécies reativas de oxigênio também pode ocorrer nestas células fagocíticas como, por exemplo, neutrófilos e macrófagos. Estas células promovem a defesa do hospedeiro contra microrganismos invasores e são dotadas da NADPH oxidase responsável pela “explosão respiratória”, um processo que envolve consumo de oxigênio e formação EROS (Cross & Segal, 2004). Quando este sistema não se encontra balanceado ou quando há um aumento da expressão de NADPH oxidases, condições pró-inflamatórias ou citotóxicas relacionadas com doenças agudas e crônicas podem ser favorecidas (van der Vliet, 2008).

Ward *et al.* (2003) investigaram os efeitos de uma única dose intramuscular de ferro a ratas grávidas sobre o crescimento fetal e sobre a função imunológica das ratas. As ratas apresentaram estoques hepáticos de ferro significativamente elevados. A suplementação com ferro aumentou significativamente a atividade da NADPH oxidase nos macrófagos alveolares maternos.

Este mesmo grupo de pesquisadores em 2009 avaliou os efeitos de alterações no status de ferro em macrófagos de ratas deficientes de ferro e ratas grávidas suplementadas ou não com uma dose única de ferro dextran sobre a função imune e expressão de RNAm de genes envolvidos no influxo e efluxo de ferro. Os autores observaram que a suplementação com ferro, sozinha ou combinada com a gestação, aumentou a atividade da NAPH oxidase por macrófagos.

Como a NADPH oxidase é uma das principais enzimas na produção de espécies reativas de oxigênio em células fagocíticas, e como o tratamento com ferro aumentou a produção de espécies reativas por granulócitos podemos sugerir que este aumento esteja relacionado a um aumento na atividade desta enzima.

Todos estes parâmetros avaliados em conjunto mostram que tanto o tratamento com ferro quanto a dieta hiper alteraram o status oxidativo celular, promovendo o aumento do estresse oxidativo, devido à formação de espécies reativas de oxigênio e/ou reduzindo as defesas antioxidantes.

O mecanismo sugerido para a participação do ferro na progressão da lesão aterosclerótica envolve basicamente sua capacidade em gerar radicais livres e promover o dano oxidativo às lipoproteínas de baixa densidade (LDL). As partículas de LDL nativas podem atravessar as paredes arteriais sem causar dano, mas quando estas são oxidadas, são reconhecidas como substâncias estranhas por receptores *scavenger* de macrófagos teciduais. O acúmulo de lipídios oxidados em macrófagos leva à formação de células espumosas. Partículas de LDL oxidadas também induzem dano celular endotelial, promovem a migração de monócitos para a parede dos vasos e previnem a saída de macrófagos da íntima dos vasos (de Valk & Marx, 1999). Desta forma, níveis aumentados de colesterol total e suas frações, principalmente das frações LDL no soro, bem como aumento do estresse oxidativo são fatores de risco para o surgimento de doenças cardiovasculares.

Como esperado, a dieta rica em lipídios aumentou os níveis de colesterol total e suas frações. Por outro lado diminuiu a concentração sérica de triacilgliceróis. A dieta hipercolesterolemante possui uma maior porcentagem de ácidos graxos insaturados (óleo de soja) do que a dieta padrão, e esta diferença pode ter sido responsável pelo resultado obtido. Uma vez que ácidos graxos insaturados possuem efeito sobre o metabolismo de VLDL, a ingestão destes promove uma redução na síntese e excreção hepática desta lipoproteína provocando assim, uma diminuição nos níveis séricos de triacilgliceróis (Connor *et al.*, 1993). Redução nos níveis séricos de triacilgliceróis em ratos alimentados com uma dieta

hipercolesterolemiantre rica em óleo de soja também foi encontrada por Turbino-Ribeiro *et al.* (2003) e por Oliveira de Souza *et al.* (2009).

Além do aumento do colesterol total e suas frações, a dieta hiper ainda diminuiu a atividade arilesterásica e paraoxonásica da paraoxonase (enzima antioxidante presente nas partículas de HDL). A redução na atividade da PON está inversamente relacionada ao desenvolvimento da aterosclerose. Não somente a LDL está susceptível à modificação oxidativa, mas também outros lipídios no soro, como por exemplo, aqueles presentes na HDL.

A modificação oxidativa da HDL tem sido associada com o prejuízo da habilidade desta lipoproteína promover o transporte reverso do colesterol (Morel, 1994). A PON possui a função de prevenir a oxidação da LDL, da HDL, bem como hidrolisar fosfolipídios oxidados e hidroperóxidos presentes na LDL modificada (Aviram *et al.*, 1998b). Além de efeitos antioxidantes, a PON exerce propriedades antiinflamatórias, uma vez que reduz a adesão de monócitos nas células endoteliais e reduz a quimiotaxia de macrófagos exercida por fosfolipídios oxidados (Ahmed *et al.*, 2003).

A paraoxonase é uma esterase dependente de cálcio, sua família consiste de três proteínas: PON1, PON2 e PON3 (Chait *et al.*, 2005). O RNAm da PON1 é expresso principalmente no fígado, o da PON3 é expresso no fígado e rim, enquanto que PON2 é amplamente expresso em muitos tecidos, incluindo células da parede arterial, como macrófagos. A PON1 e PON3 são secretadas pelo fígado associadas a HDL, contribuindo assim para o efeito ateroprotetor desta lipoproteína (Ng *et al.*, 2004). Todas as três proteínas possuem atividade hidrolítica tendo atividade arilesterásica ou paraoxonásica, dependendo dos substratos a serem hidrolisados, ácidos carboxílicos aromáticos ou compostos organofosfatos, respectivamente (Getz & Reardon, 2004).

A PON1 possui três resíduos de cisteína, dois formam pontes dissulfeto intramolecular e um resíduo é livre, o qual é essencial para a ação da PON1 em proteger as lipoproteínas plasmáticas da oxidação por espécies reativas. Entretanto, a oxidação deste resíduo de cisteína livre pelo peróxido de hidrogênio ou pela própria LDL modificada, leva a inativação desta enzima (Aviram *et al.*, 1998a). Ratos alimentados com uma dieta rica em colesterol apresentam uma redução significativa na síntese hepática da PON 1 (Durak *et al.*, 2004).

Thomàs-Moyà *et al.* (2007) objetivando investigar a resposta da atividade de PON1 à dieta rica em lipídios em ratos machos e fêmeas, observaram que a dieta rica em lipídios diminuiu a atividade da paraoxonase nos animais de ambos os sexos, devido a uma redução nos níveis de RNAm de PON1 nos machos e a uma redução da estabilidade e/ou no número

de partículas HDL responsivas ao transporte de PON1 nas fêmeas. Nossos dados corroboram com os trabalhos citados acima.

Vários estudos têm demonstrado que nas lesões ateroscleróticas, em modelos animais e em humanos, a expressão de ferritina está induzida, assim como a presença de acúmulo de ferro (Yuan *et al.*, 1996; Pang *et al.*, 1996). Outros estudos observaram que o tratamento com quelantes de ferro melhoram a função endotelial vascular (Nitenberg *et al.*, 1998; Duffy *et al.*, 2001) e que tanto a restrição da ingestão de ferro quanto o tratamento com quelantes de ferro reduzem a formação da placa ateromatosa em modelos animais (Matthews *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1999). Estes achados sugerem que alterações na homeostase do ferro podem ter um papel importante nos processos aterogênicos e na desregulação da reatividade vascular. Os mecanismos propostos para os efeitos mediados pelo ferro sobre o dano vascular incluem a ativação da placa (Praticó *et al.*, 1999), promoção da proliferação celular vascular (Porreca *et al.*, 1994) e a formação de radicais livres catalisada pelo ferro via reação de Fenton e subsequente lipoperoxidação (Pieper & Siebeneich, 1997).

Day *et al.* (2003) examinaram os efeitos da administração crônica de ferro dextran em camundongos sobre o processo trombótico, estresse oxidativo sistêmico e vascular e sobre a reatividade vascular do endotélio. Eles observaram que a formação de trombos foi acelerada em camundongos que receberam tratamento com excesso de ferro e ainda observaram aumento sistêmico e vascular da produção de espécies reativas de oxigênio. Ao mesmo tempo a administração aguda de DL-cisteína (um potente neutralizador de espécies reativas de oxigênio) foi capaz de reverter os efeitos do excesso de ferro sobre a formação de trombos, sugerindo que a aceleração da trombogênese pelo ferro ocorre através de um mecanismo pró-oxidante.

Kostellow & Morrill (2004) demonstraram que o tratamento com ferro *in vitro* aumenta a peroxidação lipídica em células da aorta de ratos e humanos. Esses trabalhos em conjunto indicam que o excesso de ferro represente um possível fator de risco para doenças cardiovasculares.

Como citado anteriormente, existem consideráveis evidências de que PPAR- α apresente ações anti-ateroscleróticas e antiinflamatórias devido ao aumento da expressão de ApoAI e ABCA1 e à diminuição de endotelina 1, do fator tissular e da molécula de adesão da célula vascular 1 (VCAM-1) (Marx *et al.*, 1999). Em particular, VCAM-1 tem um papel crítico no desenvolvimento da aterosclerose por permitir a adesão de monócitos ao endotélio e iniciar os processos de desenvolvimento da placa aterosclerótica.

Toyama *et al.* (2004) demonstraram que ligantes de PPAR- α ativam enzimas antioxidantes e suprimem a fibrose hepática em ratos. Esses ligantes ainda apresentam efeitos anti-dislipidêmicos em modelo de dislipidemia diabética em hamsteres (Rizvi *et al.*, 2003).

Vários trabalhos relacionam o aumento do estresse oxidativo com a diminuição da expressão de RNAm de PPAR- α . Marcil *et al.* (2006) promoveram o aumento do estresse oxidativo através do tratamento de macrófagos com ascorbato férrico por um período de vinte e quatro horas, e observaram que estes apresentaram níveis de expressão de RNAm de PPAR- α diminuídos em relação à macrófagos não tratados.

Os resultados deste trabalho corroboram com este estudo, uma vez que também observamos uma diminuição dos níveis de expressão de RNAm de PPAR- α no fígado dos animais tratados com ferro. Esta diminuição foi mais pronunciada no grupo que recebeu ambos os tratamentos. O ferro neste caso, indiretamente através do aumento do estresse oxidativo interferiu na expressão de RNAm deste gene. Estes dados reforçam que a associação entre excesso de ferro e dieta rica em lipídios pode ser danosa ao organismo, aumentando o risco para doenças cardiovasculares.

Ultimamente, muitos trabalhos têm demonstrado que o ferro influencia o metabolismo de glicose mesmo na ausência de significativo excesso de ferro. Na população em geral, estoques corporais de ferro se correlacionam positivamente com o desenvolvimento de intolerância à glicose, diabetes tipo 2 (Salonen *et al.*, 1998; Ford & Cogswell, 1999; Barbieri *et al.*, 2001) e diabetes gestacional (Lao & Tam, 1997; Lao *et al.*, 2001).

A glicemia de jejum, o teste oral de tolerância à glicose e a porcentagem de hemoglobina glicosilada são parâmetros utilizados para diagnosticar alterações glicêmicas e o diabetes propriamente dito.

Nossos resultados mostram uma redução nos níveis sanguíneos de hemoglobina pela dieta hiper, porém o ferro não alterou a concentração de hemoglobina, o que também foi verificado por Dabbagh *et al.* (1997) e Kirk *et al.* (2001). Eritrócitos são altamente suscetíveis a condições de estresse oxidativo e este é um fator que pode estar levando à diminuição da concentração de hemoglobina, principalmente porque esta diminuição foi mais pronunciada no grupo que recebeu ambos os tratamentos. A oxidação da membrana dos eritrócitos afeta suas propriedades intrínsecas pela alteração da fluidez, transporte de íons e perda da atividade de enzimas celulares (Chiu *et al.*, 1989). A alta concentração de produtos de lipoperoxidação foi demonstrada em eritrócitos de pacientes que sofreram acidente vascular cerebral (Poli *et al.*, 1989), esse produtos acumulam-se nos eritrócitos (Ando *et al.*,

1995) e podem causar modificações em proteínas (Uchida *et al.*, 1997) e lise nas células vermelhas (Benedetti *et al.*, 1980).

O tratamento com ferro não alterou os níveis sanguíneos de hemoglobina, porém aumentou a porcentagem de hemoglobina glicosilada. *HbA1c*, também conhecida como *hemoglobina glicosilada*, reflete o controle da glicose no sangue de um paciente nos últimos 2-3 meses. É formada quando a glicose sanguínea se liga irreversivelmente à hemoglobina formando um complexo estável de hemoglobina glicosilada. Como o tempo de meia vida normal das células vermelhas no sangue é de 90 - 120 dias, a HbA1c somente será eliminada quando as células vermelhas forem substituídas.

Os valores da hemoglobina glicosilada são diretamente proporcionais à concentração de glicose no sangue durante a vida das células vermelhas no sangue. Estes valores não estão sujeitos às flutuações observadas no monitoramento diário da glicose sanguínea. Como mencionado anteriormente, a porcentagem de glicosilação da hemoglobina é um índice da concentração de glicose no sangue nos últimos 2 - 3 meses, porém é mais influenciada pelos níveis mais recentes de glicose, de forma que os últimos 30 dias apresentam um peso de 50% da HbA1c, os 60 dias precedentes um peso de 25% do valor e os 90 dias precedentes 25% do valor. Desta forma, o aumento da porcentagem de hemoglobina glicosilada pelo tratamento com ferro, sugere que este tenha promovido um aumento da glicemia anterior à eutanásia dos animais.

Doações de sangue frequentes que levam a uma diminuição dos estoques de ferro, reduzem a hiperinsulinemia pós-prandial em voluntários saudáveis (Facchini, 1998), aumentam a sensibilidade à insulina (Hua *et al.*, 2001) e constituem um fator de proteção para o desenvolvimento do diabetes tipo 2 (Ascherio *et al.*, 2001). Um impacto significante do excesso de ferro sobre os efeitos sistêmicos do diabetes tem sido demonstrado em estudos recentes, nos quais o ferro parece influenciar o desenvolvimento de nefropatia diabética e disfunção vascular. Neste sentido, a administração intravenosa de desferroxamina resulta no aumento da resposta arterial coronária ao estresse testada em pacientes com diabetes tipo 2 (Nitenberg *et al.*, 2002) e na melhora das disfunções endoteliais em pacientes com doença cardíaca coronária (Duffy *et al.*, 2001).

O exato mecanismo pelo qual o ferro estaria induzindo o diabetes ainda não está estabelecido, porém três possíveis mecanismos têm sido discutidos: deficiência de insulina, resistência à insulina e/ou disfunção hepática. O entendimento do mecanismo patogênico do diabetes induzido por ferro é conseguido principalmente a partir de estudos com modelos animais de hemocromatose. Nesses modelos animais, o excesso de ferro promove o aumento

do estresse oxidativo das células β -pancreáticas e diminui a capacidade secretória de insulina, secundária a apoptose, e dessensibilização da secreção de insulina induzida por glicose, porém esta anormalidade sozinha, não é suficiente para causar o diabetes (Cooksey *et al.*, 2004).

As ilhotas pancreáticas têm uma extrema susceptibilidade ao dano provocado por estresse oxidativo, talvez por causa da quase exclusiva dependência do metabolismo mitocondrial de glicose para a secreção de insulina dependente de glicose e da baixa expressão do sistema de defesa antioxidante (Tiedge *et al.*, 1997). Uma alta expressão do transportador de metal divalente também predispõe para que haja maior acúmulo de ferro do que as outras células (Andrews, 1999), potencializando o aumento do estresse oxidativo catalisado pelo ferro.

Em estudos com pacientes talassêmicos, a resistência à insulina significativamente aumenta (Merkel *et al.*, 1988; Cario *et al.*, 2003). Em estudos com humanos, Mc Clain *et al.* (2006) demonstraram uma alta prevalência de anormalidades na homeostase em indivíduos com hemocromatose e examinaram os possíveis mecanismos para esta alta prevalência. Usando testes de tolerância à glicose, eles demonstraram que a secreção de insulina estava alterada e que existia uma resistência à insulina. Os autores sugeriram que os mecanismos para a resistência à insulina incluem a possibilidade do excesso de ferro causar a resistência diretamente ou através de disfunção hepática (Dandona *et al.*, 1983).

Sun *et al.* (2008) investigaram na população de meia idade e idosa de áreas urbanas e rurais do norte e sul da China associação entre elevada concentração de ferritina e o risco para síndrome metabólica e diabetes tipo 2. Os autores observaram que elevadas concentrações de ferritina se correlacionavam positivamente com o risco para estas desordens metabólicas na população estudada, independentemente de fatores como obesidade, adipocinas, inflamação e outros fatores de risco. Desta forma eles verificaram que o excesso de ferro tem um papel crucial para o desenvolvimento de doenças metabólicas, mesmo em um país com a prevalência de deficiência de ferro relativamente alta.

Na literatura existem extensos trabalhos epidemiológicos que demonstram associação entre níveis elevados de ferritina e diabetes tipo 2 (Acton *et al.*, 2006; Wrede *et al.*, 2006; Jehn *et al.*, 2007).

Nossos dados mostram que o excesso de ferro promoveu uma alteração na homeostase da glicose, através da elevação na porcentagem de hemoglobina glicosilada nos animais tratados com ferro em relação aos animais não tratados e pela elevação da glicemia trinta

minutos após a ingestão de uma solução de glicose, o que sugere que o excesso de ferro possa estar envolvido na patogênese do diabetes tipo 2 assim como na síndrome metabólica.

Todos estes dados em conjunto indicam que o ferro está mais relacionado à fisiopatologia humana do que se pode imaginar. De fato, o metabolismo de ferro está intimamente associado às manifestações clínicas de numerosas doenças sistêmicas (Guillén *et al.*, 1998). Com isso, o excesso de ferro tecidual pode contribuir para a produção e amplificação da lesão causada por radicais livres, assim como para modular vários passos envolvidos na lesão inflamatória.

8- CONCLUSÕES

- ✓ A dieta hipercolesterolemante promoveu um aumento dos níveis séricos de colesterol total e de suas frações, além de uma redução da atividade da PON, enzima antioxidante presente nas partículas de HDL importante na prevenção da lipoperoxidação. Indicando um possível potencial aterogênico desta dieta.
- ✓ Observamos aumento da quantidade hepática de glutationa total e da atividade sérica da superóxido dismutase bem como redução da atividade hepática da catalase nos grupos CF, H e HF, sendo o efeito mais pronunciado no grupo HF. O tratamento com ferro ainda aumentou a quantidade de TBARS no fígado e nos rins e a produção de radicais livres por granulócitos. Em conjunto estes dados indicam que o excesso de ferro alterou o *status* oxidativo possivelmente devido a um aumento na produção de EROS.
- ✓ O ferro potencializou o efeito hipercolesterolêmico da dieta. A análise de expressão gênica por qPCR de PPAR- α , receptor nuclear importante no controle da homeostase de lipídios e carboidratos, mostrou que o grupo HF apresentou expressão relativa menor que o grupo H.
- ✓ A homeostase de glicose também foi alterada: os animais que receberam tratamento com ferro apresentaram porcentagem de hemoglobina glicosilada superior aos animais não tratados, bem como alterações na tolerância à glicose.
- ✓ Concluímos que o excesso de ferro aumenta o estresse oxidativo e interfere na homeostase de colesterol e glicose. Estes efeitos podem ser atribuídos, em parte, à diminuição na expressão do RNAm de PPAR- α .

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acton, R. T.; Barton, J. C.; Passmore, L. V.; Adams, P. C.; Speechley, M. R.; Dawkins, F. W.; Sholinsky, P.; Reboussin, D. M.; McLaren, G. D.; Harris, E. L.; Bent, T. C.; Vogt, T. M.; Castro, O. (2006). Relationships of serum ferritin, transferrin saturation, and HFE mutations and self-reported diabetes in the Hemochromatosis and Iron Overload Screening (HEIRS) study. *Diabetes Care.* 29(9):2084-2089.
- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105: 121-6.
- Ahmed, Z.; Babaei, S.; Maguire, G. F.; et al. (2003). Paraoxonase-1 reduces monocyte chemotaxis and adhesion to endothelial cells due to oxidation of palmitoyl, linoleoyl glycerophosphorylcholine. *Cardiovasc Res.* 57: 225–231.
- Aisen, P.; Enns, C.; Wessling-Resnick, M. (2001). Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol.* 33(10):940-959.
- Altunkaynak, B. Z. & Ozbek, E. (2009). Overweight and structural alterations of the liver in female rats fed a high-fat diet: a stereological and histological study. *Turk J Gastroenterol.* 20(2):93-103.
- Alturfan, A. A.; Emekli-Alturfan, E.; Uslu, E. (2009). Consumption of pistachio nuts beneficially affected blood lipids and total antioxidant activity in rats fed a high-cholesterol diet. *Folia Biol (Praha).* 55(4):132-136.
- Amin, K. A. & Abd El-Twab, T. M. (2009). Oxidative markers, nitric oxide and homocysteine alteration in hypercholesterolemia rats: role of atorvastatin and cinnamon. *Int J Clin Exp Med.* 2(3):254-265.
- Amin, K. A. & Nagy, M. A. (2009). Effect of Carnitine and herbal mixture extract on obesity induced by high fat diet in rats. *Diabetol Metab Syndr.* 1(1):17.
- Ando, K.; Beppu, M.; Kikugawa, K. (1995). Evidence for accumulation of lipid hydroperoxides during the aging of human red blood cells in the circulation. *Biol Pharm Bull.* 18(5):659-663.
- Andrews, N. C. (1999). The iron transporter DMT1. *Int J Biochem Cell Biol.* 31(10):991-994.
- Andrews, N. C. (2000). Iron metabolism: iron deficiency and iron overload. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 1:75-98.
- Angelini, L.; Nardocci, N.; Rumi, V.; Zorzi, C.; Strada, L.; Savoiardo, M. (1992). Hallervorden-Spatz disease: clinical and MRI study of 11 cases diagnosed in life. *J Neurol.* 239(8):417-425.
- Angulo, P. (2002). Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med.* 346(16):1221-1231.
- Arruda, S. F.; Siqueira, E. M.; de Valêncio, F. F. (2009). Vitamin A deficiency increases hepcidin expression and oxidative stress in rat. *Nutrition.* 25(4):472-478.

Ascherio, A.; Rimm, E. B.; Giovannucci, E.; Willett, W. C.; Stampfer, M. J. (2001). Blood donations and risk of coronary heart disease in men. *Circulation*. 103(1):52-57.
Association of Official Analytical Chemists (1980). Official Methods of Analysis. AOAC, Washington, DC.

Auger, C.; Teissedre, P. L.; Gérain, P.; Lequeux, N.; Bornet, A.; Serisier, S.; Besançon, P.; Caporiccio, B.; Cristol, J. P.; Rouanet, J. M. (2005). Dietary wine phenolics catechin, quercetin, and resveratrol efficiently protect hypercholesterolemic hamsters against aortic fatty streak accumulation. *J Agric Food Chem*. 53(6):2015-2021.

Aviram, M.; Billecke, S.; Sorenson, R.; Bisgaier, C. L.; Newton, R S.; Rosenblat, M.; Erogul, J.; Dunlop, C.; La Du, B. (1998a). Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulphydryl group and is different than that required for its arylesterase/paraoxonase activities: Selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 18: 1617–1624.

Aviram, M.; Rosenblat, M.; Bisgaier, C.; et al. (1998b). Paraoxonase inhibits high density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest*. 101: 1581–1590.

Babior, B.M., 1994. Activation of the respiratory burst oxidase. *Environmental Health Perspectives*. 102(10):S53-56.

Barbieri, M.; Ragno, E.; Benvenuti, E.; Zito, G. A.; Corsi, A.; Ferrucci, L.; Paolisso, G. (2001). New aspects of the insulin resistance syndrome: impact on haematological parameters. *Diabetologia*. 44(10):1232-1237.

Beltowski, J.; Wojcicka, G.; Jamroz, A. (2002). Differential effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on plasma paraoxonase 1 activity in the rat. *Pol J Pharmacol*. 54: 661-671.

Benedetti, A.; Comporti, M.; Esterbauer, H. (1980). Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochim Biophys Acta*. 620(2):281-296.

Bicalho, H. M.; Gontijo, C. M.; Nogueira-Machado, J. A. (1981). A simple technique for simultaneous human leukocytes separation. *J Immunol Methods*. 40(1):115-116.

Bindoli, A.; Fukuto, J. M.; Forman, H. J. (2008). Thiol chemistry in peroxidase catalysis and redox signaling. *Antioxid Redox Signal*. 10(9):1549-1564.

Birkner, E.; Kasperekzyk, S.; Kasperekzyk, A.; Zalejska-Fiolka, J.; Zwirska-Korczala, K.; Stawiarska-Pieta, B.; Grucka-Mamczar, E. (2005). Metabolic and antioxidative changes in liver steatosis induced by high-fat, low-carbohydrate diet in rabbits. *J Physiol Pharmacol*. 56 6:S45-58.

Bonefeld, B. E.; Elfving, B.; Wegener, G. (2008). Reference genes for normalization: a study of rat brain tissue. *Synapse*. 62(4):302-9.

Brandsch, C.; Ringseis, R.; Eder, K. (2002). High dietary iron concentrations enhance the formation of cholesterol oxidation products in the liver of adult rats fed salmon oil with minimal effects on antioxidant status. *J Nutr.* 132(8):2263-2269.

Brown, M. S. & Goldstein, J. L. (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(20):11041-11048.

Brown, A. J.; Sun, L.; Feramisco, J. D.; Brown, M. S.; Goldstein, J. L. (2002). Cholesterol addition to ER membranes alters conformation of SCAP, the SREBP escort protein that regulates cholesterol metabolism. *Mol Cell.* 10(2):237-245.

Brunet, S.; Thibault, L.; Lepage, G.; Seidman, E. G.; Dubé, N.; Levy, E. (2000). Modulation of endoplasmic reticulum-bound cholesterol regulatory enzymes by iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med.* 28(1):46-54.

Buege, J. A. & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52:302-310.

Burt, M. J.; Halliday, J. W.; Powell, L. W. (1993). Iron and coronary heart disease. *BMJ.* 307(6904):575-576.

Campbell, M. K. Bioquímica. 3^a ed., p. 751, São Paulo: Artes Médicas Sul; 2001.

Canadian Council on Animal Care. (1984). Guide to the Care and Use of Experimental Animals 1984; CCAC. Ottawa, Canada.

Cario, H.; Holl, R. W.; Debatin, K. M.; Kohne, E. (2003). Insulin sensitivity and beta-cell secretion in thalassaemia major with secondary haemochromatosis: assessment by oral glucose tolerance test. *Eur J Pediatr.* 162(3):139-146.

Caroline, A. E.; Elizabeth, A. R.; Anthony, M. W. (1996). The transferrin receptor. *Biomembranes: A Multi-Volume Treatise.* 4:255-287.

Carmiel-Haggai, M.; Cederbaum, A. I.; Nieto, N. (2005). A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *FASEB J.* 19(1):136-138.

Castrillo, A. & Tontonoz, P. (2004). Nuclear receptors in macrophage biology: at the crossroads of lipid metabolism and inflammation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20:455-480.

Castro, G. R. & Fielding, C. J. (1988). Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high-density lipoprotein. *Biochemistry.* 27(1):25-29.

Cetin, A.; Kaynar, L.; Koçyiğit, I.; Hacıoğlu, S. K.; Saraymen, R.; Oztürk, A.; Orhan, O.; Sağıdıç, O. (2008). The effect of grape seed extract on radiation-induced oxidative stress in the rat liver. *Turk J. Gastroenterol.* 19(2):92-98.

Chait, A.; Han, C.; Oram, J.; Heinecke, J. (2005). The immune system and atherogenesis. Lipoprotein-associated inflammatory proteins: markers or mediators of cardiovascular disease? *J Lipid Res.* 46: 389-403.

Champe, P. C. & Harvey, R. A. Metabolismo de Colesterol e Lipídios e Metabolismo dos Lipídios da Dieta. Bioquímica Ilustrada. Brazil: Artmed. 211-234; 169-176, Porto Alegre; 2002.

Chan, S. S.; Monteiro, H. P.; Deucher, G. P.; Abud, R. L.; Abuchalla, D.; Junqueira, V. B. (1998). Functional activity of blood polymorphonuclear leukocytes as an oxidative stress biomarker in human subjects. *Free Radic Biol Med.* 24(9):1411-1418.

Chapman, M. J. (2006). Fibrates: therapeutic review. *The British Journal of Diabetes & Vascular Disease.* 6:11-19.

Chaves, M.M.; Rocha-Vieira, E.; Lima e Silva, R.; Nogueira-Machado, J.A., 2000. Increase of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species generated by phagocytizing granulocytes related to age. *Mechanisms of ageing and development.* 119(1-2):1-8.

Cheng, Y.; Zak, O.; Aisen, P.; Harrison, S. C.; Walz, T. (2004). Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. *Cell.* 116(4):565-576.

Cherukuri, S.; Potla, R.; Sarkar, J.; Nurko, S.; Harris, Z. L.; Fox, P. L. (2005). Unexpected role of ceruloplasmin in intestinal iron absorption. *Cell Metab.* 2(5):309-319.

Chiu, D.; Kuypers, F.; Lubin, B. (1989). Lipid peroxidation in human red cells. *Semin Hematol.* 26(4):257-276.

Cockell, K. A.; Wotherspoon, A. T.; Belonje, B.; Fritz, M. E.; Madère, R.; Hidiroyglou, N.; Plouffe, L. J.; Ratnayake, W. M.; Kubow, S. (2005). Limited effects of combined dietary copper deficiency/iron overload on oxidative stress parameters in rat liver and plasma. *J Nutr Biochem.* 16(12):750-756.

Connor, W. E.; De Francesco, C. A.; Connor, S. L. (1993). n-3 fatty acids from fish oil. Effects on plasma lipoproteins and hypertriglyceridemic patients. *Ann NY Acad Sci.* 683: 16-34.

Conrad, M. E. & Umbreit, J. N. (2002). Pathways of iron absorption. *Blood Cells Mol Dis.* 29(3):336-355.

Cooksey, R. C.; Jouihan, H. A.; Ajioka, R. S.; Hazel, M. W.; Jones, D. L.; Kushner, J. P.; McClain, D. A. (2004). Oxidative stress, beta-cell apoptosis, and decreased insulin secretory capacity in mouse models of hemochromatosis. *Endocrinology.* 145(11):5305-5312.

Cornejo, P.; Varela, P.; Videla, L. A.; Fernández, V. (2005). Chronic iron overload enhances inducible nitric oxide synthase expression in rat liver. *Nitric Oxide.* 13(1):54-61.

Crawford, R. D. (1995). Proposed role for a combination of citric acid and ascorbic acid in the production of dietary iron overload: a fundamental cause of disease. *Biochem Mol Med.* 54(1):1-11.

Cross, A. R. & Segal, A. W. (2004). The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta.* 1657(1):1-22.

Cullinan, S. B.; Gordan, J. D.; Jin, J.; Harper, J. W.; Diehl, J. A. (2004). The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Mol Cell Biol.* 24(19):8477-8486.

Dabbagh, A. J.; Shwaery, G. T.; Keaney, J. F. Jr.; Frei, B. (1997). Effect of iron overload and iron deficiency on atherosclerosis in the hypercholesterolemic rabbit. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17(11):2638-2645.

Dal-Pizzol, F.; Klamt, F.; Frota, M. L. Jr.; Andrade, M. E.; Caregnato, F. F.; Vianna, M. M.; Schröder, N.; Quevedo, J.; Izquierdo, I.; Archer, T.; Moreira, J. C. (2001). Neonatal iron exposure induces oxidative stress in adult Wistar rat. *Brain Res Dev Brain Res.* 130(1):109-114.

Dandona, P.; Hussain, M. A.; Varghese, Z.; Politis, D.; Flynn, D. M.; Hoffbrand, A. V. (1983). Insulin resistance and iron overload. *Ann Clin Biochem.* 20 (Pt 2):77-79.

Daniels, T. F.; Killinger, K. M.; Michal, J. J.; Wright, R. W. Jr.; Jiang, Z. (2009). Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. *Int J Biol Sci.* 5(5):474-488.

Day, S. M.; Duquaine, D.; Mundada, L. V.; Menon, R. G.; Khan, B. V.; Rajagopalan, S.; Fay, W. P. (2003). Chronic iron administration increases vascular oxidative stress and accelerates arterial thrombosis. *Circulation.* 107(20):2601-2606.

de Valk, B. & Marx, J. J. (1999). Iron, atherosclerosis, and ischemic heart disease. *Arch Intern Med.* 159(14):1542-1548.

Deaglio, S.; Capobianco, A.; Calì, A.; Bellora, F.; Alberti, F.; Righi, L.; Sapino, A.; Camaschella, C.; Malavasi, F. (2002). Structural, functional, and tissue distribution analysis of human transferrin receptor-2 by murine monoclonal antibodies and a polyclonal antiserum. *Blood.* 100(10):3782-3789.

Dickinson, D. A. & Forman, H. J. (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol.* 64(5-6):1019-1026.

Dinkova-Kostova, A. T.; Holtzclaw, W. D.; Kensler, T. W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chem Res Toxicol.* 18(12):1779-1791.

Đomitrović, R.; Tota, M.; Milin, C. (2006). Oxidative stress in mice: effects of dietary corn oil and iron. *Biol Trace Elem Res.* 113(2):177-191.

Donovan, A.; Brownlie, A.; Zhou, Y.; Shepard, J.; Pratt, S. J.; Moynihan, J.; Paw, B. H.; Drejer, A.; Barut, B.; Zapata, A.; Law, T. C.; Brugnara, C.; Lux, S. E.; Pinkus, G.

S.; Pinkus, J. L.; Kingsley, P. D.; Palis, J.; Fleming, M. D.; Andrews, N. C.; Zon, L. I. (2000). Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*. 403(6771):776-781.

Dreyer, C.; Keller, H.; Mahfoudi, A.; Laudet, V.; Krey, G.; Wahli, W. (1993). Positive regulation of the peroxisomal beta-oxidation pathway by fatty acids through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Biol Cell*. 77(1):67-76.

Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 82(1):47-95.

Duez, H.; Chao, Y. S.; Hernandez, M.; Torpier, G.; Poulaïn, P.; Mundt, S.; Mallat, Z.; Teissier, E.; Burton, C. A.; Tedgui, A.; Fruchart, J. C.; Fiévet, C.; Wright, S. D.; Staels, B. J. (2002). Reduction of atherosclerosis by the peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist fenofibrate in mice. *Biol Chem*. 277(50):48051-48057.

Duffy, S. J.; Biegelsen, E. S.; Holbrook, M.; Russell, J. D.; Gokce, N.; Keaney, J. F. Jr.; Vita, J. A. (2001). Iron chelation improves endothelial function in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 103(23):2799-2804.

Durak, I.; Ozbek, H.; Devrim, E.; Karagenç, N.; Ergüder, I. B. (2004). Effects of cholesterol supplementation on antioxidant enzyme activities in rat hepatic tissues: possible implications of hepatic paraoxonase in atherogenesis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 14: 211–214.

Eckerson, H. W.; Wyte, C. M.; La Du, B. N. (1983). The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet*. 35:1126-1138.

Facchini, F. S. (1998). Effect of phlebotomy on plasma glucose and insulin concentrations. *Diabetes Care*. 21(12):219.

Fang, Y. Z.; Yang, S.; Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 18(10):872-879.

Finch, C. A. & Huebers, H. (1982). Perspectives in iron metabolism. *N Engl J Med*. 306(25):1520-1528.

Fischer, J. G.; Glauert, H. P.; Yin, T.; Sweeney-Reeves, M. L.; Larmonier, N.; Black, M. C. (2002). Moderate iron overload enhances lipid peroxidation in livers of rats, but does not affect NF-kappaB activation induced by the peroxisome proliferator, Wy-14,643. *J Nutr*. 132(9):2525-2531.

Fleming, D. J.; Tucker, K. L.; Jacques, P. F.; Dallal, G. E.; Wilson, P. W.; Wood, R. J. (2002). Dietary factors associated with the risk of high iron stores in the elderly Framingham Heart Study cohort. *Am J Clin Nutr*. 76:1375-1384.

Ford, E. S. & Cogswell, M. E. (1999). Diabetes and serum ferritin concentration among U.S. adults. *Diabetes Care*. 22(12):1978-1983.

Forman, B. M.; Chen, J., Evans, R. M. (1997). Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94(9):4312-4317.

Franceschi, C. & Ottaviani, E. (1997). Stress, inflammation and natural immunity in the aging process: a new theory. *Aging (Milano)*. 9(4):S30-31.

Francis, G. A.; Annicotte, J. S.; Auwerx, J. (2003). PPAR-alpha effects on the heart and other vascular tissues. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 285(1):H1-9.

Fridovich I. (1989). Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem*. 264(14):7761-7764.

Fridovich, I. (1997). Superoxide anion radical (O₂-), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem*. 272(30):18515-18517.

Fruchart, J. C. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR alpha): at the crossroads of obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 205(1):1-8.

Fu, J. H.; Xie, S. R.; Kong, S. J.; Wang, Y.; Wei, W.; Shan, Y.; Luo, Y. M. (2009). The combination of a high-fat diet and chronic stress aggravates insulin resistance in Wistar male rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 117(7):354-360.

Fukushima, Y.; Kasuga, M.; Nakao, K.; Shimomura, I.; Matsuzawa, Y. (2009). Effects of coffee on inflammatory cytokine gene expression in mice fed high-fat diets. *J Agric Food Chem*. 57(23):11100-11105.

Ganz, T. (2004). Hepcidin in iron metabolism. *Curr Opin Hematol*. 11(4):251-254.

Getz, G. S. & Reardon, C. A. (2004). Paraoxonase, a cardioprotective enzyme: continuing issues. *Curr Opin Lipidol*. 15: 261–267.

Gilca, M.; Stoian, I.; Atanasiu, V.; Virgolici, B. (2007). The oxidative hypothesis of senescence. *J Postgrad Med*. 53(3):207-213.

Gillum, R. F. (2001). Association of serum ferritin and indices of body fat distribution and obesity in Mexican American men - the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 25:639-645.

Girelli, D.; Olivieri, O.; De Franceschi, L.; Corrocher, R.; Bergamaschi, G.; Cazzola, M. (1995). A linkage between hereditary hyperferritinaemia not related to iron overload and autosomal dominant congenital cataract. *Br J Haematol*. 90(4):931-934.

Goldfischer, S.; Grottsky, H. W.; Chang, C. H.; Berman, E. L.; Richert, R. R.; Karmarkar, S. D.; Roskamp, J. O.; Morecki, R. (1981). Idiopathic neonatal iron storage involving the liver, pancreas, heart, and endocrine and exocrine glands. *Hepatology*. 1(1):58-64.

Goldstein, J. L.; DeBose-Boyd, R. A.; Brown, M. S. (2006). Protein sensors for membrane sterols. *Cell*. 124(1):35-46.

Gordeuk, V. R. (1992). Hereditary and nutritional iron overload. *Baillieres Clin Haematol.* 5(1):169-186.

Goswami, T. & Andrews, N. C. (2006). Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing. *J Biol Chem.* 281(39):28494-28498.

Graham, R. M.; Chua, A. C.; Herbison, C. E.; Olynyk, J. K.; Trinder, D. (2007). Liver iron transport. *World J Gastroenterol.* 13(35):4725-4736.

Graham, R. M.; Reutens, G. M.; Herbison, C. E.; Delima, R. D.; Chua, A. C.; Olynyk, J. K.; Trinder, D. (2008). Transferrin receptor 2 mediates uptake of transferrin-bound and non-transferrin-bound iron. *J Hepatol.* 48(2):327-334.

Green, P.; Eviatar, J. M.; Sirota, P.; Avidor, I. (1989). Secondary hemochromatosis due to prolonged iron ingestion. *Isr J Med Sci.* 25(4):199-201.

Guillén, C.; McInnes, I. B.; Kruger, H.; Brock, J. H. (1998). Iron, lactoferrin and iron regulatory protein activity in the synovium; relative importance of iron loading and the inflammatory response. *Ann Rheum Dis.* 57(5):309-314.

Gutteridge, J. M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 41(12 Pt 2):1819-1828.

Halliday, J. W. & Powell, L. W. (1982). Iron overload. *Semin Hematol.* 19(1):42-53.

Halliwell, B. H. & Gutteridge, J. M. Free radicals in biology and medicine. 2^aed. Oxford Univ press: Oxford, UK; 1989.

Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186:1-85.

Hentze, M. W.; Caughman, S. W.; Rouault, T. A.; Barriocanal, J. G.; Dancis, A.; Harford, J. B.; Klausner, R. D. (1987). Identification of the iron-responsive element for the translational regulation of human ferritin mRNA. *Science.* 238(4833):1570-1573.

Holbein, B. E. (1980). Iron-controlled infection with *Neisseria meningitidis* in mice. *Infect Immun.* 29(3):886-891.

Horton, J. D.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* 109(9):1125-1131.

Horton, J. D.; Shah, N. A.; Warrington, J. A.; Anderson, N. N.; Park, S. W.; Brown, M. S.; Goldstein, J. L. (2003). Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100(21):12027-12032.

Hu, R.; Xu, C.; Shen, G.; Jain, M. R.; Khor, T. O.; Gopalkrishnan, A.; Lin, W.; Reddy, B.; Chan, J. Y.; Kong, A. N. (2006). Gene expression profiles induced by cancer chemopreventive isothiocyanate sulforaphane in the liver of C57BL/6J mice and C57BL/6J/Nrf2 (-/-) mice. *Cancer Lett.* 243(2):170-192.

Hua, N. W.; Stoohs, R. A.; Facchini, F. S. (2001). Low iron status and enhanced insulin sensitivity in lacto-ovo vegetarians. *Br J Nutr.* 86(4):515-519.

Huang, H. C.; Nguyen, T.; Pickett, C. B. (2002). Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J Biol Chem.* 277(45):42769-42774.

Huang, Z.; Zhou, X.; Nicholson, A. C.; Gotto, A. M. Jr.; Hajjar, D. P.; Han, J. (2008). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in mice induces expression of the hepatic low-density lipoprotein receptor. *Br J Pharmacol.* 155(4):596-605.

Ihara, Y.; Chuda, M.; Kuroda, S.; Hayabara, T. (1999). Hydroxyl radical and superoxide dismutase in blood of patients with Parkinson's disease: relationship to clinical data. *J Neurol Sci.* 170(2):90-95.

Irace, C.; Scorziello, A.; Maffettone, C.; Pignataro, G.; Matrone, C.; Adornetto, A.; Santamaria, R.; Annunziato, L.; Colonna, A. (2005). Divergent modulation of iron regulatory proteins and ferritin biosynthesis by hypoxia/reoxygenation in neurones and glial cells. *J Neurochem.* 95(5):1321-1331.

Jauhainen, M. & Dolphin, P. J. (1986). Human plasma lecithin-cholesterol acyltransferase. An elucidation of the catalytic mechanism. *J Biol Chem.* 261(15):7032-7043.

Jehn, M. L.; Guallar, E.; Clark, J. M.; Couper, D.; Duncan, B. B.; Ballantyne, C. M.; Hoogeveen, R. C.; Harris, Z. L.; Pankow, J. S. (2007). A prospective study of plasma ferritin level and incident diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Epidemiol.* 165(9):1047-1054.

Jiang, R.; Manson, J. E.; Meigs, J. B. (2004). Body iron stores in relation to risk of type 2 diabetes in apparently healthy women. *JAMA.* 291:711-717.

Kadota, K.; Yui, Y.; Hattori, R.; Murohara, Y.; Kawai, C. (1991). Decreased sulphhydryl groups of serum albumin in coronary artery disease. *Jpn Circ J.* 55: 937-941.

Kensler, T. W.; Wakabayashi, N.; Biswal, S. (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 47: 89-116.

Kirk, E. A.; Heinecke, J. W.; LeBoeuf, R. C. (2001). Iron overload diminishes atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Clin Invest.* 107(12):1545-1553.

Kirsch, R.; Sijtsema, H. P.; Tlali, M.; Marais, A. D.; Hall, Pde L. (2006). Effects of iron overload in a rat nutritional model of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 26(10):1258-1267.

- Kliewer, S. A.; Xu, H. E.; Lambert, M. H.; Willson, T. M. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology. *Recent Prog Horm Res.* 56:239-263.
- Knight, J. A. (1997). Reactive oxygen species and the neurodegenerative disorders. *Ann Clin Lab Sci.* 27(1):11-25.
- Knutson, M. D.; Walter, P. B.; Ames, B. N.; Viteri, F. E. (2000). Both iron deficiency and daily iron supplements increase lipid peroxidation in rats. *J Nutr.* 130(3):621-628.
- Koehler, P. (2003). Concentrations of Low and High Molecular Weight Thiols in Wheat Dough As Affected by Different Concentrations of Ascorbic Acid. *J Agric Food Chem.* 51 (17): 4948-4953.
- Kohgo, Y.; Ikuta, K.; Otake, T.; Torimoto, Y.; Kato, J. (2008). Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int J Hematol.* 88(1):7-15.
- Kostellow, A. B. & Morrill, G. A. (2004). Iron-catalyzed lipid peroxidation in aortic cells in vitro: protective effect of extracellular magnesium. *Atherosclerosis.* 175(1):15-22.
- Kotronen, A. & Yki-Järvinen, H. (2008). Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28(1):27-38.
- Kunitomo, M.; Yamaguchi, Y.; Kagota, S.; Yoshikawa, N.; Nakamura, K.; Shinozuka, K. (2009). Biochemical evidence of atherosclerosis progression mediated by increased oxidative stress in apolipoprotein E-deficient spontaneously hyperlipidemic mice exposed to chronic cigarette smoke. *J Pharmacol Sci.* 110(3):354-361.
- Kuo, Y. M.; Su, T.; Chen, H.; Attieh, Z.; Syed, B. A.; McKie, A. T.; Anderson, G. J.; Gitschier, J.; Vulpe, C. D. (2004). Mislocalisation of hephaestin, a multicopper ferroxidase involved in basolateral intestinal iron transport, in the sex linked anaemia mouse. *Gut.* 53(2):201-206.
- Kwak, M. K.; Wakabayashi, N.; Itoh, K.; Motohashi, H.; Yamamoto, M.; Kensler, T. W. (2003). Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. *J Biol Chem.* 278(10):8135-8145.
- Lao, T. T.; Chan, P. L.; Tam, K. F. (2001). Gestational diabetes mellitus in the last trimester - a feature of maternal iron excess? *Diabet Med.* 18(3):218-223.
- Lao, T. T. & Tam, K. F. (1997). Diabetes Care. Maternal serum ferritin and gestational impaired glucose tolerance. 20(9):1368-1369.
- Lauffer, R. B. (1991). Iron stores and the international variation in mortality from coronary artery disease. *Med Hypotheses.* 35(2):96-102.
- Lee, T. S.; Shiao, M. S.; Pan, C. C.; Chau, L. Y. (1999). Iron-deficient diet reduces atherosclerotic lesions in apoE-deficient mice. *Circulation.* 99(9):1222-1229.

Lee, P.; Peng, H.; Gelbart, T.; Beutler, E. (2004). The IL-6- and lipopolysaccharide-induced transcription of hepcidin in HFE-, transferrin receptor 2-, and beta 2-microglobulin-deficient hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(25):9263-9265.

Legakis, J. E.; Koepke, J. I.; Jedeszko, C.; Barlaskar, F.; Terlecky, L. J.; Edwards, H. J.; Walton, P. A.; Terlecky, S. R. (2002). Peroxisome senescence in human fibroblasts. *Mol Biol Cell.* 13(12):4243-4255.

Leonard, M. O.; Kieran, N. E.; Howell, K.; Burne, M. J.; Varadarajan, R.; Dhakshinamoorthy, S.; Porter, A. G.; O'Farrelly, C.; Rabb, H.; Taylor, C. T. (2006). Reoxygenation-specific activation of the antioxidant transcription factor Nrf2 mediates cytoprotective gene expression in ischemia-reperfusion injury. *FASEB J.* 20(14):2624-2626.

Levine, R. L.; Williams, J. A.; Stadtman, E. R.; Shacter, E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 233: 346-357.

Li, A. C.; Brown, K. K.; Silvestre, M. J.; Willson, T. M.; Palinski, W.; Glass, C. K. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest.* 106(4):523-531.

Li, W.; Xu, L. H.; Forssell, C.; Sullivan, J. L.; Yuan, X. M. (2008). Overexpression of transferrin receptor and ferritin related to clinical symptoms and destabilization of human carotid plaques. *Exp Biol Med (Maywood).* 233(7):818-826.

Li, T. & Chiang, J. Y. (2009). Regulation of Bile Acid and Cholesterol Metabolism by PPARs. *PPAR Res.* 2009:501739.

Libby P. (2002). Atherosclerosis: the new view. *Sci Am.* 286(5):46-55.

Lieber, C. S.; Leo, M. A.; Mak, K. M.; Xu, Y.; Cao, Q.; Ren, C.; Ponomarenko, A.; DeCarli, L. M. (2004). Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr.* 79(3):502-509.

Liu, Q.; Sun, L.; Tan, Y.; Wang, G.; Lin, X.; Cai, L. (2009). Role of iron deficiency and overload in the pathogenesis of diabetes and diabetic complications. *Curr Med Chem.* 16(1):113-129.

Liuzzi, J. P.; Aydemir, F.; Nam, H.; Knutson, M. D.; Cousins, R. J. (2006). Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103(37):13612-13617.

Lou, L. X.; Geng, B.; Chen, Y.; Yu, F.; Zhao, J.; Tang, C. S. (2009). Endoplasmic reticulum stress involved in heart and liver injury in iron-loaded rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 36(7):612-618.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265-275.

Lucesoli, F.; Caligiuri, M.; Roberti, M. F.; Perazzo, J. C.; Fraga, C. G. (1999). Dose-dependent increase of oxidative damage in the testes of rats subjected to acute iron overload. *Arch Biochem Biophys.* 372(1):37-43.

Madej, A.; Okopien, B.; Kowalski, J.; Zielinski, M.; Wysocki, J.; Szygula, B.; Kalina, Z.; Herman, Z. S. (1998). Effects of fenofibrate on plasma cytokine concentrations in patients with atherosclerosis and hyperlipoproteinemia IIb. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 36(6):345-349.

Mansour, S. Z. & El-Kabany, H. (2009). Effects of Fructus Piperis Longi extract on fibrotic liver of gamma-irradiated rats. *Chin Med.* 4:2.

Marchesini, G.; Bugianesi, E.; Forlani, G.; Cerrelli, F.; Lenzi, M.; Manini, R.; Natale, S.; Vanni, E.; Villanova, N.; Melchionda, N.; Rizzetto, M. (2003). Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology.* 37(4):917-923

Marx, N.; Sukhova, G. K.; Collins, T.; Libby, P.; Plutzky, J. (1999). PPARalpha activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation.* 99(24):3125-3131.

Matthews, A. J.; Vercellotti, G. M.; Menchaca, H. J.; Bloch, P. H.; Michalek, V. N.; Marker, P. H.; Murar, J.; Buchwald, H. (1997). Iron and atherosclerosis: inhibition by the iron chelator deferiprone (L1). *J Surg Res.* 73(1):35-40.

McClain, D. A.; Abraham, D.; Rogers, J.; Brady, R.; Gault, P.; Ajioka, R.; Kushner, J. P. (2006). High prevalence of abnormal glucose homeostasis secondary to decreased insulin secretion in individuals with hereditary haemochromatosis. *Diabetologia.* 49(7):1661-1669.

McCord, J. M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med.* 108(8):652-659.

McDonnell, S. M.; Hover, A.; Gloe, D.; Ou, C. Y.; Cogswell, M. E.; Grummer-Strawn, L. (1999). Population-based screening for hemochromatosis using phenotypic and DNA testing among employees of health maintenance organizations in Springfield, Missouri. *Am J Med.* 107(1):30-37.

McKie, A. T.; Marciani, P.; Rolfs, A.; Brennan, K.; Wehr, K.; Barrow, D.; Miret, S.; Bomford, A.; Peters, T. J.; Farzaneh, F.; Hediger, M. A.; Hentze, M. W.; Simpson, R. J. (2000). A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell.* 5(2):299-309.

McKie, A. T.; Barrow, D.; Latunde-Dada, G. O.; Rolfs, A.; Sager, G.; Mudaly, E.; Mudaly, M.; Richardson, C.; Barlow, D.; Bomford, A.; Peters, T. J.; Raja, K. B.; Shirali, S.; Hediger, M. A.; Farzaneh, F.; Simpson, R. J. (2001). An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science.* 291(5509):1755-1759.

Mena, N. P.; Esparza, A.; Tapia, V.; Valdés, P.; Núñez, M. T. (2008). Hepcidin inhibits apical iron uptake in intestinal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 294(1):G192-198.

Mendes, J. F.; Arruda, S. F.; Siqueira, E. M.; Ito, M. K.; Silva, E. F. (2009). Iron status and oxidative stress biomarkers in adults: a preliminary study. *Nutrition*. 25(4):379-384.

Mendlar, M. H.; Turlin, B.; Moirand, R.; Jouanolle, A. M.; Sapey, T.; Guyader, D.; Le Gall, J. Y.; Brissot, P.; David, V.; Deugnier, Y. (1999). Insulin resistance-associated hepatic iron overload. *Gastroenterology*. 117(5):1155-1163.

Merkel, P. A.; Simonson, D. C.; Amiel, S. A.; Plewe, G.; Sherwin, R. S.; Pearson, H. A.; Tamborlane, W. V. (1988). Insulin resistance and hyperinsulinemia in patients with thalassemia major treated by hypertransfusion. *N Engl J Med*. 318(13):809-814.

Moirand, R.; Mortaji, A. M.; Loréal, O.; Paillard, F.; Brissot, P.; Deugnier, Y. (1997). A new syndrome of liver iron overload with normal transferrin saturation. *Lancet*. 349(9045):95-97.

Moore, A. B.; Shannon, J.; Chen, C.; Lampe, J. W.; Ray, R. M.; Lewis, S. K.; Lin, M.; Stalsberg, H.; Thomas, D. B. (2009). Dietary and stored iron as predictors of breast cancer risk: A nested case-control study in Shanghai. *Int J Cancer*. 125(5):1110-1117.

Morel, D. W. (1994). Reduced cholesterol efflux to mildly oxidized high density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*. 200: 408-416.

Morita, H.; Ikeda, S.; Yamamoto, K.; Morita, S.; Yoshida, K.; Nomoto, S.; Kato, M.; Yanagisawa, N. (1995). Hereditary ceruloplasmin deficiency with hemosiderosis: a clinicopathological study of a Japanese family. *Ann Neurol*. 37(5):646-656.

Motohashi, H.; Katsuoka, F.; Engel, J. D.; Yamamoto, M. (2004). Small Maf proteins serve as transcriptional cofactors for keratinocyte differentiation in the Keap1-Nrf2 regulatory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(17):6379-6384.

Muckenthaler, M. & Hentze, M. W. (1997). Mechanisms for posttranscriptional regulation by iron-responsive elements and iron regulatory proteins. *Prog Mol Subcell Biol*. 18:93-115.

Nemeth, E.; Tuttle, M. S.; Powelson, J.; Vaughn, M. B.; Donovan, A.; Ward, D. M.; Ganz, T.; Kaplan, J. (2004). Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 306(5704):2090-2093.

Ng, C. J.; Shih, D. M.; Hama, S.; et al. (2004). The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*. 38: 153-163.

Nicolas, G.; Chauvet, C.; Viatte, L.; Danan, J. L.; Bigard, X.; Devaux, I.; Beaumont, C.; Kahn, A.; Vaulont, S. (2002). The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest*. 110(7):1037-1044.

Nicolas, G.; Viatte, L.; Lou, D. Q.; Bennoun, M.; Beaumont, C.; Kahn, A.; Andrews, N. C.; Vaulont, S. (2003). Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis. *Nat Genet*. 34(1):97-101.

Niederkofler, V.; Salie, R.; Arber, S. (2005). Hemojuvelin is essential for dietary iron sensing, and its mutation leads to severe iron overload. *J Clin Invest.* 115(8):2180-2186.

Nistor, A.; Bulla, A.; Filip, D. A.; Radu, A. (1987). The hyperlipidemic hamster as a model of experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 68(1-2):159-173.

Nitenberg, A.; Paycha, F.; Ledoux, S.; Sachs, R.; Attali, J. R.; Valensi, P. (1998). Coronary artery responses to physiological stimuli are improved by deferoxamine but not by L-arginine in non-insulin-dependent diabetic patients with angiographically normal coronary arteries and no other risk factors. *Circulation.* 97(8):736-743.

Nitenberg, A.; Ledoux, S.; Valensi, P.; Sachs, R.; Antony, I. (2002). Coronary microvascular adaptation to myocardial metabolic demand can be restored by inhibition of iron-catalyzed formation of oxygen free radicals in type 2 diabetic patients. *Diabetes.* 51(3):813-818.

Nohturfft, A.; Yabe, D.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S.; Espenshade, P. J. (2000). Regulated step in cholesterol feedback localized to budding of SCAP from ER membranes. *Cell.* 102(3):315-323.

Ohgami, R. S.; Campagna, D. R.; Greer, E. L.; Antiochos, B.; McDonald, A.; Chen, J.; Sharp, J. J.; Fujiwara, Y.; Barker, J. E.; Fleming, M. D. (2005). Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat Genet.* 37(11):1264-1269.

Ohgami, R. S.; Campagna, D. R.; McDonald, A.; Fleming, M. D. (2006). The Steap proteins are metalloreductases. *Blood.* 108(4):1388-1394.

Oliveira, M.R. (2007) Ação do bezafibrato, um Agonista de PPAR- α , sobre a hipercolesterolemia induzida por dieta e excesso de Ferro em Hamsteres. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade federal de ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais.

Oliveira de Souza, M.; Silva, M.; Silva, M. E.; de Paula Oliveira, R.; Pedrosa, M. L. (2009). Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. *Nutrition.* [Epub ahead of print].

Olsson, K. S.; Marsell, R.; Ritter, B.; Olander, B.; Akerblom, A.; Ostergård, H.; Larsson, O. (1995). Iron deficiency and iron overload in Swedish male adolescents. *J Intern Med.* 237(2):187-194.

Origa, R.; Galanello, R.; Ganz, T.; Giagu, N.; Maccioni, L.; Faa, G.; Nemeth, E. (2007). Liver iron concentrations and urinary hepcidin in beta-thalassemia. *Haematologica.* 92(5):583-588.

Osborne, T. F.; Gil, G.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S. (1988). Operator constitutive mutation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase promoter abolishes protein binding to sterol regulatory element. *J Biol Chem.* 263(7):3380-3387.

Pang, J. H.; Jiang, M. J.; Chen, Y. L.; Wang, F. W.; Wang, D. L.; Chu, S. H.; Chau, L. Y. (1996). Increased ferritin gene expression in atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* 97(10):2204-2212.

Palou, M.; Priego, T.; Sánchez, J.; Villegas, E.; Rodriguez, A. M.; Palou, A.; Picó, C. (2008). Sequential changes in the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue and liver in response to fasting. *Pflugers Arch.* 456:825-836.

Paravicini, T. M. & Touyz, R. M. (2008). NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care.* 31:S170-180.

Park, C. H.; Bacon, B. R.; Brittenham, G. M.; Tavill, A. S. (1987). Pathology of dietary carbonyl iron overload in rats. *Lab Invest.* 57(5):555-563.

Payá, D.; Gray, G. A.; Fleming, I.; Stoclet, J. C. (1993). Effect of dexamethasone on the onset and persistence of vascular hyporeactivity induced by *E. coli* lipopolysaccharide in rats. *Circ Shock.* 41(2):103-112.

Patere, S. N.; Saraf, M. N.; Majumdar, A. S. (2009). Hepatoprotective activity of polyherbal formulation (Normeta) in oxidative stress induced by alcohol, polyunsaturated fatty acids and iron in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 105(3):173-180.

Pieper, G. M. & Siebeneich, W. (1997). Diabetes-induced endothelial dysfunction is prevented by long-term treatment with the modified iron chelator, hydroxyethyl starch conjugated-deferoxamine. *J Cardiovasc Pharmacol.* 30(6):734-738.

Pietrangelo, A.; Montosi, G.; Totaro, A.; Garuti, C.; Conte, D.; Cassanelli, S.; Fraquelli, M.; Sardini, C.; Vasta, F.; Gasparini, P. (1999). Hereditary hemochromatosis in adults without pathogenic mutations in the hemochromatosis gene. *N Engl J Med.* 341(10):725-732.

Pigeon, C.; Ilyin, G.; Courselaud, B.; Leroyer, P.; Turlin, B.; Brissot, P.; Loréal, O. (2001). A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem.* 276(11):7811-7819.

Piperno, A.; Trombini, P.; Gelosa, M. (2002). Increased serum ferritin is common in men with essential hypertension. *J Hypertens.* 20:1513-1518.

Poli, G.; Biasi, F.; Chiarpotto, E.; Dianzani, M. U.; De Luca, A.; Esterbauer, H. (1989). Lipid peroxidation in human diseases: evidence of red cell oxidative stress after circulatory shock. *Free Radic Biol Med.* 6(2):167-170.

Ponka, P.; Beaumont, C.; Richardson, D. R. (1998). Function and regulation of transferrin and ferritin. *Semin Hematol.* 35(1):35-54.

Porreca, E.; Ucchino, S.; Di Febbo, C.; Di Bartolomeo, N.; Angelucci, D.; Napolitano, A. M.; Mezzetti, A.; Cuccurullo, F. (1994). Antiproliferative effect of desferrioxamine

on vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb.* 14(2):299-304.

Powers, K. M.; Smith-Weller, T.; Franklin, G. M.; Longstreth, W. T. Jr.; Swanson, P. D.; Checkoway, H. (2003). Parkinson's disease risks associated with dietary iron, manganese, and other nutrient intakes. *Neurology.* 60(11):1761-1766.

Praticó, D.; Pasin, M.; Barry, O. P.; Ghiselli, A.; Sabatino, G.; Iuliano, L.; FitzGerald, G. A.; Violi, F. (1999). Iron-dependent human platelet activation and hydroxyl radical formation: involvement of protein kinase C. *Circulation.* 99(24):3118-3124.

Quinlan, G. J.; Evans, T. W.; Gutteridge, J. M. (1994). Oxidative damage to plasma proteins in adult respiratory distress syndrome. *Free Radic Res.* 20: 289-298.

Rasmussen, R. (2001). Quantification on the LightCycler. Meuer, S, Wittwer, C., Nakagawara, K. (ed) Rapid cycle real-time PCR. Methods and applications. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 21-34.

Reeves, P. G.; Nielsen, F. H.; Fahey, G. C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 123(11): 467-472.

Reznick, A. Z. & Packer, L. (1994). Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 233:357-363.

Richardson, D. R. & Ponka, P. (1997). The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta.* 1331(1):1-40.

Rigotti, A.; Trigatti, B.; Babitt, J.; Penman, M.; Xu, S.; Krieger, M. (1997). Scavenger receptor BI--a cell surface receptor for high density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol.* 8(3):181-188.

Rizvi, F.; Puri, A.; Bhatia, G.; Khanna, A. K.; Wulff, E. M.; Rastogi, A. K.; Chander, R. (2003). Antidyslipidemic action of fenofibrate in dyslipidemic-diabetic hamster model. *Biochem Biophys Res Commun.* 305(2):215-222.

Roetto, A.; Totaro, A.; Cazzola, M.; Cicilano, M.; Bosio, S.; D'Ascola, G.; Carella, M.; Zelante, L.; Kelly, A. L.; Cox, T. M.; Gasparini, P.; Camaschella, C. (1999). Juvenile hemochromatosis locus maps to chromosome 1q. *Am J Hum Genet.* 64(5):1388-1393.

Rosa, C. O.; Costa, N. M.; Nunes, R. M.; Leal, P. F. (1998). The cholesterol-lowering effect of black, carioquinha and red beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) in hypercholesterolemic rats. *Arch Latinoam Nutr.* 48(4):306-310.

Ross, R. (1999). Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 340(2):115-126.

Rouault, T. A. (2006). The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat Chem Biol.* 2(8):406-414.

Russell, D. W. & Setchell, K. D. (1992). Bile acid biosynthesis. *Biochemistry*. 31(20):4737-4749.

Sallie, R.; Tredeger, J. M.; Williams, R. (1991). Drugs and the liver. Part 1: Testing liver function. *Biopharm Drug Dispos*. 12(4):251-259.

Salonen, J. T.; Tuomainen, T. P.; Nyysönen, K.; Lakka, H. M.; Punnonen, K. (1998). Relation between iron stores and non-insulin dependent diabetes in men: case-control study. *BMJ*. 317(7160):727-730.

Schafer, A. I.; Cheron, R. G.; Dluhy, R.; Cooper, B.; Gleason, R. E.; Soeldner, J. S.; Bunn, H. F. (1981). Clinical consequences of acquired transfusional iron overload in adults. *N Engl J Med*. 304(6):319-324.

Schoonjans, K.; Staels, B.; Auwerx, J. J. (1996). Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *Lipid Res*. 37(5):907-925.

Sedlak, J.; Lindsay, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulphhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*. 25: 192-205.

Shah, S. V. & Alam, M. G. (2003). Role of iron in atherosclerosis. *Am J Kidney Dis*. 41(3):S80-83.

Sharp, P. & Srai, S. K. (2007). Molecular mechanisms involved in intestinal iron absorption. *World J Gastroenterol*. 13(35):4716-4724.

Shayeghi, M.; Latunde-Dada, G. O.; Oakhill, J. S.; Laftah, A. H.; Takeuchi, K.; Halliday, N.; Khan, Y.; Warley, A.; McCann, F. E.; Hider, R. C.; Frazer, D. M.; Anderson, G. J.; Vulpe, C. D.; Simpson, R. J.; McKie, A. T. (2005). Identification of an intestinal heme transporter. *Cell*. 122(5):789-801.

Shulman, A. I. & Mangelsdorf, D. J. (2005). Retinoid x receptor heterodimers in the metabolic syndrome. *N Engl J Med*. 353(6):604-615.

Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*. 215(2):213-219.

Silva, J.C.A. (2005). Efeito do excesso de ferro e dieta hipercolesterolemiantre sobre o perfil de lipídios séricos e estresse oxidativo em hamsters. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais.

Silva, M.; Silva, M. E.; de Paula, H.; Carneiro, C. M.; Pedrossa, M. L. (2008). Iron overload alters glucose homeostasis, causes liver steatosis, and increases serum triacylglycerols in rats. *Nutr Res*. 28(6):391-398.

Starke-Reed, P. E. & Oliver, C. N. (1989). Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Arch Biochem Biophys*. 275(2):559-567.

Story, A. J.; Baldino, A. (1981). Modification of cholesterol accumulation by dietary fiber in rats. *Nutr Rep Internat*. 24: 1213-1217.

Sullivan, J. L. (1981). Iron and the sex difference in heart disease risk. *Lancet*. 1(8233):1293-1294.

Sun, L.; Franco, O. H.; Hu, F. B.; Cai, L.; Yu, Z.; Li, H.; Ye, X.; Qi, Q.; Wang, J.; Pan, A.; Liu, Y.; Lin, X. (2008). Ferritin concentrations, metabolic syndrome, and type 2 diabetes in middle-aged and elderly chinese. *J Clin Endocrinol Metab*. 93(12):4690-4696.

Tan, Y.; Zhang, J. N.; Chen, J. H.; Wang, L. J.; Liu, H. X. (2009). [Role of JNK signal transduction pathway in nonalcoholic fatty liver disease. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 17(11):821-825.

Tavill, A. S.; Sharma, B. K.; Bacon, B. R. (1990). Iron and the liver: genetic hemochromatosis and other hepatic iron overload disorders. *Prog Liver Dis*. 9:281-305.

Thimmulappa, R. K.; Mai, K. H.; Srisuma, S.; Kensler, T. W.; Yamamoto, M.; Biswal, S. (2002). Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res*. 62(18):5196-5203.

Thomàs-Moyà, E.; Gianotti, M.; Proenza, A. M.; Lladó, I. (2007). Paraoxonase 1 response to a high-fat diet: gender differences in the factors involved. *Mol Med*. 13(3-4):203-209.

Tiedge, M.; Lortz, S.; Drinkgern, J.; Lenzen, S. (1997). Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes*. 46(11):1733-1742.

Tong, K. I.; Katoh, Y.; Kusunoki, H.; Itoh, K.; Tanaka, T.; Yamamoto, M. (2006). Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Mol Cell Biol*. 26(8):2887-2900.

Toyama, T.; Nakamura, H.; Harano, Y.; Yamauchi, N.; Morita, A.; Kirishima, T.; Minami, M.; Itoh, Y.; Okanoue, T. (2004). PPARalpha ligands activate antioxidant enzymes and suppress hepatic fibrosis in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 324(2):697-704.

Tsukamoto, H.; Horne, W.; Kamimura, S.; Niemelä, O.; Parkkila, S.; Ylä-Herttuala, S.; Brittenham, G. M. (1995). Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron. *J Clin Invest*. 96(1):620-630.

Tuomainen, T. P.; Nyssonnen, K.; Salonen, R.; Tervahauta, A.; Korpela, H.; Lakka, T.; Kaplan, G. A.; Salonen, J. T. (1997). Body iron stores are associated with serum insulin and blood glucose concentrations. Population study in 1,013 eastern Finnish men. *Diabetes Care*. 20:426-428.

Turbino-Ribeiro, S. M.; Silva, M. E.; Chianca, D. A. Jr.; De Paula, H.; Cardoso, L. M.; Colombari, E.; Pedrosa, M. L. (2003). Iron overload in hypercholesterolemic rats affects iron homeostasis and serum lipids but not blood pressure. *J Nutr*. 133(1):15-20.

Turell, L.; Carballal, S.; Botti, H.; Radi, R.; Alvarez, B. (2009). Oxidation of the albumin thiol to sulfenic acid and its implications in the intravascular compartment. *Braz J Med Biol Res.* 42(4):305-311.

Turoczi, T.; Jun, L.; Cordis, G.; Morris, J. E.; Maulik, N.; Stevens, R. G.; Das, D. K. (2003). HFE mutation and dietary iron content interact to increase ischemia/reperfusion injury of the heart in mice. *Circ Res.* 92(11):1240-1246.

Uchida, K.; Hasui, Y.; Osawa, T. (1997). Covalent attachment of 4-hydroxy-2-nonenal to erythrocyte proteins. *J Biochem.* 122(6):1246-1251.

Van der Vliet, A. (2008). NADPH oxidases in lung biology and pathology: host defense enzymes, and more. *Free Radic Biol Med.* 44(6):938-955.

Vincent, H. K.; Powers, S. K.; Dirks, A. J.; Scarpace, P.J. (2001). Mechanism for obesity-induced increase in myocardial lipid peroxidation. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 25(3):378-388.

Wakabayashi, N.; Dinkova-Kostova, A. T.; Holtzclaw, W. D.; Kang, M. I.; Kobayashi, A.; Yamamoto, M.; Kensler, T. W.; Talalay, P. (2004). Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(7):2040-2045.

Wang, N.; Silver, D. L.; Costet, P.; Tall, A. R. (2000). Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. *J Biol Chem.* 275(42):33053-33058.

Ward, R. J.; Wilmet, S.; Legssyer, R.; Crichton, R. R. (2003). Iron supplementation during pregnancy- a necessary or toxic supplement? *Bioinorg Chem Appl.* 1(2):169-176.

Ward, R. J.; Wilmet, S.; Legssyer, R.; Leroy, D.; Toussaint, L.; Crichton, R. R.; Pierreux, C.; Hue, L.; Piette, J.; Srai, S. K.; Solanky, N.; Klein, D.; Summer, K. (2009). Effects of marginal iron overload on iron homeostasis and immune function in alveolar macrophages isolated from pregnant and normal rats. *Biometals.* 22(2):211-223.

Wei, Y.; Rector, R. S.; Thyfault, J. P.; Ibdah, J. A. (2008). Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World J Gastroenterol.* 14(2):193-199.

Weinberg, E. D. (1990). Cellular iron metabolism in health and disease. *Drug Metab Rev.* 22(5):531-579.

Williams, M. J.; Poulton, R.; Williams, S. (2002). Relationship of serum ferritin with cardiovascular risk factors and inflammation in young men and women. *Atherosclerosis.* 165:179-184.

Wrede, C. E.; Buettner, R.; Bollheimer, L. C.; Schölmerich, J.; Palitzsch, K. D.; Hellerbrand, C. (2006). Association between serum ferritin and the insulin resistance syndrome in a representative population. *Eur J Endocrinol.* 154(2):333-340.

Wu, J.; Liu, J.; Waalkes, M. P.; Cheng, M. L.; Li, L.; Li, C. X.; Yang, Q. (2008). High dietary fat exacerbates arsenic-induced liver fibrosis in mice. *Exp Biol Med (Maywood)*. 233(3):377-384.

Yang, T.; Espenshade, P. J.; Wright, M. E.; Yabe, D.; Gong, Y.; Aebersold, R.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S. (2002). Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell*. 110(4):489-500.

Ye, S. F.; Hou, Z. Q.; Zhang, Q. Q. (2007). Protective effects of Phellinus linteus extract against iron overload-mediated oxidative stress in cultured rat hepatocytes. *Phytother Res*. 21(10):948-953.

Yuan, X. M.; Anders, W. L.; Olsson, A. G.; Brunk, U. T. (1996). Iron in human atheroma and LDL oxidation by macrophages following erythrophagocytosis. *Atherosclerosis*. 124(1):61-73.

Yu, X. & Kensler, T. (2005). Nrf2 as a target for cancer chemoprevention. *Mutat Res*. 591(1-2):93-102.

Zheng, M. & Storz, G. (2000). Redox sensing by prokaryotic transcription factors. *Biochem Pharmacol*. 59(1):1-6.

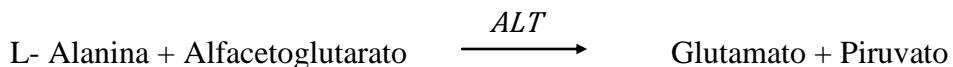
ANEXO

Anexo I – Protocolos das Dosagens Bioquímicas

I.1 - Alanina Aminotransferase

Princípio

A ALT promove a transferência de grupamentos amina de alfa aminoácidos para alfacetoácidos.



O piruvato formado é medido através da formação de hidrazona que tem intensa cor em meio alcalino.

Amostra

Recomenda-se jejum mínimo de 8 horas. Usar soro ou plasma (EDTA, heparina). A atividade enzimática é estável por 4 dias entre 2 – 8 °C e por 2 semanas a 10 °C negativos.

Produto Utilizado

Transaminase Pirúvica Catálogo 53 ANVISA - 10009010027

Labtest Diagnóstica. Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Substrato: Armazenar entre 2 – 8 °C.

Contém tampão 67 mmol/L pH 7,4, ácido alfacetoglutárico 2 mmol/L, L-alanina 100 mmol/L e azida sódica 15,4 mmol/L.

Reagente de Cor: Armazenar entre 2 – 8 °C. Não congelar.

Contém 2,4 dinitrofenilhidrazina 1 mmol/L e ácido clorídrico 1 mol/L.

NaOH – Estoque: Armazenar entre 2 – 8 °C. Reagente cáustico.

Contém hidróxido de sódio 10 mol/L.

Padrão - Piruvato de Sódio 22 mg/dL: Armazenar entre 2 – 8 °C bem vedado para evitar evaporação. Contém piruvato de sódio 2 mmol/L.

NaOH de Uso: Transferir quantitativamente o conteúdo do frasco nº 3 (20 mL) para um balão volumétrico de 500 mL, completar até a marca com água destilada ou deionizada livre de CO₂ e homogeneizar. Estável 12 meses em recipiente de plástico, entre 15 – 25 °C.

Equipamentos

1. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorbância em 505 nm ou filtro verde (490 a 549 nm).
2. Pipetas para medir amostras e reagentes.
3. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 °C).
4. Cronômetro.

Procedimento

Curva de calibração

Como o sistema de medida (Reitman-Frankel-U/mL) não é proporcional à atividade enzimática, é impossível utilizar o método do fator para cálculo, sendo necessário a preparação da curva de calibração.

Tomar 5 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

Tubo nº	1	2	3	4	5
	mL	mL	mL	mL	mL
Padrão (nº 4)	-----	0,1	0,2	0,3	0,4
TGP substrato (nº 1)	1,0	0,9	0,8	0,7	0,6
Água destilada	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Reagente de cor (nº 2)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Misturar e deixar na temperatura ambiente 20 minutos.

NaOH de Uso	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
-------------	------	------	------	------	------

Misturar e deixar na temperatura ambiente 5 minutos. Determinar as absorbâncias ou T% em 505 nm ou filtro verde (490 a 540), acertando o zero com água destilada. A cor é estável 60 minutos.

Traçado da curva de calibração

Traçar a Curva de Calibração correlacionando as leituras obtidas com os valores em Unidades/mL, expressos na tabela abaixo, utilizando papel linear (para absorbâncias) ou monolog (para T%).

Tubo nº	1	2	3	4	5
TGP (Unidades/mL)	Zero	28	57	97	150

Análise dos testes

1. Tomar 1 tubo de ensaio e proceder como a seguir:

	Teste
TGP substrato (nº 1)	0,25 mL

2. Colocar em banho-maria a 37 °C 2 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio.

Amostra	0,05 mL
---------	---------

3. Misturar e incubar em banho-maria a 37 °C exatamente 30 minutos.

Reagente de cor (nº 2)	0,25 mL
------------------------	---------

4. Misturar e deixar na temperatura ambiente 20 minutos.

NaOH de Uso	2,5 mL
-------------	--------

5. Misturar e esperar 5 minutos. Determinar as absorbâncias ou T% em 505 nm ou filtro verde (490 a 540), acertando o zero com água destilada. A cor é estável 60 minutos. Obter o valor de ALT usando a Curva de Calibração.

Unidade de medida

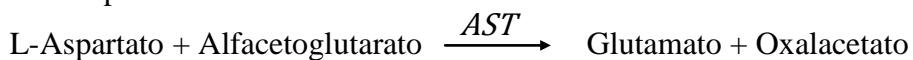
Unidades/mL

Conversão de Unidades/mL para Unidade SI: U/l = U/mL x 0,482

I.2 - Aspartato Aminotransferase

Princípio

A transaminase oxalacética promove a transferência de grupamentos amina de alfa aminoácidos para alfacetoácidos.



O oxalacetato formado é medido através da formação de hidrazona, que tem intensa cor em meio alcalino.

Amostra

Recomenda-se jejum mínimo de 8 horas. Usar soro ou plasma (EDTA, heparina). A atividade enzimática é estável por 4 dias entre 2 – 8°C e por 2 semanas a 10°C negativos.

Produto Utilizado

Transaminase Oxalacética Catálogo 52 ANVISA - 10009010031

Labtest Diagnóstica. Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Substrato: Armazenar entre 2 – 8 °C.

Contém tampão 67 mmol/L pH 7,4, ácido alfacetoglutárico 2 mmol/L, ácido L-aspártico 99 mmol/L, estabilizadores e azida sódica 15,4 mmol/L.

Reagente de Cor: Armazenar entre 2 – 8 °C. Não congelar.

Contém 2,4 dinitrofenilhidrazina 1,0 mmol/L e ácido clorídrico 1,0 mol/L.

NaOH – Estoque: Armazenar entre 2 – 8 °C. Reagente cáustico.

Contém hidróxido de sódio 10 mol/L.

Padrão - Piruvato de Sódio 22 mg/dL: Armazenar entre 2 – 8 °C. Armazenar bem vedado para evitar evaporação. Contém Piruvato de Sódio 2 mmol/L.

NaOH de Uso: Transferir quantitativamente o conteúdo do frasco nº 3 (20 mL) para um balão volumétrico de 500 mL, completar até a marca com água destilada ou deionizada livre de CO₂ e homogeneizar. Estável 12 meses em recipiente de plástico, entre 15 – 25 °C.

Equipamentos

1. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorbância em 505 nm ou filtro verde (490 a 549 nm).
2. Pipetas para medir amostras e reagentes.

3. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 °C).
4. Cronômetro.

Curva de calibração

Como o sistema de medida (Reitman-Frankel-U/mL) não é proporcional à atividade enzimática, é impossível utilizar o método do fator para cálculo, sendo necessário a preparação da curva de calibração.

Tomar 5 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

Tubo nº	1	2	3	4	5
	mL	mL	mL	mL	mL
Padrão (nº 4)	-----	0,1	0,2	0,3	0,4
TGP substrato (nº 1)	1,0	0,9	0,8	0,7	0,6
Água destilada	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Reagente de cor (nº 2)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Misturar e deixar na temperatura ambiente 20 minutos.

NaOH de Uso	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
-------------	------	------	------	------	------

Misturar e deixar na temperatura ambiente 5 minutos. Determinar as absorbâncias ou T% em 505 nm ou filtro verde (490 a 540), acertando o zero com água destilada. A cor é estável 60 minutos.

Traçado da curva de calibração

Traçar a Curva de Calibração correlacionando as leituras obtidas com os valores em Unidades/mL, expressos na tabela abaixo, utilizando papel linear (para absorbâncias) ou monolog (para T%).

Tubo nº	1	2	3	4	5
TGP (Unidades/mL)	Zero	24	61	114	190

Análise dos testes

1. Tomar 1 tubo de ensaio e proceder como a seguir:

	Teste
TGP substrato (nº 1)	0,25 mL

2. Colocar em banho-maria a 37 °C 2 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio.

Amostra	0,05 mL
---------	---------

3. Misturar e incubar em banho-maria a 37 °C exatamente 30 minutos.

Reagente de cor (nº 2)	0,25 mL
------------------------	---------

4. Misturar e deixar na temperatura ambiente 20 minutos.

NaOH de Uso	2,5 mL
-------------	--------

5. Misturar e esperar 5 minutos. Determinar as absorbâncias ou T% em 505 nm ou filtro verde (490 a 540), acertando o zero com água destilada. A cor é estável 60 minutos. Obter o valor de AST usando a Curva de Calibração.

Unidade de medida

Unidades/mL

Conversão de Unidades/mL para Unidade SI: $U/l = U/mL \times 0,482$

I.3 - Colesterol HDL

Princípio

As lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL) e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são quantitativamente precipitadas e, após centrifugação, o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (Colesterol HDL) é determinado no sobrenadante.

Amostra

O jejum não é imprescindível para a dosagem de colesterol HDL. Usar soro. O analito é estável por 3 dias entre 2 – 8°C.

Produto Utilizado

Colesterol HDL Catálogo 13 - ANVISA - 10009010026

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Precipitante: Armazenar entre 2 – 8°C. Contém ácido fosfotúngstico 1,5 mmol/L e cloreto de magnésio 54 mmol/L.

Padrão - 20 mg/dL: Armazenar entre 2 – 8°C. Armazenar bem vedado para evitar evaporação.

Equipamentos

1. Centrífuga para tubos.
2. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorbância em 500 nm ou filtro verde (490 a 510 nm).
3. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 °C).
4. Pipetas para medir amostras e reagentes.
5. Cronômetro.

Procedimento

Precipitação das VLDL e LDL: Em um tubo 12 x 75 colocar 0,25mL de soro e 0,25mL de precipitante. Agitar vigorosamente durante 30 segundos. A agitação sugerida é fundamental para obtenção de resultados consistentes. Centrifugar a 3.500 rpm por pelo menos 15 minutos para obter um sobrenadante límpido. Pipetar o sobrenadante límpido imediatamente após a centrifugação, tomando o cuidado para não ressuspender o precipitado, a fim de evitar resultados falsamente elevados.

Utilizar com o Reagente 1 - Colesterol Liquiform Labtest Cat. 76. Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Sobrenadante	-----	0,1 mL	-----
Padrão (nº 2)	-----	-----	0,1 mL
Reagente 1	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e colocar no banho-maria a 37 °C durante 10 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível do reagente nos tubos de ensaio. Determinar as absorbâncias do teste e padrão em 500 nm ou filtro verde (490 a 540 nm) acertando o zero com o branco. A cor é estável por 60 minutos.

Cálculos

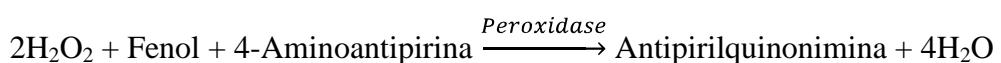
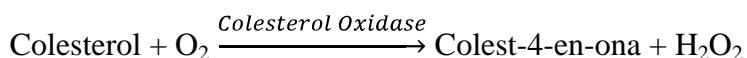
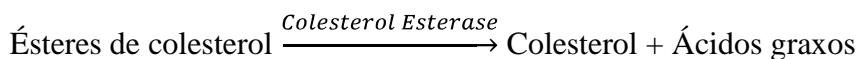
$$\text{HDL mg/dL} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 40$$

Conversão de mg/dL para Unidade SI: mmol/L = mg/dL x 0,026

I.4 - Colesterol Total

Princípio

O colesterol total é determinado de acordo com as seguintes reações:



A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração de colesterol na amostra.

Amostra

O jejum não é imprescindível para a dosagem de colesterol total. Usar soro. Anticoagulantes como citrato, oxalato ou EDTA produzem resultados falsamente diminuídos. O analito é estável por 7 dias entre 2 – 8 °C e vários meses a 10 °C negativos.

Produto Utilizado

Colesterol Liquiform, Catálogo 76-2/100 - ANVISA - 10009010068

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Reagente 1: Armazenar entre 2 – 8°C. Contém tampão 50 mmol, pH 7,0, fenol 24,0 mmol/L, colato de sódio 500 µmol/L, azida sódica 15 mmol/L, 4 aminoantipirina 500 µmol/L, colesterol esterase ≥250 U/L, colesterol oxidase ≥250 U/L e peroxidase ≥1000 U/L.

Padrão 200 mg/dL: Armazenar entre 2 – 8°C. Após o manuseio armazenar bem vedado para evitar evaporação. Contém azida sódica 15 mmol/L.

Equipamentos

1. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorbância em 500 nm ou filtro verde (490 a 510 nm).
2. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 °C).
3. Pipetas para medir amostras e reagentes.
4. Cronômetro.

Procedimento

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	-----	0,01 mL	-----
Padrão (nº 2)	-----	-----	0,01 mL
Reagente 1	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e colocar em banho-maria 37 °C 10 minutos. O nível de água no banho deve ser superior ao nível de reagentes nos tubos de ensaio. Determinar as absorbâncias do teste e padrão em 500 nm ou filtro verde (490 a 510 nm), acertando o zero com o branco. A cor é estável por 60 minutos.

Cálculos

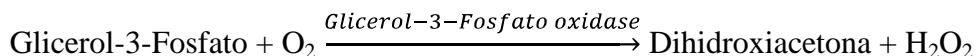
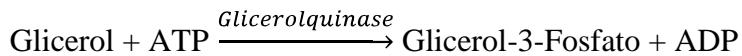
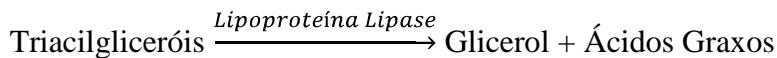
$$\text{Colesterol mg/dL} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 200$$

Conversão de mg/dL para Unidade SI: mmol/L = mg/dL × 0,026.

I.5 - Triacilgliceróis

Princípio

Os Triacilgliceróis são determinados de acordo com as seguintes reações:



A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração de triacilgliceróis na amostra.

Amostra

Jejum de 12 a 14 horas. Usar soro ou plasma com EDTA. O analito é estável por dois dias entre 2 – 8°C. Armazenamento prolongado da amostra não é recomendado, porque várias substâncias podem ser hidrolisadas liberando glicerol, levando à obtenção de resultados falsamente elevados. A heparina promove a ativação in vivo ou in vitro da lipase da lipoproteína, fazendo com que a concentração dos triglicérides se reduza gradativamente em amostras contendo heparina.

Produto Utilizado

Triacilgliceróis Liquiform, Catálogo 87 - ANVISA - 10009010070

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Reagente 1 - Armazenar entre 2 - 8 °C. Contem tampão 50 mmol/L, pH 6,9; acetato de magnésio 4 mmol/L; 4-clorofenol 5 mmol/L; 4-aminoantipirina 300 µmol/L ATP 1,0 mmol/L; lipase da lipoproteína ≥ 1400 U/L; glicerolquinase ≥ 1000 U/L e azida sódica 7 mmol/L.

Padrão - 200 mg/dL - Armazenar entre 2 - 30 °C. Contém triglicérides 200 mg/dL e azida sódica 7 mmol/L. Após o manuseio sugere-se armazenar bem vedado, para evitar evaporação.

Equipamentos

1. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorbância em 505 nm ou filtro verde (490 a 520nm).
2. Banho-maria mantido à temperatura constante (37°C).
3. Pipetas para medir amostras e reagentes.
4. Cronômetro.

Procedimento

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	-----	0,01 mL	-----
Padrão (nº 2)	-----	-----	0,01 mL
Reagente 1 (nº 1)	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e colocar no banho-maria 37 °C por 10 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível do reagente nos tubos de ensaio. Determinar as absorbâncias do teste e padrão em 505 nm ou filtro verde (490 a 520 nm) acertando o zero com o branco. A cor é estável por 60 minutos.

Cálculos

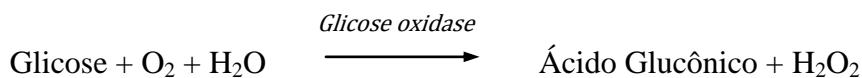
$$\text{Triacilgliceróis (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 200$$

Conversão de mg/dL para Unidade SI: mmol/L = mg/dL × 0,0113

I.6- Glicose

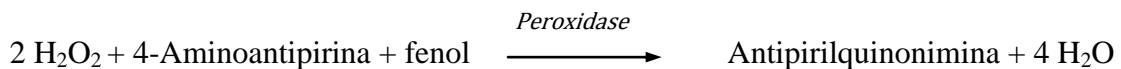
Princípio

A glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose de acordo com a seguinte reação:



O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento, formando

uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra.



Amostra

Glicemia de jejum: recomenda-se jejum mínimo de 8 horas. Usar plasma ou soro. Realizar a colheita do sangue utilizando um anticoagulante contendo um inibidor da glicólise. O uso do anticoagulante Glistab (Labtest cat. 29) permite a colheita de uma só amostra para as dosagens de creatinina, glicose e uréia. As amostras de sangue não contendo antiglicolítico devem ser centrifugadas imediatamente após a colheita e o plasma ou soro separados das células ou coágulo. No líquor e líquidos (ascítico, pleural e sinovial) adicionar anticoagulante contendo antiglicolítico na mesma proporção usada para a amostra de sangue e devem ser centrifugados antes de iniciar a medição. O analito é estável por 8 horas em amostras colhidas com antiglicolítico. No plasma, soro e outros líquidos separados das células, a glicose permanece estável por 3 dias entre 2 – 8 °C, quando não ocorre contaminação bacteriana.

Produto Utilizado

Glicose PAP Liquiform Catálogo 84-2/250, 84-2/500 ANVISA- 10009010003

Labtest Diagnóstica. Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Reagente 1: Armazenar entre 2 – 8 °C.

Contém tampão 50 mmol/L; pH 7,5; glicose oxidase ≥11.000 U/L; peroxidase ≥700 U/L; 4-aminoantipirina ≥290 µmol/L; fenol ≥1 mmol/L e azida sódica 7,5 mmol/L.

Padrão - 100 mg/dL: Armazenar entre 2 – 30 °C. Após o manuseio, sugere-se armazenar bem vedado para evitar evaporação. Contém glicose 100 mg/dL e biocida não tóxico. O estabilizador do padrão pode precipitar-se em baixas temperaturas, fato que não interfere na sua qualidade.

Equipamentos

1. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorbância em 505 nm ou filtro verde (490 a 540 nm).
2. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 °C).
3. Pipetas para medir amostras e reagentes.
4. Cronômetro.

Procedimento

Método Direto

1. Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	-----	0,01 mL	-----
Padrão (nº 2)	-----	-----	0,01 mL
Reagente 1	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

2. Misturar vigorosamente e colocar em banho-maria a 37 °C durante 15 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio.
3. Determinar as absorbâncias do teste e padrão em 505 nm ou filtro verde (490 a 540 nm), acertando o zero com o branco. A cor é estável por 60 minutos.

Cálculos

$$\text{Glicose (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 100$$

Conversão de mg/dL para unidade SI: mmol/L = mg/dL x 0,0556

I.7- Hemoglobina

Princípio

O Fe (II) do heme da hemoglobina, oxihemoglobina e carboxihemoglobina é oxidado para o estado férrico pelo ferricianeto, formando hemiglobina (Hi), que se combina com o cianeto ionizado para produzir cianeto de hemiglobina (HiCN), que é medido em 540 nm.

Amostra

Usar sangue total (citrato, oxalato ou EDTA). O material deve ser processado em 8 horas.

Produto Utilizado

Hemoglobina Catálogo 43 ANVISA - 10009010037
 Labtest Diagnóstica. Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Reagente de Cor (Estoque): Armazenar entre 15 – 25 °C. Não refrigerar. Veneno - manusear com cautela. Contém ferricianeto de potássio 60,7 mmol/L, cianeto de potássio 76,8 mmol/L e surfactante.

Reagente de Cor de Uso: Adicionar o conteúdo de um frasco de Reagente de Cor (10 mL) a 990 mL de água destilada ou deionizada e misturar. Estável 6 meses em frasco âmbar, entre 15 – 25 °C. Não refrigerar. Não armazenar em frasco de plástico.

Equipamentos

1. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorbância em 540 nm ou filtro verde (520 a 550 nm).
2. Pipetas para medir amostras e reagentes.
3. Cronômetro.

Procedimento

1. Tomar um tubo de ensaio e proceder como a seguir:

	Teste
Reagente de Cor de Uso	5,0 mL
Sangue total	0,02 mL

2. Homogeneizar e esperar 5 minutos.
3. Determinar a absorbância do teste em 540 nm ou filtro verde (520 a 550 nm), acertando o zero com água destilada. A cor é estável por várias horas.

Cálculos

Obter o valor em g/dL utilizando o fator de calibração obtido com o Padrão de Hemoglobina- Labtest catálogo 47 (10g/dL).

$$\text{Hemoglobina (g/dL)} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 10$$

Conversão de g/dL para Unidade SI: $\mu\text{mol/L} = \text{g/dL} \times 1,61$

I.8- Hemoglobina glicosilada

Princípio

Glico-Teck Glicohemoglobina baseia-se em princípio inédito na literatura internacional. Segundo este princípio, a determinação do percentual de glicohemoglobina no sangue é feita através da troca catiônica em tubos, sem a necessidade do uso de padrões secundários internos. Baseia-se em dois tubos, um contendo uma suspensão de resina de troca catiônica fraca capaz de ligar todas as frações da hemoglobina exceto as frações glicadas e outro contendo a mesma resina na mesma concentração, mas em condições não ligantes de nenhuma das frações. Após adição de um hemolisado ao primeiro tubo e separação mecânica das frações ligadas e não ligadas, estas últimas contidas no sobrenadante, procede-se à leitura espectrofotométrica desta fração, em 415 nm, que corresponderá à glicohemoglobina. Devido às condições não ligantes da resina, a adição do hemolisado ao segundo tubo fornecerá, após as mesmas operações, uma leitura espectrofotométrica que corresponderá à hemoglobina total. A relação entre as duas leituras fornecerá o percentual de glicohemoglobina na amostra. O hemolisante empregado contém concentrações elevadas de íons borato, visando a eliminação rápida da fração lábil da glicohemoglobina (aldimina).

Amostra

Sangue total colhido com anticoagulante contendo EDTA. Sob refrigeração, a glicohemoglobina no sangue total é estável 5 dias. Caso não seja possível a determinação no mesmo dia da coleta da amostra, deve-se guardar o sangue total ao invés do hemolisado

Produto Utilizado

GLICO-TECK® - GLICOHEMOGLOBINA ANVISA-10377390083

Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda. Rua: Leiria, 1.160. CEP 31255-100. Belo Horizonte - MG – Brasil.

Resina ligante: 25 tubos (tampa vermelha) contendo cada um 2,50 mL de suspensão de resina de troca catiônica fraca, em tampão pH 7,00, ácido bórico 150 mmol/L e azida sódica 0,1 g/dL. Conservar entre 15 e 25°C.

Resina não-ligante: 25 tubos (tampa cinza) contendo cada um 2,50 mL de suspensão de resina de troca catiônica fraca, em tampão pH 8,50 e azida sódica 0,1 g/dL. Conservar entre 15 e 25°C.

Hemolisante: 01 frasco com 14 mL de solução hemolisante em tampão pH 6,90, ácido bórico 1 mol/L, detergente não iônico 0,25%, cianeto de potássio 12 mmol/L e azida sódica 0,1 g/dL. Conservar entre 15 e 25 °C.

Equipamentos

1. Espectrofotômetro
2. Centrífuga
3. Cronômetro
4. Vídraria
5. Pipetas manuais ou automáticas

Procedimento

Adicionar 0,05 mL de sangue total, homogeneizado, a 0,5 ml de Hemolisante (nº 3) em tubo de ensaio 12x75 mm. Homogeneizar bem e aguardar 5 minutos na temperatura ambiente. Se a hemólise for incompleta, centrifugar a 3.000 rpm por 5 minutos e usar o sobrenadante. Tomar um tubo com tampa vermelha contendo a resina ligante e homogeneizar a suspensão por inversão (antes de adicionar o hemolisado) e adicionar 0,1 mL do hemolisado usando pipeta calibrada. Lavar a ponteira da pipeta na resina três vezes. Recolocar a tampa e homogeneizar por inversão (três vezes). Este tubo, contendo a resina ligante, deixará a glicohemoglobina no sobrenadante. Rotular como A1.

Tomar um tubo com tampa cinza contendo a resina não-ligante e homogeneizar a suspensão por inversão (antes de adicionar o hemolisado) e adicionar 0,02 mL do hemolisado usando pipeta calibrada. Lavar a ponteira da pipeta na resina três vezes. Recolocar a tampa e homogeneizar por inversão (três vezes). Este tubo, contendo a resina não ligante, deixará o total de hemoglobina no sobrenadante. Rotular como A2.

A seguir, homogeneizar por inversão, ambos os tubos, durante 5 minutos. Estas homogeneizações não necessitam ser contínuas: é suficiente homogeneizar durante 10 segundos a cada minuto. Alternativamente, os tubos poderão ser homogeneizados em misturadores hematológicos. O tempo de 5 minutos representa o tempo mínimo; tempos maiores não interferem. Centrifugar de 3 a 5 minutos a 3.000 rpm. Retirar os tubos da centrífuga com cuidado para não ressuspender a resina. Alternativamente à etapa de centrifugação, os tubos poderão ser deixados em repouso durante 20 minutos.

Aspirar ou pipetar, usando pipeta automática, 1 mL do sobrenadante dos tubos A1 e A2 diretamente para a cubeta do espectrofotômetro e determinar suas absorbâncias em 415 nm, acertando o zero com água destilada.

Cálculos

% de Glicohemoglobina = (Absorbância A1 ÷ Absorbância A2) x 20,6. O fator 20,6 leva em conta a diferença de alíquotas do hemolisado adicionado aos dois tubos (0,1 mL e 0,02 mL) e também a diferença de volumes finais nos tubos (2,60 mL e 2,52 mL).

I.9- Ferro sérico

Princípio

Em meio ácido o ferro ligado à transferrina se dissocia em íon férrico que é reduzido à forma de íon ferroso por ação da hidroxilamina. Após a adição de Ferrozine® forma-se um complexo magenta brilhante cuja absorbância, medida a 560 nm, é proporcional à quantidade de ferro na amostra.

Amostra

Recomenda-se jejum mínimo de 8 horas. Para controle terapêutico, é aconselhável colher a amostra sempre no mesmo horário, devido a variações diurnas do ferro sérico. Usar soro. O analito é estável por 4 dias entre 15 – 25 °C e por 6 dias entre 2 – 8 °C.

Produto Utilizado

Ferro Sérico Catálogo 38 ANVISA - 10009010014

Labtest Diagnóstica. Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000.

Tampão: Armazenar entre 15 – 25 °C. Contém tampão 250 mmol/L, pH 4,0, ácido mercapto-acético 14 mmol/L, surfactante e estabilizador.

Padrão - 500 µg/dL: Armazenar entre 15 – 25 °C. Após o manuseio sugere-se armazenar bem vedado para evitar evaporação.

Ferrozine ®: Armazenar entre 15 – 25 °C. Contém ferrozine 28 mmol/L e estabilizador.

Equipamentos

1. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorbância em 560 nm ou filtro verde (540 a 580 nm).
2. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 °C).
3. Pipetas para medir amostras e reagentes.
4. Cronômetro.

Procedimento

O material deve ser tratado com solução aquosa de ácido clorídrico 50% (V/V) ou detergente não iônico, lavado com água corrente e enxaguado com água deionizada, para evitar a obtenção de resultados incorretos devido a contaminação com traços de ferro.

1. Tomar 3 cubetas do colorímetro e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Tampão (nº 1)	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Soro (sem hemólise)	-----	0,25 mL	-----
Padrão (nº 2)	-----	-----	0,25 mL
Água destilada ou deionizada	0,25 mL	-----	-----

2. Misturar.
3. Determinar a absorbância do teste em 560 nm ou filtro verde (540 a 580 nm), acertando o zero com o branco. Obtém-se a absorbância A1.

Ferrozine® (nº 3)	0,025 mL	0,025 mL	0,025 mL
-------------------	----------	----------	----------

4. Misturar e incubar em banho-maria a 37 °C por 10 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível dos reagentes no tubo de ensaio.
5. Determinar as absorbâncias do teste e padrão em 560 nm ou filtro verde (540 a 580 nm), acertando o zero com o branco. A absorbância do teste será A2.

Cálculos

$$\text{Ferro sérico } (\mu\text{g/dL}) = \frac{A_1 - A_2}{\text{Absorbância do padrão}} \times 500$$

Conversão de $\mu\text{g/dL}$ para Unidade SI: $\mu\text{mol/L} = \mu\text{g/dL} \times 0,179$

I.10- Capacidade latente de ligação de ferro

Princípio

Um padrão de ferro com concentração conhecida (500 μ g/dL) é incubado com amostra de soro em um tampão de pH 8,3. Ocorre então, a saturação dos sítios disponíveis para o ferro na proteína transportadora (transferrina). O excesso de ferro não ligado é então medido através da formação de um complexo magenta brilhante após a adição de Ferrozine®, permitindo a determinação da capacidade de ligação do ferro.

Amostra

Usar soro (sem hemólise) obtido de jejum. O analito é estável por 4 dias entre 15 – 25 °C e por 6 dias entre 2 – 8 °C.

Produto Utilizado

Capacidade de ligação de ferro Catálogo 41 ANVISA - 10009010013

Labtest Diagnóstica. Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000.

Tampão: Armazenar entre 15 – 25 °C. Contém tampão 500 mmol/L, pH 8,3 e fenoxietanol 7,2 mmol/L.

Padrão - 500 μ g/dL: Armazenar entre 15 – 25 °C. Após o manuseio sugere-se armazenar bem vedado para evitar evaporação.

Ferrozine ®: Armazenar entre 15 – 25 °C. Contém ferrozine 28 mmol/L.

Equipamentos

1. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorbância em 560 nm ou filtro verde (540 a 580 nm).
2. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 °C).
3. Pipetas para medir amostras e reagentes.
4. Cronômetro.

Procedimento

O material deve ser tratado com solução aquosa de ácido clorídrico 50% (V/V) ou detergente não iônico, lavado com água corrente e enxaguado com água deionizada, para evitar a obtenção de resultados incorretos devido a contaminação com traços de ferro.

1. Tomar 3 cubetas do colorímetro e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Tampão (nº 1)	1,5 mL	1,5 mL	-----
Soro (sem hemólise)	-----	0,5 mL	-----
Padrão (nº 2)	-----	0,5 mL	0,5 mL
Água destilada ou deionizada	1,0 mL	-----	2,0 mL

2. Misturar e incubar em banho-maria a 37 °C por 10 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível dos reagentes no tubo de ensaio.
3. Determinar a absorbância do teste em 560 nm ou filtro verde (540 a 580 nm), acertando o zero com o branco. Obtém-se a absorbância A1.

Ferrozine® (nº 3)	1 gota	1 gota	1 gota
-------------------	--------	--------	--------

4. Misturar e incubar em banho-maria a 37 °C por 10 minutos.
5. Determinar as absorbâncias do teste e padrão em 560 nm ou filtro verde (540 a 580 nm), acertando o zero com o branco. A absorbância do teste será A2.

Cálculos

$$\text{CLLF} (\mu\text{g/dL}) = 500 - \left[\frac{A_1 - A_2}{\text{Absorbância do padrão}} \times 500 \right]$$

$$\text{CTLF} (\mu\text{g/dL}) = \text{Ferro sérico} + \text{CLLF}$$

Conversão de $\mu\text{g/dL}$ para Unidade SI: $\mu\text{mol/L} = \mu\text{g/dL} \times 0,179$

I.11 - Grupos Sulfidrilas no soro

Princípio da técnica

Determinação de grupos sulfidrilas totais em amostras biológicas, usando o reagente de Ellman (Ácido 5,5'-Ditio-bis-(2-nitrobenzóico)-DNTB), conforme proposto por Sedlak e Lindsay (1968). Os grupos tióis reagem com DNTB formando um composto colorido, que absorve luz à 412nm.

Reagentes utilizados e forma de preparo

Tampão Tris-HCl, pH = 8,2: Foram dissolvidos 24,22g de Trizma Base (121,1Da) e 8,32g de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA; 416,21Da; 99% m/m) em 800mL de água destilada. O pH foi ajustado em 8,2 usando HCl 3 mol/L. Quantidade suficiente de água destilada foi utilizada para completar o volume final de 1.000mL. A solução final continha 30mmol/L de Trizma Base e 3mmol/L de EDTA. Armazenou-se em temperatura ambiente.

Tampão Tris-HCl, pH = 8,9: Foram dissolvidos 48,44g de Trizma Base (121,1Da) e 8,32g de EDTA (416,21Da; 99% m/m) em 800mL de água destilada. Ajustou-se o pH em 8,9 usando HCl 3 mol/L. Quantidade suficiente de água destilada foi utilizada para completar o volume final de 1.000mL. A solução final continha 30mmol/L de Trizma Base e 3mmol/L de EDTA. Armazenou-se em temperatura ambiente.

Cloreto de Trietanolamina (TEA): Foram dissolvidos 1,33mL de cloreto de trietanolamina (TEA; 185,7Da) e quantidade suficiente de água destilada foi utilizada para completar o volume final de 500mL.

Ácido Tricloroacético (TCA): Foram dissolvidos 10g de ácido tricloroacético (TCA; 163,4Da; 70% m/v; 1,63g/mL) em 70mL de água destilada. Agitou-se e água destilada foi adicionada para completar o volume para 100mL.

Ácido 5,5'-Ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB): Foram dissolvidos 10mg de ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB; Reagente de Ellman; 396,3Da) em 14,71mL de metanol (32,04Da; 0,79g/mL). Este reagente foi preparado no dia da dosagem e é mantido no gelo enquanto usado.

Cisteína estoque: Foram dissolvidos 12mg de cisteína (121,16Da) em volume de TEA suficiente para 5mL. A solução final continha 20mmol/L de cisteína. Este reagente foi preparado no dia da dosagem e mantido no gelo enquanto usado.

Curva padrão para sulfidrila totais

Para determinar a concentração de sulfidrila foi feito um padrão dissolvendo 49,5 μ L de cisteína estoque em 949,5 μ L de TEA. Identificou-se 6 tubos de polipropileno e teve-se o seguinte procedimento:

Conc (μ mol/L)	0	50	100	250	500	1000
Padrão de Cisteína (μ L)	0	25	50	125	250	500
TEA (μ L)	500	475	450	375	250	0

Procedimento de dosagem de sulfidrilas totais

Para cada amostra, adicionaram-se 800 μ L de metanol, 150 μ L de Tris-HCl, pH = 8,2, 50 μ L de DTNB e 40 μ L de amostra (ou da série de padrões). Foi centrifugado à 10000g durante 15 minutos à temperatura ambiente. O ponto de concentração “zero” da curva padrão foi utilizado para zerar o espectrofotômetro e as absorbâncias das amostras foram lidas em 412nm, à 25°C.

Cálculo da concentração de sulfidrilas totais

Foi feito um gráfico expressando a concentração do padrão (Eixo Y) X absorbância do padrão (Eixo X). Após uma regressão linear, foi determinada a equação da reta. Esta equação foi utilizada para determinar a concentração de sulfidrilas totais. Todas as concentrações foram obtidas em μ mol/L.

I.12- Paraoxonase – Atividade Arilesterásica no soro

Princípio da técnica

Determinação da atividade arilesterásica da enzima paraoxonase, usando fenilacetato como substrato, tendo como base a velocidade de hidrólise do fenilacetato, conforme descrito por Eckerson *et al.* (1983) em humanos e também por Beltowski *et al.* (2002) em ratos.

Procedimento de dosagem

Em tubo de ensaio adicionaram-se 2mL de tampão Tris-HCl, 9mmol/L, pH = 8,0 contendo 0,9mmol/L de cloreto de cálcio e 5 μ L de soro. Foi misturado no vórtex e adicionado 0,5mL da solução Tris- fenilacetato (1 μ L de fenilacetato para cada 1500 μ L de TrisHCL 9mM; pH=8,0). Após exatamente 3 minutos, a absorbância foi lida em 270nm. O espectrofotômetro foi zerado com o branco que contém todos os reagentes acima, exceto o soro.

Cálculo da atividade da enzima

Utilizamos a definição para atividade enzimática de acordo com Beltowski *et al.* (2002). Segundo a qual 1U da enzima paraoxonase é equivalente a hidrólise de 1 μ mol de fenilacetato ($\epsilon = 1310 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) por minuto (usualmente a atividade dessa enzima é representada por 1mL de soro). A atividade arilesterásica da enzima foi calculada utilizando:

$$A = C.b.\epsilon$$

Onde:

ϵ – Coeficiente de extinção molar;

b – caminho óptico, igual a 10 mm.

A= absorbância

C= concentração ou atividade enzimática

I.13- Paraoxonase – Atividade Paraoxonásica no soro

Princípio da técnica

Determinação da atividade paraoxonásica, usando paraoxon como substrato, tendo como base a velocidade de hidrólise deste, com a liberação do para-nitrofenol por minuto, conforme descrito por Beltowski *et al* (2002).

Procedimento de dosagem

Inicialmente preparou-se uma solução contendo 9 mL de tampão glicina/NaOH 50mM pH10,5, contendo CaCl₂ 0,9 mM e 2 μ L de paraoxon. Em um tubo de polipropileno adicionaram 780 μ L dessa solução e 20 μ L de soro. A solução foi homogeneizada e lida a absorbância das amostras no espectrofotômetro em 412nm, exatamente à cada minuto, por 3 minutos. O branco (tubo com 780 μ L da solução preparada inicialmente e 20 μ L de água) foi utilizado para zerar o aparelho.

Cálculo da atividade da enzima

Segundo Beltowski *et al* (2002) 1U da enzima paraoxonase é equivalente a hidrólise de 1nmol de paraoxon ($\epsilon = 18290 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) por minuto (usualmente a atividade desta enzima é representada por 1mL de soro). A atividade paraoxonásica da enzima paraoxonase foi calculada da mesma forma que a anterior.

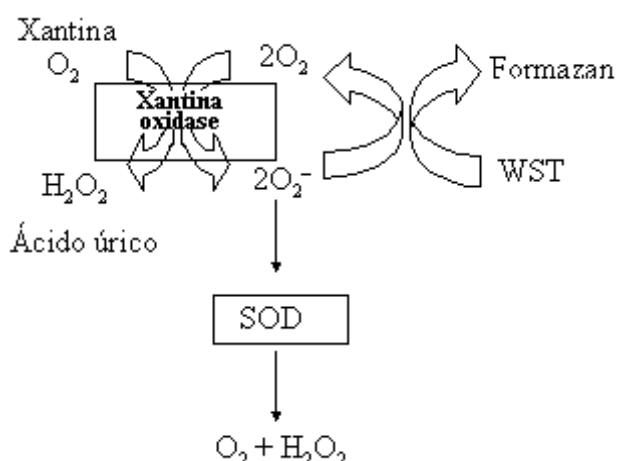
A absorbância utilizada nessa expressão é o delta (absorbância por minuto) obtido das absorbâncias lidas no 1º e 3º minuto, subtraindo a absorbância do terceiro minuto pela

absorbância do primeiro minuto, e dividindo por 2, visto que são 2 minutos entre as duas absorbâncias.

I.14- Superóxido Dismutase no soro

Princípio da técnica

Utilizou-se o kit Fluka # 19160 (USA), que usa um sistema de geração de ânions superóxido, xantina e xantina oxidase, e avalia a capacidade da solução teste, sob condições padrões, em inibir a reação do ânion superóxido com o WST (2-(4 iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio). Esta reação quando ocorrida forma um composto denominado formazan, o qual absorve luz à 450nm (conforme mostra o esquema abaixo).



Preparo dos reagentes

WST – solução de trabalho: Foi diluído 1mL de WST em 19mL de solução tampão.

Solução de enzima de trabalho: Foram diluídos 15µL da solução de enzima com 2,5mL do tampão diluído.

Procedimento de dosagem

Em uma placa de ELISA, procedeu-se a dosagem conforme o quadro abaixo:

	Amostra	Branco 1	Branco 2	Branco 3
1- Amostra	20 µL	-	20 µL	
2- H ₂ O destilada	-	20 µL	-	20 µL
3- WST de trabalho	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
4- Enzima de trabalho	20 µL	20 µL	20 µL	-
5- Tampão diluído	-	-	-	20 µL

Esta placa de ELISA foi incubada por 20 minutos à 37°C e em seguida as absorbâncias das amostras foram lidas à 450nm no leitor de ELISA.

Cálculo da atividade da enzima

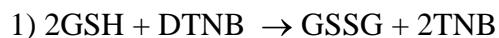
Atividade de SOD (taxa de inibição) = [((A branco 1-A branco 3) – (A amostra – A branco 2))/(A branco 1-A branco 3))*100].

Portanto a atividade da enzima superóxido dismutase foi determinada através da habilidade da SOD contida no soro em inibir a reação do ânion superóxido com o WST.

I.15- Concentração de Glutationa Total no fígado

Princípio da técnica

Utilizou-se o kit Sigma # CS0260. A glutationa está presente nas células principalmente na sua forma reduzida (GSH) representando em torno de 90%, o restante aparece na forma de glutationa oxidada (GSSG). Este kit utiliza um método cinético para mensurar os níveis de glutationa total (GSH+GSSG) em amostras biológicas, através da redução do DTNB (Ácido 5,5'-Ditio-bis-(2-nitrobenzóico) à TNB.



A combinação das duas reações:



Preparo dos reagentes de estoque

Solução de ácido sulfosalicílico (SSA) 5%.

Tampão fosfato 5X (500mM), contendo 5mM EDTA.

Solução padrão estoque de glutationa: 0,3mg de glutationa reduzida em 0,1mL de água destilada.

Solução de estoque de DTNB: 8mg de DTNB foram diluídos em 5,33mL de dimetil sulfosalicílico (DMSO), resultando em uma solução com 1,5mg/mL de concentração.

Estoque de NADPH (solução de 40mg/mL).

Preparação da amostra biológica

100mg de fígado foram homogeneizados com 1mL de ácido de sulfosalicílico 5% (SSA), e em seguida centrifugado a 10000g, por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica.

Preparo dos reagentes de trabalho

Solução de enzimas diluída: Diluir 15,2 μ L de glutationa redutase (100unidades/mL) em 250 μ L de tampão fosfato 1x.

Solução de NADPH de trabalho: Da solução de estoque de NADPH preparada são retirados 30 μ L para 7,5mL de tampão fosfato 1x.

Mistura de trabalho: 8mL de tampão 1x, 228 μ L da solução de enzimas diluída e 228 μ L de DNPH solução de estoque.

Solução padrão de glutationa – preparar para a curva padrão: Diluir 10 μ L de solução estoque de glutationa padrão com 2mL de ácido SSA 5%.

Procedimento para dosagem

A confecção da curva padrão e as dosagens nas amostras foram feitas em placas de Elisa. Os reagentes e a seqüência de adições estão descritas nas tabelas abaixo.

Procedimento para curva padrão

Poço	1	2	3	4	5
[GSH] μM	50	25	12,5	6,25	3,125
Solução de GSH (μL)	50	25(tubo 1)	25(tubo 2)	25(tubo 3)	25(tubo 4)
SSA 5% (μL)	-	25	25	25	25
nmoles de GSH em 10 μL de amostra	0,5	0,25	0,125	0,062	0,0312

Procedimento para o teste

	Amostra	SSA 5%	Mistura de trabalho
Branco	-	10 (μL)	150 (μL)
Padrão (tubos preparados para a curva)	10 (μL)	-	150 (μL)
Amostra	10 (μL)	-	150 (μL)

As amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 50 μL de NADPH foram adicionados às mesmas e o cronômetro disparado. As absorbâncias das amostras foram lidas durante 5 minutos, no leitor de ELISA à 412 nm.

Cálculo da Concentração de glutationa

Foi feito um gráfico utilizando os pontos obtidos na curva padrão (estes pontos obtidos foram o delta das absorbâncias). Após análise de regressão linear, foi determinado a equação da reta. Esta equação foi utilizada para determinar a concentração em nmoles de glutationa total em 10 μL de amostra, e este valor convertido para quantidade de glutationa total no fígado.

I.16- Catalase

Princípio da técnica

Determinação da atividade da enzima catalase, baseado na sua capacidade de converter o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular, conforme descrito por Aebi, (1984).

Preparação da amostra biológica

100mg do fígado ou rim foram homogeneizados com 1mL de tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 e em seguida centrifugado por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica.

Procedimento de dosagem

Em um tubo de polipropileno colocaram-se 50 μ L de tampão fosfato pH 7,2; (0,1mM) e 40 μ L de água destilada, o qual foi mantido em banho maria 30°C por 1 minuto. Em seguida adicionaram-se 10 μ L da amostra e 900 μ L de H_2O_2 (10mM). Homogeneizou-se a solução, o espectrofotômetro foi zerado com H_2O_2 (10mM) em 240nm e determinaram-se as absorbâncias das amostras exatamente a cada minuto, durante três minutos.

Cálculo

1U de catalase é equivalente a hidrólise de 1 μ mol de H_2O_2 ($\epsilon = 39,4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) por minuto (Aebi, 1984). Usualmente a atividade dessa enzima é representada em Unidade por mL de amostra. Calculamos a atividade da catalase segundo utilizando o coeficiente de extinção molar. Em seguida corrigimos a atividade da enzima pela quantidade de proteína dosada pelo método de Lowry descrito posteriormente.

A absorbância utilizada nessa expressão é o delta obtido das cinco absorbâncias lidas (absorbância final –absorbância inicial / 2).

I.17- Proteína Carbonilada

Princípio da técnica

A oxidação de proteína por ROS leva à formação de derivados carbonilados. Estes podem ser mensurados por métodos sensíveis, particularmente aqueles que utilizam o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP). O DNP reage com grupos carbonílicos gerando a hidrazone correspondente, a qual pode ser analisada espectrofotometricamente. A determinação da concentração sérica de proteína carbonilada foi realizada conforme descrito por Levine *et al.* (1994).

Preparação da amostra biológica

200mg do fígado ou rim foram homogeneizados com 1mL de tampão fosfato 50mM, pH: 6,7 contendo EDTA 1mM. Em seguida centrifugado a 10000g, por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica.

Reagentes utilizados e forma de preparo

Ácido Clorídrico 2,5M.

DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina): 0,01g de DNPH foi diluído em 10mL de HCL 2,5M (preparado anteriormente). Obtendo uma solução com 0,1% de DNPH. Esta solução foi estocada no escuro à 4°C. Estável por uma semana.

Solução de TCA (ácido tricloroáctico) 10%

SDS 6% - Dodecil Sulfato de Sódio.

Mistura de etanol e acetato de etila: Em um frasco foi misturado 30mL de etanol e 30mL de acetato de etila. Esta mistura deve ser mantida em geladeira.

Procedimento de dosagem

Para cada amostra utilizou-se dois tubos de polipropileno, um foi denominado de Amostra (A) e outro de Controle (C). Transferiu-se 500µL de homogeneizado de fígado ou rim para cada tudo (amostra (A) / controle (C)). Em seguida foi adicionado aos tubos 500µL de TCA 10% e misturado no vórtex, logo após, foram centrifugados (tubo A e C) à 5000g por 10minutos à 4°C. O próximo passo foi adicionar ao tubo A 500µL de DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) e no tubo C 500µL de HCL à 2,5M. Ambos foram mantidos no escuro à temperatura ambiente por um período de 30 minutos, e a cada 15 minutos eram misturados no

vórtex. Em seguida foi adicionado 500 μ L de ácido tricloroácetico (TCA) 10% em cada tubo, misturado no vórtex e centrifugados à 5000g por 10minutos à 4°C. Depois de centrifugados, o sobrenadante dos tubos foi descartado e 1mL de mistura de etanol com acetato de etila foi adicionado aos tubos e misturados no vórtex. Uma nova centrifugação foi realizada. Em seguida o sobrenadante dos tubos A e C foram descartados e à estes foram adicionados mais 1mL da mistura etanol e acetato de etila, foram misturados no vórtex e novamente centrifugados. No final das centrifugações, o sobrenadante dos tubos A e C foram novamente descartados e adicionado em ambos 1mL de SDS 6%, misturados no vórtex e centrifugados à 10000g por 10minutos à 4°C. Finalmente o sobrenadante dos tubos foram retirados e transferidos para cubeta, onde foram lidos no espectrofotômetro à 370nm.

Cálculo da concentração de proteína carbonilada

A concentração de proteína carbonilada foi determinada utilizando a seguinte equação:

$$A = C.b.\varepsilon$$

Onde A é a subtração da absorbância do tubo A (amostra) pela absorbância do tubo C (controle), C é a concentração, b é o caminho óptico e ε é o coeficiente de extinção molar. O conteúdo de proteína carbonilada foi calculado usando o coeficiente de extinção molar de 22000 M-1 cm-1 e expresso por nmol de proteína carbonilada por mg de proteína.

Para se obter a concentração de proteína carbonilada em relação à concentração de proteínas totais no fígado ou rim, este parâmetro foi determinado pelo método de Lowry (descrito a seguir).

I.18- Proteínas totais em tecidos – método de Lowry

Princípio da técnica

O método de dosar proteína Lowry é um ensaio muito confiável e amplamente usado. Este método foi descrito a primeira vez por Lowry *et al.* (1951). O método de Lowry é baseado nas ligações das proteínas, que em meio alcalino, com os íons cobre (Cu^{2+}) formando uma cor azul que é dependente em partes, do índice de tirosina e triptofano da amostra, já que os íons cobre catalisam a oxidação de aminoácidos aromáticos.

Reagentes utilizados e forma de preparo

Reagente A: Foi dissolvido 0,25g de sulfato de cobre e 0,5 de citrato de sódio em 100 mL de água destilada. A solução foi armazenada, no escuro, em temperatura ambiente.

Reagente B: Foi dissolvido 5g de carbonato de sódio e 1g de hidróxido de sódio em 250mL de água destilada. Foi armazenado a temperatura ambiente.

Reagente C: Foi adicionado 1mL do reagente A em 50mL do reagente B. Preparado na hora do teste.

Reagente D: Foi dissolvido um 1mL de Folin-Ciocateau em 1mL de água destilada. Preparado na hora do teste.

Curva padrão para proteínas totais:

Foram realizados quatro pontos para a curva, pelo seguinte procedimento:

P1- 25 μ L de uma solução estoque de proteínas a 0,2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto foi de 0,05mg/mL.

P2- 7,5 μ L de uma solução estoque de proteínas a 2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto foi de 0,15mg/mL.

P3- 715 μ L de uma solução estoque de proteínas a 2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto foi de 0,35mg/mL.

P4- 25 μ L de uma solução estoque de proteínas a 2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto foi de 0,5mg/mL.

Procedimento de dosagem de proteínas totais:

Em um tudo de polipropileno, foram pipetados 10 μ L de amostra ou padrão e completados para 100 μ L com água destilada. O branco, usado para zerar o espectrofotômetro, foi feito apenas com 100 μ L de água destilada. Posteriormente foi adicionado 1mL do reagente C em todos os tubos. A mistura foi levada ao vórtex e mantida a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado em cada tubo, 100 μ L do reagente D. O volume foi misturado e incubado a temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 660nm.

Cálculo da concentração de proteínas totais no tecido

Foi feito um gráfico expressando a concentração do padrão (Eixo Y) X absorbância do padrão (Eixo X). Após regressão linear, foi determinada a equação da reta com a seguinte característica: Concentração = a X Absorbância + b. Esta equação foi utilizada para determinar a concentração de proteínas totais nos homogenatos de tecidos. Todas as concentrações foram obtidas em mg/mL.

I.19- TBARS

Princípio da técnica

Determinação da concentração de TBARS foi baseada na capacidade do ácido tiobarbitúrico (TBA) em se ligar a lipídeos oxidados, esta dosagem foi realizada conforme descrito por Buege & Aust, (1978).

Preparação da amostra biológica

100mg do fígado ou rim foram homogeneizados com 1mL de tampão fosfato, pH 7,4 e em seguida centrifugado por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica.

Procedimento de dosagem

Em um tubo foi colocado 500 μ L de homogeneizado, 250 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 28% dissolvido em HCl 0,25N, 250 μ L de ácido tiobarbitúrico 1% dissolvido em ácido acético 1:1 e 125 μ L de BHT 5mM dissolvido em etanol. Este tubo foi levado ao vórtex e colocado em um banho maria a 95°C por 15 minutos. Após esse período, este tubo foi centrifugado por 10 minutos a 10000g. O sobrenadante foi lido no espectrofotômetro a 535nm, que foi zerado com água destilada.

Cálculo da concentração de TBARS

A concentração de TBARS foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Usualmente essa concentração é representada em nmoles por mg de proteína.

I.20- Digestão e dosagem de ferro nos tecidos

Princípio da técnica

Usando o método de orto-fenantrolina, de acordo com a AOAC (1980), foi dosado o ferro nos tecidos. Este método se baseia na redução do Fe $^{3+}$ a Fe $^{2+}$ pela hidroxilamina, o qual é associado com orto-fenantrolina que dá cor a amostra correspondente a concentração de ferro.

Digestão do tecido

Amostras de 100mg de fígado foram colocadas em tubos de ensaio, juntamente com 0,5 mL de ácido nítrico concentrado. Em seguida, os tubos foram colocados no digestor Kieldahl a 110°C de modo que ocorresse a digestão dos tecidos e a evaporação total do ácido. Posteriormente o resíduo foi ressuspendido com 2 mL de ácido clorídrico concentrado e transferido esse material para um balão volumétrico, com capacidade para 10 mL e o volume foi completado com água deionizada.

Procedimento de dosagem

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

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)

[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)

[Baixar livros de Literatura Infantil](#)

[Baixar livros de Matemática](#)

[Baixar livros de Medicina](#)

[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)

[Baixar livros de Meio Ambiente](#)

[Baixar livros de Meteorologia](#)

[Baixar Monografias e TCC](#)

[Baixar livros Multidisciplinar](#)

[Baixar livros de Música](#)

[Baixar livros de Psicologia](#)

[Baixar livros de Química](#)

[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)

[Baixar livros de Serviço Social](#)

[Baixar livros de Sociologia](#)

[Baixar livros de Teologia](#)

[Baixar livros de Trabalho](#)

[Baixar livros de Turismo](#)