

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO HUMANA**

**Natália Aboudib Campos**

**O excesso e a deficiência dietética de ferro em ratos senis  
aumentam o estresse oxidativo**

BRASÍLIA  
Distrito Federal - Brasil  
Agosto - 2011

**Natália Aboudib Campos**

**O excesso e a deficiência dietética de ferro em ratos senis  
aumentam o estresse oxidativo**

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília  
como requisito parcial para a obtenção do título de  
mestre em Nutrição Humana. Área de Concentração:  
Bioquímica Nutricional.

Orientadora: Profa. Dra. Egle Machado de Almeida Siqueira.

Co-orientação: Profa. Dra. Sandra Fernandes Arruda.

Brasília, 29 de agosto de 2011

Universidade de Brasília  
Departamento de Nutrição  
Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

Profa. Dra Egle Machado de Almeida Siqueira  
Presidente – Universidade de Brasília (UnB)

Profa. Dra Daniela Mara de Oliveira  
Membro – Universidade de Brasília (UnB)

Profa. Dra Eliana de Cássia Pinheiro  
Membro - Universidade de Brasília (UnB)

Prof. Dr. Fernando Fortes de Valencia  
Suplente – Universidade de Brasília (UnB)

Brasília, 29 de agosto de 2011.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, por tudo o que me deram: apoio, incentivo, amor incondicional... Por terem dedicado tanto tempo de suas vidas à minha formação pessoal e profissional. Devo tudo a vocês!

À minha irmã, pela amizade, amor, companheirismo e confiança.

Aos meus familiares, pelo incentivo e torcida, em especial à Lilian por tantas horas de conversas esclarecedoras.

À minha orientadora Profa. Dra Egle Siqueira e co-orientadora Profa. Dra Sandra Arruda, pelos ensinamentos, dedicação, paciência, profissionalismo e exemplo de amor à pesquisa.

Às minhas queridas amigas do mestrado, por todo apoio, desabafos e carinho. Em especial à Lorena e Azadeh, pelo trabalho em equipe.

Aos funcionários do Laboratório de Biofísica, em especial ao Chiquinho, por toda ajuda e apoio.

À minha psicóloga, Ana Paula Chaves, por toda reflexão e autoconhecimento que ela me proporcionou.

A Deus, pela minha vida e por toda força nos momentos que mais precisei.

## RESUMO

O ferro é um mineral essencial para o organismo humano, porém ele também pode ser extremamente deletério, já que pode catalisar reações de geração de radicais livres. Os radicais livres são capazes de danificar biomoléculas e por isso têm sido associados à promoção de doenças e envelhecimento. Este estudo tem como objetivo avaliar alterações no estado corporal em ferro e estado oxidativo de ratos senescentes em respostas à depleção e suplementação dietética de ferro, bem como comparar os biomarcadores do estado corporal em ferro e estado oxidativo entre ratos jovens e senis. Para tanto, 23 ratos Wistar machos idosos e 6 ratos Wistar machos jovens foram adquiridos. Os ratos senis foram divididos em três grupos: Controle (CT): 35mg de ferro/Kg de ração, Suplementado (SUP): 350mg de ferro/Kg de ração, Deficiente (DEF): 21mg de ferro/Kg de ração e tratados por 78 dias. Os ratos do grupo Jovem (JOV) sofreram aclimatização de um dia e foram sacrificados. Foram avaliados marcadores do estado corporal em ferro: ferro tecidual, ferro sérico, hemácia, hemoglobina, hematócrito, transferrina, saturação de transferrina, capacidade total de ligação do ferro; marcadores de estresse oxidativo: malondialdeído (MDA), proteína carbonilada, gama glutamiltransferase (GGT); atividade específica das enzimas: catalase, glutathione redutase; glutathione peroxidase; glutathione S transferase; NADPH oxidase. Os ratos do grupo DEF apresentaram maior nível de hemoglobina e hematócrito do que o grupo CT, bem como menores níveis de ferro no músculo esquelético em relação ao CT. Nos animais do grupo SUP foi observado aumento dos níveis séricos de ferro em comparação aos grupos CT e DEF, aumento na saturação de transferrina em relação ao DEF, acúmulo de ferro no baço e fígado comparados ao CT e no coração em relação ao DEF. O grupo JOV apresentou maior nível de hemoglobina e hematócrito do que o grupo CT, bem como menores níveis de ferro no baço, fígado e músculo esquelético em relação ao CT. A ingestão dietética de ferro e o fator idade induziram diferentes respostas em cada enzima antioxidante, sendo também observada uma variação de atividade entre os tecidos. O grupo SUP apresentou em todos os tecidos maiores níveis de pelo menos um marcador de estresse oxidativo (MDA ou carbonil) em comparação aos grupos CT e DEF.

No grupo DEF, com exceção do baço e músculo esquelético, foi observado menor dano oxidativo protéico e/ou lipídico nos demais órgãos estudados, comparado aos grupos CT e/ou SUP. Além disso, foram observados maiores níveis de GGT no grupo SUP e níveis menores no grupo DEF. Os ratos do grupo JOV apresentaram menores níveis de danos oxidativos a lipídios no baço, fígado e coração comparados ao CT, porém, no coração e no músculo esquelético foi encontrado um aumento nos danos oxidativos às proteínas e aos lipídios respectivamente. A partir destes dados, podemos concluir que o tanto o excesso e quanto a redução da ingestão dietética de ferro resultam em alterações tecido específica nas atividades de enzimas antioxidantes de ratos senescentes, além de promover o aumento e diminuição respectivamente dos danos oxidativos em ratos senescentes. Também foi observado um maior estresse oxidativo com o envelhecimento.

**Palavras - chave:** ferro, estresse oxidativo, enzimas antioxidantes, marcadores de estado corporal em ferro, envelhecimento, NADPH oxidase.

## ABSTRACT

Iron is an essential mineral for the human body, but it can also be extremely harmful, since it can catalyze the generation of free radicals. Since free radicals are capable of damaging biomolecules, they have been associated to the promotion of disease and aging. This study aims to evaluate changes in body iron and oxidative status of senescent rats in response to dietary iron depletion and supplementation as well as compare biomarkers of body iron and oxidative status between young and senile rats. For this purpose, 23 old male Wistar rats and 6 young male Wistar rats were purchased. The senescent rats were divided into three groups: Control (CT): 35 mg iron / kg feed, Supplemented (SUP): 350mg iron / kg feed; Deficient (DEF): 21mg iron / kg diet) and treated for 78 days. The young rats (YN) were submitted to 1 day of acclimation and then sacrificed. It was evaluated markers of corporal iron state: tissue iron, seric iron, red bloody cell, hemoglobin, transferrin, transferrin saturation, total binding capacity of iron; markers of oxidative stress: malondialdehyde (MDA), protein carbonyl, gamma glutamyl transferase (GGT); activity of specific enzymes, including catalase, glutathione reductase, glutathione peroxidase, glutathione S transferase, NADPH oxidase. DEF group had higher hemoglobin and hematocrit than the CT group, as well as lower levels of iron in skeletal muscle compared to CT. SUP animals showed increased serum iron compared to the CT and DEF groups, increased transferrin saturation in relation to DEF group, iron accumulation in the spleen and liver compared to the CT and in the heart in relation to DEF group. The YN group had a higher level of hemoglobin and hematocrit than the CT group, as well as lower levels of iron in the spleen, liver and skeletal muscle compared to CT. Dietary intake of iron and aging induced different responses in each antioxidant enzyme and a variation of activity between the tissues was also observed. In all tissues the SUP group showed higher levels of at least one marker of oxidative stress (MDA or carbonyl) compared to the CT and DEF groups. In exception of the spleen and skeletal muscle, the DEF group showed less oxidative protein damage and / or lipid damage compared to CT groups and / or SUP. Moreover, we observed higher levels of GGT in the SUP group and lower levels in the DEF group. Comparing to the CT group, the YN rats had

lower levels of oxidative damage to lipids in the spleen, liver and heart, but in heart and skeletal muscle was found an increase of oxidative damage to proteins and lipids respectively. From these data, we conclude that excessive and reduced iron dietary intake result in tissue specific changes in antioxidant enzyme activities, as well as an increase and decrease respectively in oxidative damage in senescent rats. It was also observed an increased oxidative stress with aging.

**Keywords:** Iron, oxidative stress, antioxidant enzymes, markers of body iron status, aging, NADPH oxidase.



## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 2.1: Formação de espécies reativas na cadeia transportadora de elétrons.	20
Figura 2.2: Reação de Fenton.	20
Figura 2.3: O <sub>2</sub> em diferentes estados de energia.	22
Figura 2.4: Formação do radical superóxido	23
Figura 2.5: Produção do peróxido de hidrogênio	23
Figura 2.6: Reação de Haber-Weiss	24
Figura 2.7: Formação de radicais peroxil e alcoxil a partir do ferro	25
Figura 2.8: Produção de superóxido pela NADPH oxidase.	25
Figura 2.9: Reação catalisada pela GGT (1); reações de geração de EROs a partir da cisteinil-glicina (2, 3, 4 e 5).	26
Figura 2.10: Reação catalisada pela catalase.	28
Figura 2.11: Reação catalisada pela glutaciona peroxidase.	28
Figura 2.12: Reação catalisada pela glutaciona redutase.	29
Figura 2.13: Reação catalisada pela glutaciona S transferase.	29
Figure 2.14: Ação conjunta das defesas antioxidantes enzimáticas contra as espécies reativas	30
Figura 2.15: Absorção e metabolismo do ferro dietético.	33
Figura 2.16: Ligação do ferro ao O <sub>2</sub> na hemoglobina e mioglobina.	34
Tabela 5.1: Colunas utilizadas, volume injetado, sensibilidade de detecção e equações obtidas para a determinação das concentrações de MDA em todas as amostras de tecidos dos ratos.	41
Tabela 6.1: Consumo alimentar, ingestão de ferro e variação de peso de ratos idosos tratados com dieta controle, deficiente e suplementada com ferro, por 78 dias.	46
Tabela 6.2: Hemoglobina, hematócrito, ferro sérico, capacidade de ligação do ferro, saturação de transferrina, transferrina e gama glutamiltransferase dos ratos idosos tratados com dieta Controle, Deficiente e Suplementada em ferro e dos ratos jovens.	47
Tabela 6.3: Coeficiente de correlação de Pearson e grau de significância das correlações entre a ingestão de ferro e o estado corporal em ferro em ratos idosos tratados com dieta controle, deficiente e suplementada em ferro.	47
Tabela 6.4: Concentração de ferro nos tecidos dos ratos idosos, tratados com	48

dieta controle, deficiente e suplementada em ferro e ratos jovens ( $\mu\text{gFe/g}$ tecido).	
Figura 6.1: Concentração de carbonil e malonaldeído no baço (A), fígado (B), coração (C), músculo esquelético (D), intestino (E) e rim (F) dos ratos idosos, tratados com dieta controle, deficiente e suplementada em ferro durante 78 dias e ratos jovens.	49
Tabela 6.5: Diferença tecido-específica na atividade das enzimas catalase, glutathiona peroxidase, glutathiona redutase, glutathiona S tranferase e NADPH oxidase de ratos idosos, tratados com dieta controle, deficiente e suplementada em ferro e ratos jovens.	53
Figura 6.2: Atividade específica da catalase (A), glutathiona peroxidase (B), glutathiona redutase (C), glutathiona S tranferase (D) e NADPH oxidase (E) em diferentes tecidos de ratos idosos, tratados com dieta controle, deficiente e suplementada em ferro e ratos jovens.	54
Tabela 6.6: Coeficiente de correlação de Pearson e grau de significância das correlações entre as variáveis que caracterizam o estado corporal em ferro e estado oxidativo no baço de todos os ratos adultos, no final do estudo.	58
Tabela 6.7: Coeficiente de correlação de Pearson e grau de significância das correlações entre as variáveis que caracterizam o estado oxidativo e as defesas antioxidantes no baço de todos os ratos adultos, no final do estudo.	59
Tabela 6.8: Coeficiente de correlação de Pearson e grau de significância das correlações entre as variáveis que caracterizam o estado corporal em ferro e estado oxidativo no fígado de todos os ratos adultos, no final do estudo.	59
Tabela 6.9: Coeficiente de correlação de Pearson e grau de significância das correlações entre as variáveis que caracterizam o estado oxidativo e as defesas antioxidantes no fígado de todos os ratos adultos, no final do estudo.	60
Tabela 6.10: Coeficiente de correlação de Pearson e grau de significância das correlações entre as variáveis que caracterizam o estado corporal em ferro e estado oxidativo no coração de todos os ratos adultos, no final do estudo.	61
Tabela 6.11: Coeficiente de correlação de Pearson e grau de significância das correlações entre as variáveis que caracterizam o estado oxidativo e as defesas antioxidantes no coração de todos os ratos adultos, no final do estudo.	62
Tabela 6.12: Coeficiente de correlação de Pearson e grau de significância das correlações entre as variáveis que caracterizam o estado corporal em ferro e	62

estado oxidativo no músculo esquelético de todos os ratos adultos, no final do estudo.

Tabela 6.13: Coeficiente de correlação de Pearson e grau de significância das correlações entre as variáveis que caracterizam o estado oxidativo e as defesas antioxidantes no músculo esquelético de todos os ratos adultos, no final do estudo. 63

Tabela 6.14: Coeficiente de correlação de Pearson e grau de significância das correlações entre as variáveis que caracterizam o estado corporal em ferro e estado oxidativo no intestino de todos os ratos adultos, no final do estudo. 63

Tabela 6.15: Coeficiente de correlação de Pearson e grau de significância das correlações entre as variáveis que caracterizam o estado oxidativo e as defesas antioxidantes no intestino de todos os ratos adultos, no final do estudo. 64

Tabela 6.16: Coeficiente de correlação de Pearson e grau de significância das correlações entre as variáveis que caracterizam o estado corporal em ferro e estado oxidativo no rim de todos os ratos adultos, no final do estudo. 65

Tabela 6.17: Coeficiente de correlação de Pearson e grau de significância das correlações entre as variáveis que caracterizam o estado oxidativo e as defesas antioxidantes no rim de todos os ratos adultos, no final do estudo. 66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$A_{nm}$ : absorvância

ATP: trifosfato de adenosina

CAT: Catalase (**EC** 1.11.16)

CDNB: conjugado de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

CT: grupo controle

CTLF: capacidade total de ligação de ferro

°C: graus Celsius

DEF: grupo deficiente

DMT1: transportador de metal divalente

DNA: ácido desoxirribonucléico

DNFH: 2,4-dinitrofenil-hidrazina

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

EROs: espécies reativas de oxigênio

FAD: flavina adenina dinucleotídeo

$Fe^{2+}$ : ferro ferroso

$Fe^{3+}$ : ferro férrico

FT: ferro tecidual

FS: ferro sérico.

GGT: gama-glutamil transferase (**EC** 2.3.2.2)

GPx: glutathiona peroxidase (**EC** 1.11.1.9)

GPx-1: glutathiona peroxidase citosólica

GPx-2: glutathiona peroxidase intestinal

GPx-3: glutathiona peroxidase plasmática

GPx-4: glutathiona peroxidase fosfolipídio hidroperóxido

GR: glutathiona redutase (**EC** 1.8.1.7)

GSH: glutathiona reduzida

GSSG: glutathiona oxidada

GST: glutathiona S transferase (**EC** 2.5.1.18)

Hb: hemoglobina

HCl: ácido clorídrico

HCP: proteína carreadora de heme 1

Hem: Hemácia

$HNO_3$ : ácido nítrico

HO• ou  $\cdot\text{OH}$ : radical hidroxil  
HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Performance  
Ht: hematócrito  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio  
H<sub>2</sub>O: molécula da água  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: ácido sulfúrico  
IRE: elemento responsivo ao ferro  
IRP1: proteínas reguladoras do ferro 1  
IRP2: proteínas reguladoras do ferro 2  
JOV: grupo jovem  
MDA: malondialdeído  
min: minuto  
mRNA: RNA (ácido ribonucléico) mensageiro  
NaOH: hidróxido de sódio  
NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida  
NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida  
Nox: NADPH oxidase (**EC** 1.23.45.3)  
O<sub>2</sub>: molécula de oxigênio  
O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: superóxido  
<sup>1</sup>O<sub>2</sub>: Oxigênio singleto  
PA: puro para análise  
PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil  
p/v: peso por volume  
RPM: rotação por minuto  
RO<sub>2</sub><sup>•</sup> ou ROO<sup>•</sup>: Radical peroxil  
RO<sup>•</sup>: radical alcoxil  
SOD: superóxido dismutase  
SPSS: Statistical Packge for Social Sciences  
ST: saturação de transferrina  
SUP: grupo suplementado  
TBA: ácido tiobarbiturico  
TBA-MDA: complexo ácido tiobarbiturico e malondialdeído  
TCA: ácido tricloroacético  
Transf: transferrina

Trf:: receptor de transferrina

UTR: região não traduzida (Untranslated Region)

W: watt

SUMÁRIO	
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xii
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. Radicais livres, Espécies Reativas e Estresse oxidativo	19
2.1.1. Espécies reativas de oxigênio	20
2.1.1.1. Oxigênio singlete	21
2.1.1.2. Radical Superóxido	22
2.1.1.3. Peróxido de Hidrogênio	23
2.1.1.4. Radical hidroxil	23
2.1.1.5. Radicais peroxil e alcoxil	24
2.2. NADPH oxidase	25
2.3. Gama-glutamil transferase	25
2.4. Defesas antioxidantes	26
2.4.1. Catalase	27
2.4.2. Glutaciona peroxidase	28
2.4.3. Glutaciona redutase	28
2.4.4. Glutaciona-S-transferase	29
2.5. Ferro	30
2.5.1. Metabolismo do ferro	31
2.5.2. Ferro e estresse oxidativo	33
2.6. Envelhecimento	35
3. OBJETIVOS	36
3.1. Objetivos gerais	36
3.2. Objetivos específicos	36
4. HIPÓTESE	37
5. MATERIAIS E MÉTODOS	38
5.1. Animais	38
5.2. Tratamento	38
5.3. Determinação da Concentração de ferro nas dietas e nos	39

tecidos	
5.4. Determinação dos indicadores de estresse oxidativo	39
5.4.1. Peroxidação Lipídica	39
5.4.2. Oxidação Protéica	41
5.4.3. Determinação de Proteína Total	42
5.4.4. Determinação da Atividade Específica de Enzimas	42
Antioxidantes	
5.4.4.1. Preparação do Homogeneizado para as análises enzimáticas	43
5.4.4.2. Ensaio de Catalase (CAT)	43
5.4.4.3. Ensaio de Glutathione Peroxidase (GPx)	43
5.4.4.4. Ensaio de Glutathione Redutase (GR)	44
5.4.4.5. Ensaio de Glutathione-S-transferase (GST)	44
5.4.4.6. Ensaio da NADPH oxidase	45
5.5. Análises Estatísticas	45
6. RESULTADOS	46
7. DISCUSSÃO	67
8. CONCLUSÃO	74
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76



## 1. INTRODUÇÃO

O ferro é um dos minerais mais abundantes do planeta, sendo necessário para todas as células aeróbicas (FURUYAMA et al., 2007; MONSEN, 1999). Este íon participa de inúmeras funções fisiológicas como transporte de oxigênio, síntese de DNA, desenvolvimento e função cognitiva, imunidade, funções tireoidianas, transporte de elétrons, entre outras (GANZ, 2009; SOLIMAN et al., 2009; ZIMMERMANN, 2006). A carência de ferro resulta em conseqüências diversas, sendo a anemia a deficiência mais conhecida e comum.

Apesar de essencial para o organismo humano, o ferro pode ser extremamente danoso, uma vez que este íon apresenta capacidade oxidadora, participando de reações que culminam na produção de radicais livres (INLAY, 2003). Estudos mostram que os radicais livres são capazes de danificar biomoléculas, alterando suas funções e levando ao envelhecimento (INLAY, 2003; FINKEL et al., 2000; HARMAN, 1956).

O envelhecimento é um processo de mudanças deletérias em diferentes órgãos e sistemas. Um dos mecanismos propostos como causa deste processo fisiológico é o dano oxidativo a biomoléculas, causado pelos radicais livres (LIU et al., 2006; VALKO et al., 2006; TIAN et al., 1998). Dentro deste contexto que suporta a “teoria dos radicais livres” como causa do envelhecimento (HARMAN, 1956), o ferro apresenta um importante papel na geração de radicais livres altamente reativos. Sua participação na Reação de Fenton resulta na geração do radical hidroxil, uma molécula com alta reatividade. Desta forma, o ferro tem sido associado ao envelhecimento e ao desenvolvimento de diversas doenças degenerativas como Alzheimer, Parkinson, diabetes, degeneração macular, doenças cardiovasculares (CHEN et al., 2009; KILLILEA et al., 2003; CRICHTON et al., 2002).

Na homeostase, a concentração de ferro intracelular é controlada de forma a manter uma quantidade suficiente para o funcionamento celular e minimizar sua ação pró-oxidante (CHEN et al., 2009). Entretanto, com o envelhecimento, a homeostase do ferro parece ser comprometida, levando ao acúmulo de ferro em diversos tecidos (HAHN et al., 2006; ZECCA et al., 2001).

Acredita-se que o acúmulo deste mineral promova o desenvolvimento de doenças infecciosas, inflamatórias, degenerativas e aceleração do envelhecimento. Massie et al. (1985) propuseram que o acúmulo de ferro em consequência ao envelhecimento é inversamente proporcional a expectativa de vida em algumas espécies. Esta correlação acontece por diferentes mecanismos, entre eles o mais estudado é o dano de tecido por ação de moléculas pró-oxidantes (estresse oxidativo).

Devido à existência destes íons e moléculas capazes de provocarem oxidação nas células e tecidos, os sistemas biológicos desenvolveram, ao longo da evolução, diversos mecanismos de defesas antioxidantes que operam na remoção de espécies reativas de oxigênio (EROs). O organismo dispõe de dois mecanismos antioxidantes: não-enzimáticos (endógenos e dietéticos) e enzimáticos. Dentre os antioxidantes endogenamente produzidos estão as enzimas glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione-S-transferase, catalase, entre outras. A ação conjunta dessas enzimas é responsável por um importante mecanismo de proteção antioxidante nos organismos aeróbicos.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar alterações no estado de ferro e estado oxidativo de ratos senescentes em resposta à depleção e suplementação dietética de ferro, bem como comparar os biomarcadores do estado corporal em ferro e estado oxidativo entre ratos jovens e senis.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Radicais livres, Espécies Reativas e Estresse Oxidativo

Espécies reativas são compostos instáveis, capazes de reagir com outras moléculas, causando danos oxidativos a essas biomoléculas. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são naturalmente produzidas pelo metabolismo de organismos aeróbios. Isso porque, na cadeia respiratória, durante a produção de ATP ocorre a redução completa do  $O_2$  em água. Todavia, cerca de 1 a 4% do oxigênio consumido sofre redução incompleta, o que resulta na formação de intermediários altamente reativos (Figura 2.1), denominados como Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (HERMES, 2004). A produção de EROs também acontece como parte da imunidade inata, para o combate de microorganismos (VALKO et al., 2006), além de ter uma importante função como sinalizador celular (FINDEL et al., 2000). Alguns EROs são radicais livres.

Radical livres são moléculas ou átomos que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital atômico. Os radicais podem ser formados, quando uma molécula não radicalar ganha ou perde um elétron (HALLIWELL et al., 2007). O  $O_2$  dá origem a mais importante classe de espécies radicalares dos sistemas biológicos (VALKO et al., 2006).

Em resposta à formação das EROs durante o metabolismo, os organismos aeróbicos desenvolveram um complexo mecanismo de defesa antioxidante, com uma parte enzimática (enzimas antioxidantes) e uma parte não-enzimática, normalmente vinda da dieta (VALKO et al., 2006). Em circunstâncias normais, os efeitos deletérios causados pelos EROs são controlados por ação dos antioxidantes. O desequilíbrio entre agressores oxidantes e defensores antioxidantes resulta em um processo conhecido como estresse oxidativo (POLLA, 1999).

Outras vias bioquímicas também são responsáveis pela produção de radicais livres, como é o caso da Reação de Fenton (Figura 2.2). Esta reação tem o ferro como elemento limitante e produz o radical hidroxil ( $\cdot OH$ ), uma das espécies mais reativas capaz de produzir danos oxidativos a várias moléculas (HERMES, 2004). Dessa forma, o ferro é potencialmente tóxico, podendo o seu excesso intracelular causar morte da célula.

Figura 2.1: Formação de espécies reativas na cadeia transportadora de elétrons: a adição de 1 elétron ao O<sub>2</sub> origina o íon superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) que, ao reagir com outro elétron e sofrer protonação, gera o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (MARZOCCO et al., 2007).

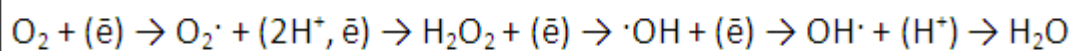
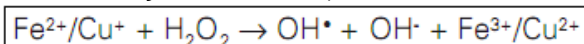


Figura 2.2: Reação de Fenton (HALLIWELL et al., 2007).



### 2.1.1. Espécies reativas de oxigênio

O acúmulo de oxigênio na atmosfera mudou completamente o ambiente primitivo em que habitavam os seres vivos. Esta mudança trouxe inúmeras vantagens, como a utilização do O<sub>2</sub> para aumentar a produção de energia, solubilização e destoxificação de novos compostos, geração de calor e luz, entre outros. Porém, esta molécula, tão vital para os seres aeróbios, pode ser tóxica, dependendo do estado de oxidação que ela se encontra (FRIDOVICH, 1998).

A molécula do oxigênio diatômico (O<sub>2</sub>) tem uma configuração eletrônica única e ela pode ser considerado um radical, já que apresenta dois elétrons desemparelhados na última camada (VALKO et al., 2006). Porém, estes dois elétrons, que encontram-se em orbitais atômicos distintos, apresentam *spins* paralelos, o que torna a molécula estável. Em razão de sua configuração eletrônica, o oxigênio pode agir como um agente oxidante. Entretanto, para o O<sub>2</sub> receber um par de elétrons, estes precisam ter os *spins* paralelos entre si e antiparalelos com os elétrons desemparelhados da molécula de oxigênio. Esta restrição de *spin* faz com que o O<sub>2</sub> receba um elétron de cada vez, diminuindo assim sua velocidade de redução (principalmente com espécies não radicalares). Quando a oxidação acontece com espécies radicalares é possível ter uma reação rápida, mas com a transferência de apenas um elétron por vez (HALLIWELL et al., 2007).

A redução completa do O<sub>2</sub>, que acontece na cadeia transportadora de elétrons por ação da citocromo C oxidase, resulta na formação de 2H<sub>2</sub>O e para isso acontecer é necessário que o oxigênio receba quatro elétrons. Quando o O<sub>2</sub> recebe o primeiro elétron, sua afinidade pelo segundo elétron diminui, facilitando a formação de intermediários pela redução incompleta

desta molécula. Dentre esses intermediários temos: superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxil ( $HO\cdot$ ). São justamente estes intermediários os responsáveis pela toxicidade do oxigênio e eles variam de acordo com seu potencial de causar danos oxidativos (GUARATINI et al., 2007; HALLIWELL et al., 2007; FRIDOVICH, 1998).

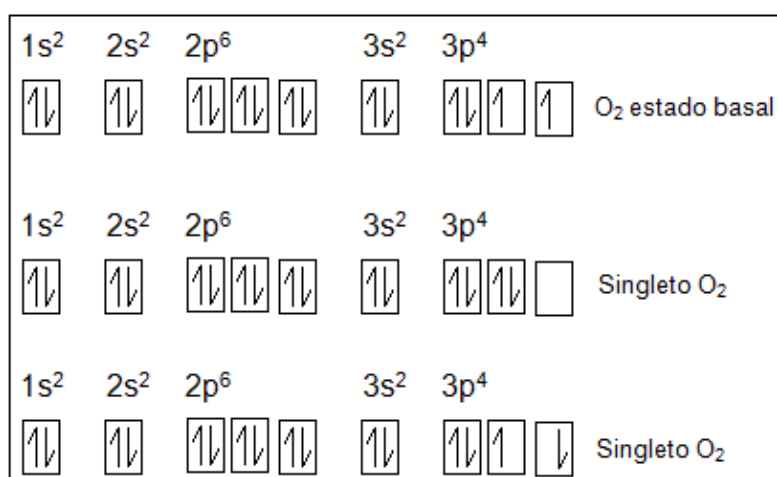
Outro fator que vai interferir na estabilidade e capacidade de reação do oxigênio é a posição de seus *spins*, como no caso do oxigênio singlete que, apesar de ter a mesma fórmula química, apresenta *spins* antiparalelos (HALLIWELL et al., 2007).

Dessa forma, o termo espécie reativa de oxigênio (ERO) engloba as espécies radicalares e não radicalares derivadas do  $O_2$ . Assim, todas as formas radicalares de oxigênio são EROs, porém nem todos os EROs são radicais de oxigênio (HALLIWELL et al., 2007).

#### **2.1.1.1. Oxigênio singlete ( $^1O_2$ )**

Existem dois tipos de oxigênio singlete, os quais são gerados dependendo da quantidade de energia absorvida pela molécula de oxigênio em sua forma mais estável (estado basal). O que difere estas três moléculas ( $O_2$  no estado basal e singletos) é a posição de seus *spins*, como visto na Figura 2.3. As duas formas de oxigênio singlete não apresentam restrição de *spin*, portanto sua capacidade de oxidação aumenta bastante. Isso caracteriza a molécula como a forma mais reativa do  $O_2$ , sendo capaz de inativar proteínas, provocar peroxidação lipídica e danos ao DNA (HALLIWELL et al., 2007).

Figura 2.3: O<sub>2</sub> em diferentes estados de energia (HALLIWELL et al., 2007).



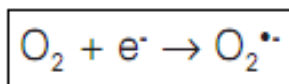
### 2.1.1.2. Radical Superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)

Quando o O<sub>2</sub> no estado basal recebe um elétron forma-se o radical superóxido (Figura 2.4), uma molécula pouco reativa. A baixa reatividade desta molécula aumenta sua meia-vida permitindo que a mesma percorra livremente no corpo, aumentando as chances de oxidar moléculas alvo distante do local onde foi produzido (HALLIWELL et al., 2007; FRIDOVICH, 1998).

A produção de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> em animais aeróbicos dá-se principalmente na cadeia transportadora de elétrons (CTE). Alguns componentes iniciais da CTE podem deixar o elétron escapar, permitindo que ele atinja diretamente uma molécula de oxigênio resultando na formação de superóxido (SABORIDO et al., 2005; MULLER et al., 2000). A taxa de escape de elétrons dependerá de diversos fatores: concentração intramitocondrial de oxigênio; forma como os carreadores de elétrons estão arrumados (devem estar posicionados de forma a facilitar o movimento do elétron para o receptor subsequente); tipo de tecido e espécie (HALLIWELL et al., 2007).

Outras vias também são responsáveis pela produção do superóxido. Dentre elas, o mecanismo utilizado pelas células para fazer o dobramento de proteínas no retículo endoplasmático; o sistema redox presente nas membranas plasmáticas, o qual transfere elétrons do NADH para aceptores externos de elétrons (ex: ascorbato); diversas enzimas, como NADPH oxidase, presente em células fagocitárias, citocromo P450, entre outros (HALLIWELL et al., 2007; GUENGERICH et al., 2001).

Figura 2.4: formação do radical superóxido (HALLIWELL et al., 2007).



### 2.1.1.3. Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

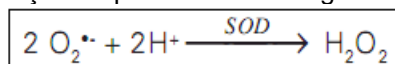
A adição de um elétron e dois íons de hidrogênio ao O<sub>2</sub><sup>•-</sup> resulta na formação do peróxido de hidrogênio. Esta espécie de oxigênio reativa, não radicalar, pode exercer as mais variadas ações, dependendo da sua concentração na célula. Em níveis variando entre 10-100 µM ela pode promover a senescência e apoptose celular, porém, em concentrações menores, ela pode promover a proliferação de alguns tipos celulares (HALLIWELL et al., 2007; BYUNG, 1994).

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode surgir pela ação de diferentes enzimas, principalmente a superóxido dismutase (SOD), que catalisa uma reação de dismutação entre o radical superóxido e íons de hidrogênio (Figura 2.5).

Apesar da baixa reatividade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sua capacidade oxidante é extremamente importante para os sistemas biológicos, já que ele pode implicar na formação de radicais livres extremamente reativos, como o radical hidroxil. Sendo assim, a importância dada à sua ação oxidante é mais por conta de seu papel na produção de radicais livres citotóxicos do que por sua reatividade química (BYUNG, 1994).

Outra característica que reforça a importância biológica desta molécula é sua alta solubilidade em água, o que permite seu livre acesso dentro e entre as células. Esta propriedade explica sua abrangente distribuição *in vivo* (HALLIWELL et al., 2007).

Figura 2.5: produção do peróxido de hidrogênio (BYUNG, 1994).



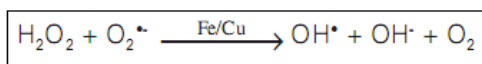
### 2.1.1.4. Radical hidroxil (OH<sup>•</sup>)

O radical hidroxil é o intermediário metabólico do oxigênio mais reativo, apresentando curta meia vida. Este radical livre pode reagir e danificar estruturas moleculares que estejam próximas: proteínas, lipídeos de

membrana, ácidos nucleicos, não havendo enzima capaz de catalisar sua remoção (HALLIWELL et al., 2007).

Este radical é gerado quando o peróxido de hidrogênio recebe um elétron e um íon de hidrogênio. Na célula, inúmeras reações químicas podem dar origem a esta molécula como, por exemplo, a Reação de Fenton, onde um metal de transição na sua forma reduzida ( $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^+$ ) doa um elétron ao peróxido de hidrogênio, resultando na quebra da ligação O-O (Figura 2.2). A produção do radical hidroxil também pode acontecer por uma reação entre o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Reação de Haber-Weiss) catalisada por íons de metais de transição (Figura 2.6) (HALLIWELL et al., 2007; BYUNG, 1994).

Figura 2.6: Reação de Haber-Weiss (HALLIWELL et al., 2007).



#### 2.1.1.5. Radicais peroxil ( $\text{ROO}^{\cdot}$ ) e alcóxil ( $\text{RO}^{\cdot}$ )

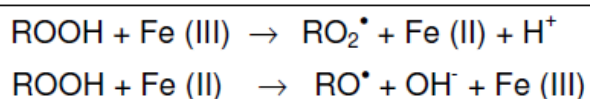
O ataque dos radicais hidroxil e superóxido a carbonos de biomoléculas implica na formação das formas mais simples de radicais alcóxil ( $\text{RO}^{\cdot}$ ) e peroxil ( $\text{ROO}^{\cdot}$ ). A reação entre  $\text{OH}^{\cdot}$  e/ou  $\text{O}_2^{\cdot-}$  com o carbono tem como resultado um carbono radicalar ( $\text{R}^{\cdot}$ ) que, ao reagir com o oxigênio, produz os radicais  $\text{RO}^{\cdot}$  e  $\text{RO}_2^{\cdot}$  (HALLIWELL et al., 2007).

Moléculas orgânicas insaturadas que apresentam uma fraca ligação C – H, como os ácidos graxos insaturados, são mais suscetíveis a sofrerem oxidação por radicais livres (PRATT et al., 2011). A peroxidação lipídica resulta na formação de peróxidos orgânicos ( $\text{ROOH}$ ), usualmente estáveis em temperaturas ambientes. Porém, quando estes compostos são submetidos ao calor, exposição UV ou metais de transição, sofrem decomposição dando origem aos radicais peroxil e alcóxil (Figura 2.7) (HALLIWELL et al., 2007).

Estes radicais são, usualmente, bons agentes oxidantes, sendo os principais responsáveis pela propagação da peroxidação lipídica (HALLIWELL et al., 2007). Eles são capazes de reagir com  $\text{H}^{\cdot}$  de outras moléculas, sendo justamente a presença de átomos de hidrogênio que limita a velocidade da propagação da peroxidação lipídica (PRATT et al., 2011).



Figura 2.7: formação de radicais peroxil e alcoxil a partir do ferro (HALLIWELL et al., 2007).



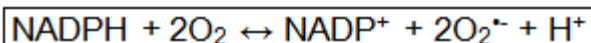
## 2.2. NADPH oxidase

A NADPH oxidase (Nox) é formada por diversas subunidades que resultam em um complexo enzimático. Sua ação oxirredutora utiliza o NADPH como doador de elétron para produção de superóxido (Figura 2.8) (BABIOR, 1999). Dessa forma, ela é fundamental para manter as funções celulares, já que ela faz a modulação de inúmeras vias de sinalização redox-sensíveis através da geração de EROs (BEDARD et al., 2007).

Esta enzima foi, primeiramente, encontrada em células fagocitárias, porém, na última década foram identificadas diversas isoformas, as quais estão presentes em células não-fagocitárias. Aparentemente, a expressão de cada isoforma varia de acordo com o tecido (JIANG et al., 2011).

Diversos fatores estressores podem estimular a ação da NADPH oxidase: metais, como por exemplo, o ferro, radiação ionizante, privação de nutrientes, estímulos inflamatórios endógenos e exógenos (principal forma de ativação da Nox), dentre outros. A resposta da Nox às condições adversas vai desde a ativação de mecanismos que aumentam a tolerância ao estresse, até a remoção por apoptose de células seriamente danificadas (JIANG et al., 2011). Apesar de não se conhecer o exato mecanismo que determina qual destes sinais serão transduzidos, sabe-se que a quantidade e localização da geração de EROs, bem como a disponibilidade de enzimas antioxidantes são determinantes para especificar a resposta da NADPH oxidase ao estímulo (TERADA, 2006).

Figura 2.8: produção de superóxido pela NADPH oxidase.



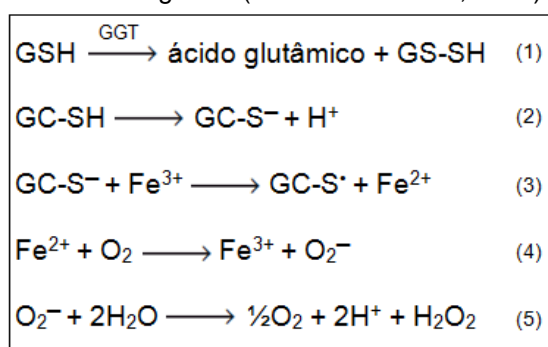
## 2.3. Gama-glutamil transferase (GGT)

A gama-glutamil transferase (GGT) é um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina. Essa enzima de membrana é essencial para o metabolismo da glutatona reduzida (GSH), sendo considerada um marcador

de estresse oxidativo (LIM et al., 2004). Ela catalisa a primeira fase da degradação de GSH extracelular, promovendo a hidrólise da GSH em ácido glutâmico e cisteinil-glicina (Figura 2.9, reação 1). Dessa forma, a GGT fornece substrato para a síntese *de novo* de GSH no interior da célula, sendo assim, tradicionalmente, considerada como um componente do sistema de proteção celular contra o estresse oxidativo (POMPELLA et al., 2007).

Por outro lado, a hidrólise da GSH produz uma molécula mais reativa, a cisteinil-glicina, capaz de fazer a redução do  $\text{Fe}^{3+}$  em  $\text{Fe}^{2+}$  que resultará em maior produção de EROs (Figura 2.10) (STARK et al., 1993). Portanto, a GGT também pode ter um efeito pró-oxidativo na membrana da célula na qual ela está presente, sendo esse efeito necessário para sinalização celular, assim como a NADPH oxidase (DOMINICI et al., 2005; POMPELLA et al., 2007).

Figura 2.9: (1) reação catalisada pela GGT; (2, 3, 4 e 5) reações de geração de EROs a partir da cisteinil-glicina (POMPELLA et al., 2007).



#### 2.4. Defesas antioxidantes

A sobrevivência dos animais que utilizam o oxigênio para produção de energia somente é possível com a essencial ação das defesas antioxidantes. Os antioxidantes podem ser sintetizados *in vivo* ou adquiridos pela dieta (HALLIWELL et al., 2007).

Os organismos aeróbios dispõem de inúmeros mecanismos de defesas antioxidantes. Dentre eles temos os agentes que diminuem a produção de espécies reativas (transferrinas, proteínas de desacoplamento, etc); as proteínas que protegem biomoléculas de danos oxidativos (chaperonas); as moléculas que sofrem oxidação, protegendo o organismo contra danos oxidativos (vitamina C, tocoferol, os carotenóides, bilirrubina, GSH); os agentes que fazem a remoção catalítica das espécies reativas (enzimas

antioxidantes); entre outros. É importante frisar que não existe “o melhor” antioxidante. O antioxidante ideal vai depender do tipo de espécie reativa e de seu alvo (HALLIWELL et al., 2007).

Entre as diversas classes de antioxidantes, os enzimáticos apresentam especial relevância ao presente trabalho. Este mecanismo de defesa engloba as enzimas endogenamente produzidas, as quais trabalham em sinergismo dentro de um sistema balanceado e coordenado (Figura 2.14) (HALLIWELL et al., 2007). Assim, o aumento dos níveis de uma enzima antioxidante, sem que também ocorra aumento dos níveis da enzima que dará continuação à cascata antioxidante implica em menor resistência aos danos oxidativos (HAAN et al., 1996). Isso acontece, pois as próprias espécies reativas, mesmo as intermediárias, podem causar danos às enzimas antioxidantes (LARDINOIS, 1995).

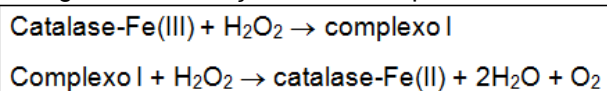
#### **2.4.1. Catalase**

Essa enzima está presente nos peroxissomos das células de quase todos os órgãos do corpo, especialmente no fígado (HALLIWELL et al., 2007), e representa a primeira linha de defesa na destoxificação do peróxido de hidrogênio (YOO et al., 2009). A catalase animal é formada por quatro subunidades protéicas contendo cada subunidade um grupo heme férrico ligado ao seu sítio ativo e uma molécula de NADPH, os quais atuam como cofatores (HALLIWELL et al., 2007). A eliminação do peróxido de hidrogênio por ação da catalase acontece em duas etapas. Na primeira etapa a ferricatalase recebe do peróxido de hidrogênio um átomo de oxigênio, originando o complexo I (Figura 2.10). Na segunda etapa o complexo I reage com outra molécula de  $H_2O_2$ , onde temos a redução do complexo I que dará origem ao complexo II (KIRKMAN et al., 1999) e a decomposição do peróxido de hidrogênio em oxigênio molecular e água, sem que haja a produção de nenhum radical livre (GOYAL et al., 2010).

O gene codificador desta enzima está localizado no cromossomo 11 e mutações deste cromossomo podem resultar em uma condição chamada acatalasemia (HALLIWELL et al., 2007). Estudos mostram que a ausência de catalase não apresenta efeitos clínicos aparentes, porém parece ser fator de risco para o desenvolvimento de diabetes (LEOPOLD et al., 2005), isquemia-

reperfusão e câncer (HO et al., 2004). Provavelmente, a baixa repercussão clínica dá-se pela presença de outras enzimas com capacidade de remover o peróxido de hidrogênio e pela habilidade desta molécula de sair da célula (HALLIWELL et al., 2007).

Figura 2.10: Reação catalisada pela catalase.

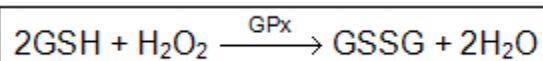


#### 2.4.2. Glutathione peroxidase (GPx)

A família da glutathione peroxidase é formada por, pelo menos, quatro tipos de GPx diferentes, as quais apresentam ações tecido-específicas e diferentes especificidades a substratos: GPx-1 (isoforma mais abundante e encontra-se no citosol), GPx-2 (presente no trato gastrintestinal), GPx-3 (glicoproteína presente em pequenas quantidades no plasma) e GPx-4 (capacidade de atuar em resíduos de lipídeos oxidados na membrana e lipoproteínas) (STEINBRENNER et al., 2009; HALLIWELL et al., 2007).

As GPxs são selênio dependentes, apresentando uma selenocisteína em seu sítio ativo. Sua ação antioxidante é devido à sua capacidade de reduzir peróxidos, como o peróxido de hidrogênio. A reação acontece através da transferência de elétron da glutathione reduzida (GSH) para o peróxido de hidrogênio, formando duas moléculas de água e uma molécula de glutathione oxidada (GSSG), como mostra a Figura 2.11 (STEINBRENNER et al., 2009; HALLIWELL et al., 2007). Assim, tanto a glutathione peroxidase quanto a catalase apresentam uma importante ação na prevenção da reação de Fenton, uma vez que essas enzimas detoxificam o peróxido de hidrogênio, substrato essencial para a reação acontecer.

Figura 2.11: Reação catalisada pela glutathione peroxidase (HALLIWELL et al., 2007).

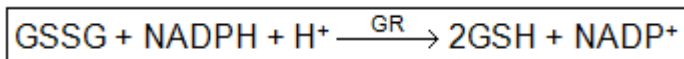


#### 2.4.3. Glutathione reductase (GR)

A ação antioxidante da glutathione reductase é caracterizada por sua capacidade de reduzir a glutathione oxidada (GSSG) (Figura 2.12). Esta enzima é formada por duas subunidades contendo FAD em seus sítios ativos,

os quais recebem os elétrons do NADPH. Os elétrons passam por uma ponte dissulfídica no sítio ativo da GR e formam dois grupamentos –SH, os quais interagem com a GSSG e a reduzem em GSH (HALLIWELL et al., 2007).

Figura 2.12: Reação catalisada pela glutiona redutase (HALLIWELL et al., 2007).



#### 2.4.4. Glutona-S-transferase (GST)

A GST é uma enzima essencial no metabolismo de xenobióticos, onde participa da primeira fase da destoxificação. Ela faz a conjugação de diversos xenobióticos com a GSH (Figura 2.13), permitindo assim a excreção destes conjugados, principalmente pela da bile. Existem diversas isoenzimas da GST, as quais diferem quanto à especificidade pelo substrato. Além de sua atividade catalítica, diversas GSTs funcionam como proteínas intracelulares carreadoras de grupo heme, de bilirrubina, de hormônios tireoidianos, entre outros (HALLIWELL et al., 2007).

Algumas GSTs são capazes de destoxificar peróxidos orgânicos (exceto o  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) através de uma reação muito parecida com a GPx, na qual ocorre a utilização de GSH para formar GSSG e alcoóis. A real importância das GSTs na metabolização dos peróxidos *in vivo* ainda não está completamente esclarecida (HALLIWELL et al., 2007; HAYES et al., 2005).

Em humanos existem polimorfismos que diminuem a atividade de GSTs, resultando em aumento de risco para doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer. Porém, de forma geral, a ausência do gene de diversas GSTs não resulta em fenótipo, o que pode ser explicado pelo aumento da atividade de outras GSTs (HALLIWELL et al., 2007; HAYES et al., 2005).

Figura 2.13: Reação catalisada pela glutona S transferase (HALLIWELL et al., 2007).

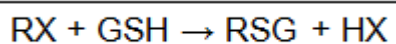
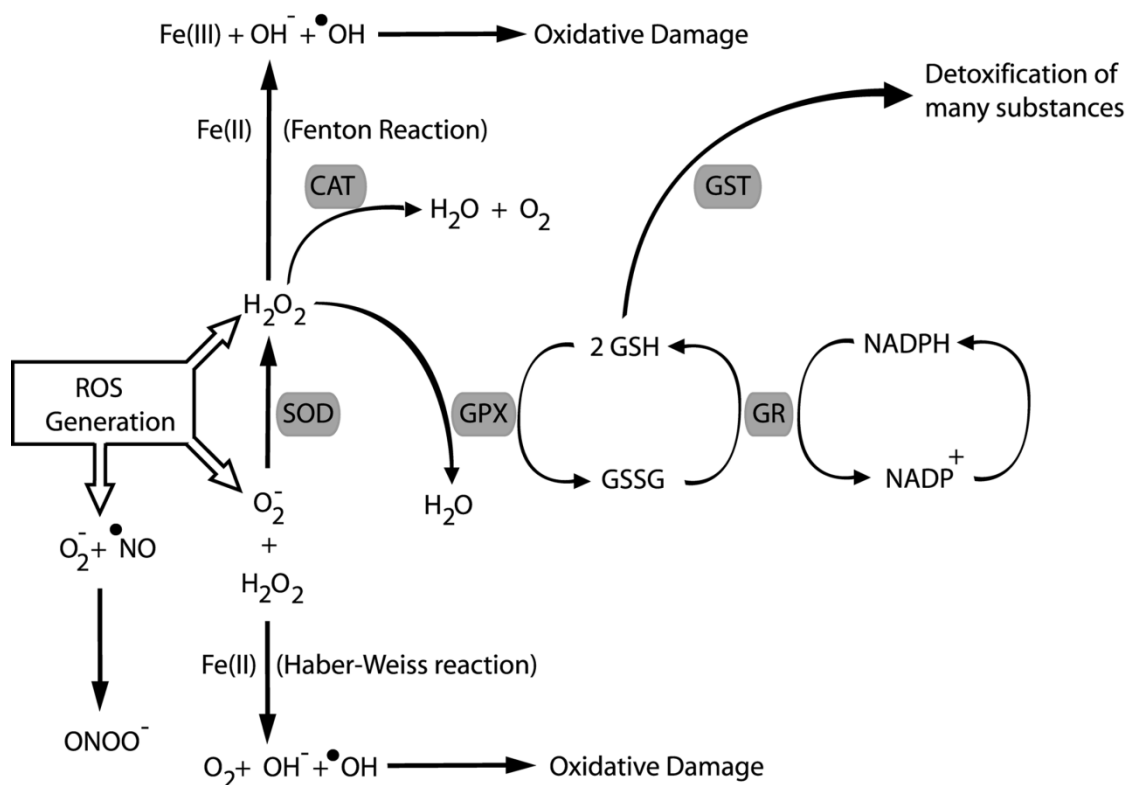


Figure 2.14: Ação conjunta das defesas antioxidantes enzimáticas contra as espécies reativas (HERMES, 2004).



Superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa-S-transferase (GST), glutationa redutase (GR), glutationa peroxidase (GPX).

## 2.5. Ferro

O envolvimento do ferro na formação de radicais livres tem sido amplamente investigado (GALARIS et al., 2008) assim como a perda da homeostase deste mineral em indivíduos senescentes (KILLILEA et al., 2003). Porém os exatos mecanismos moleculares envolvidos neste processo ainda não são conhecidos.

Estudos sugerem que a perda da homeostase do ferro resulta em seu acúmulo em diferentes tecidos (MILMAN et al., 2002), sendo o fígado um dos órgãos mais afetados, pois as células hepáticas representam o principal local de armazenamento deste mineral (SIQUEIRA et al., 2006). Um estudo em ratos senescentes mostrou um aumento da expressão gênica e da síntese de algumas proteínas envolvidas no metabolismo do ferro, como transferrina e ferritina, bem como o acúmulo de ferro no músculo gastrocnêmio (ALTUN et al., 2007). Chen et al. (2008) demonstraram que alterações de moléculas envolvidas no mecanismo regulatório do ferro na retina de ratos senescentes resultou em acúmulo de ferro neste tecido.

Diversos estudos têm associado o acúmulo de ferro ao envelhecimento celular e a processos degenerativos. Nelson (1992) e Babbs (1990) sugeriram o consumo de ferro como o principal fator responsável pelo desenvolvimento de câncer de cólon retal em países com alto consumo de carne. Deugnier et al. (2001) mostraram uma associação entre elevados estoques de ferro e o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. Polla et al. (2003) associam a maior longevidade da mulher, em comparação aos homens, à menstruação e ao parto, onde se tem a perda de grandes quantidades de sangue. Galaris et al. (2008) colocam o ferro livre como sendo o principal catalisador de reações responsáveis pela oxidação de componentes celulares em situações de estresse oxidativo.

### 2.5.1. Metabolismo do ferro

Em função de sua capacidade de óxido-redução, o ferro pode catalisar reações de geração de radicais livres como, por exemplo, a reação de Fenton. Dessa forma, a homeostase do ferro nos mamíferos necessita ser muito bem regulada, e para isso apresenta mecanismos moleculares específicos.

O ferro está presente nos alimentos principalmente na forma férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), porém, para que ocorra sua absorção, ele precisa estar na forma de ferro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Assim, no lúmen intestinal, o  $\text{Fe}^{3+}$  dietético é reduzido a  $\text{Fe}^{2+}$  por meio da ação de enzimas ferro-redutases, como a citocromo B duodenal (Dcytb) (Figura 2.15). O transportador de metal divalente (DMT1) é responsável por seu transporte através da membrana para o interior do enterócito (CRICHTON et al., 2002).

O ferro também pode ser absorvido na forma de ferro heme, porém sua absorção é mais específica, uma vez que não precisa passar por estas etapas, sendo, portanto, absorvido mais facilmente no enterócito (NEMETH et al., 2006). Apesar dos exatos mecanismos envolvidos na absorção do ferro heme ainda não estarem bem esclarecidos (ANDERSON et al. 2009), um transportador de heme presente na borda em escova, a proteína carreadora de heme 1 (HCP1), parece ter participação neste transporte (QIU et al. 2006).

No interior do enterócito este íon entra no *pool* do ferro podendo seguir dois destinos dependendo da demanda corporal de ferro. Quando a demanda

é baixa, ele é incorporado à ferritina ficando assim armazenado no eritrócito. Porém, quando a demanda é alta, o  $\text{Fe}^{2+}$  é oxidado pela hefaestina (uma ferroxidase) em  $\text{Fe}^{3+}$  e incorporado à ferroportina, que faz seu transporte através da membrana basolateral. O  $\text{Fe}^{3+}$  liga-se então à transferrina, que faz seu transporte através do plasma para os tecidos (FRAZER et al., 2003).

Os níveis intracelulares de ferro são regulados por meio de duas proteínas sensíveis ao status deste íon: proteínas reguladoras do ferro 1 e 2 (IRP1 e IRP2) (HENTZE et al., 2004). Estas proteínas se ligam a uma região não traduzida (UTR - Untranslated Region) denominada de elemento responsivo ao ferro (IRE), encontrada no mRNA de algumas das proteínas envolvidas no metabolismo do ferro. O IRE pode estar localizado na extremidade 3' ou 5' do mRNA. Quando a IRP se liga ao IRE localizado na extremidade 5', a tradução dos respectivos mRNAs é bloqueada. Porém, quando a ligação ocorre na extremidade 3', ocorre a estabilidade do mRNA, que é então traduzido (CRICHTON et al., 2002; NEMETH et al., 2006). A literatura apresenta dados que mostram que os mRNAs regulados por IRP/IRE incluem ferritina, receptor de transferrina, ferroportina e DMT-1 (NEMETH et al., 2006).

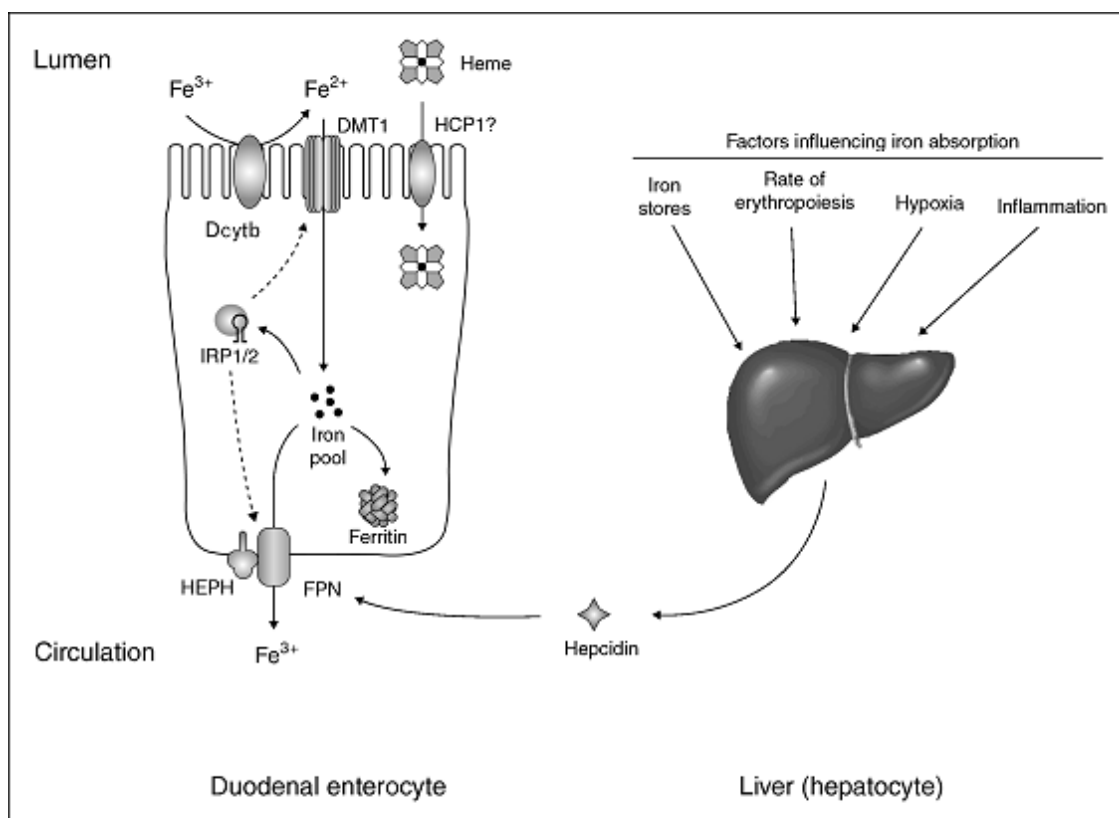
Os níveis corpóreos de ferro são mantidos por meio das regulações de absorção e exportação do ferro nas células, que são mediadas pela hepcidina, um hormônio produzido predominantemente no fígado que, uma vez no plasma, promove a degradação da ferroportina nas membranas dos enterócitos e macrófagos, inibindo assim tanto a absorção intestinal de ferro como a exportação de ferro das células do retículo endotelial, responsáveis pela reciclagem do ferro oriundo das hemácias senescentes (Figura 2.15). Estudos recentes mostram que todos os tecidos podem exportar ferro através da ferroportina (DONAVAN et al., 2005). O nível plasmático de hepcidina é regulado pelo status de ferro, taxa de eritropoiese, hipóxia e citocinas do processo inflamatório (NEMETH et al., 2006).

Em indivíduos senescentes a homeostase do ferro fica comprometida (KILLILEA et al., 2003). Caltagirone et al. (2001) demonstraram, em um estudo *in vitro* com fibroblastos tratados com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que este oxidante foi capaz de alterar a expressão de proteínas do metabolismo do ferro, reduzindo a ferritina intracelular e aumentando a captação de ferro pela célula, via



aumento de receptor transferrina (Trf) e da transferrina. Chen et al. (2009) mostraram em um estudo com ratos jovens e senescentes que o envelhecimento resulta na maior expressão dos genes de ferritina e transferrina com aumento concomitante dos níveis de Trf, ferritina, ferroportina e ceruloplasmina e acúmulo do ferro na retina. Resultado semelhante foi observado por Ma et al. (2009), os quais observaram que a adição de peróxido de hidrogênio a fibroblastos humanos inibiu a atividade de IRP1, o que levou a uma diminuição gradual do receptor de transferrina 1. Dessa forma, o estresse oxidativo resulta em acúmulo de componentes celulares danificados, atrapalhando o funcionamento de diferentes vias de sinalização, promovendo, por exemplo, o acúmulo de ferro. O ferro acumulado promoverá a produção de espécies reativas, resultando em um ciclo vicioso.

Figura 2.15: Absorção e metabolismo do ferro dietético (ANDERSON et al. 2009).



DMT1: transportador de metal divalente; HCP1: proteína carreadora de heme1; Dcytb: citocromo B duodenal; IRP1/2: proteína reguladora do ferro; HEPH: hefaestina; FPN: ferroportina.

## 2.5.2. Ferro e estresse oxidativo

A capacidade redox do ferro está associada à propriedade química deste íon que pode apresentar até seis estados de oxidação. No organismo,

predomina o ferro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), capaz de receber elétrons, e o ferro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), capaz de doar elétrons. Essa característica permite a participação deste mineral em reações de geração de energia, transferindo elétrons de um complexo para o outro, na cadeia transportadora de elétrons, processo que resulta na formação de ATP. Esta propriedade transformou o ferro em um elemento essencial para a maioria dos organismos vivos, entretanto, ao mesmo tempo torna-o deletério aos organismos vivos, posto que o ferro também pode participar de reações formadoras de espécies reativas de oxigênio (EROs) (VALKO et al., 2006).

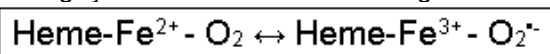
A formação de EROs pode acontecer não apenas pelo ferro livre, mas também pelas hemeproteínas, como hemoglobina e mioglobina. Nestas proteínas, o ferro encontra-se no estado  $\text{Fe}^{2+}$ , capaz de se ligar ao oxigênio. Nessa ligação temos a transferência de um elétron do ferro para o oxigênio (Figura 2.16), resultando na formação do superóxido que, muitas vezes, acaba sendo liberado (MOLLER et al., 2005).

Além disso, quando a hemoglobina ou mioglobina está exposta a altos níveis de peróxido ( $\text{H}_2\text{O}_2$  ou peróxido lipídico) elas são degradadas liberando heme e íons de ferro (NAGABABU et al., 2000). Estas moléculas liberadas podem estimular a peroxidação lipídica e o íon de ferro pode formar  $\text{OH}^{\bullet}$ , a partir do peróxido de hidrogênio (HALLIWELL et al., 2007).

Existem outras formas nas quais o ferro pode promover danos oxidativos. Um exemplo é o acréscimo de lipídeos à hemeproteínas, o que pode promover a decomposição de peróxidos lipídicos preexistentes em radicais alcoxil e peroxil, estimulando, assim, a peroxidação. A participação de íons ferro nas reações de produção de radicais livres faz parte de etapas iniciais de danos oxidativos (HALLIWELL et al., 2007).

É importante ressaltar que não apenas o excesso, mas também a depleção de ferro é ruim. A anemia pode resultar em diminuição da atividade da catalase (YOO et al., 2009), assim como a deficiência celular de heme pode aumentar a produção de EROs mitocondriais (ATAMNA et al., 2001), ambos promovendo o estresse oxidativo.

Figura 2.16: ligação do ferro ao  $\text{O}_2$  na hemoglobina e mioglobina



## **2.6. Envelhecimento**

O envelhecimento pode ser descrito como um declínio progressivo na eficiência das funções fisiológicas. Várias teorias explicando os mecanismos que levam à senescência já foram postulados: teorias genéticas, teorias neuroendócrinas e teorias de acúmulo de danos. Se analisarmos cada uma individualmente, vamos perceber que todas estão interligadas (HALLIWELL et al., 2007).

Dentre estas teorias, uma das mais bem aceitas pelo meio científico é a “teoria dos radicais livres”, proposta por Denham Harman em 1954. Essa teoria sugere um acúmulo de danos por ação de radicais livres produzidos durante o metabolismo aeróbico (HALLIWELL et al., 2007; HARMAN, 2003). Assim, com o envelhecimento temos uma diminuição na atividade de enzimas antioxidantes, decorrente de danos oxidativos, e aumento da produção de oxidantes, em função do declínio das funções mitocondrial e lisossomal (KILLILEA et al., 2003).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivos gerais**

- Avaliar o estado corpóreo em ferro e estado oxidativo de ratos jovens e senescentes e verificar o efeito do teor de ferro dietético nestes estados fisiológicos em ratos senescentes.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Determinar a concentração de ferro tecidual e de marcadores do estado corporal em ferro em ratos senescentes e jovens.
- Verificar o efeito do ferro dietético no consumo alimentar e ganho de peso de ratos jovens e senescentes.
- Determinar os níveis de peroxidação lipídica (concentração de MDA) e de oxidação protéica (concentração de carbonil) em tecidos de ratos jovens e senescentes.
- Determinar a atividade específica de enzimas antioxidantes (catalase, glutathiona redutase, glutathiona peroxidase e glutathiona-S-transferase), da gama glutamiltransferase e da NADPH oxidase em tecidos de ratos idosos e jovens.
- Verificar presença de correlação entre: o teor dietético de ferro, o estado corporal em ferro, os marcadores de danos oxidativos e as enzimas antioxidantes em ratos idosos.
- Comparar o estado corpóreo em ferro, os níveis de danos oxidativos (MDA, carbonil) e a atividade das enzimas antioxidantes entre ratos senescentes e ratos jovens.

#### **4. HIPÓTESE**

Apesar do fino mecanismo de regulação da absorção intestinal do ferro dietético, mediado pelo estado corporal em ferro, a suplementação oral com ferro pode levar ao acúmulo de metal nos tecidos e, conseqüentemente, aumentar os danos oxidativos. O envelhecimento pode estar associado à perda da homeostase do ferro no organismo.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. Animais

Foram adquiridos da empresa Bioagri (Planaltina - Distrito Federal - Brasil), 23 ratos Wistar machos idosos, com cerca de 14 meses de idade, e 6 ratos Wistar machos jovens, com cerca de 2 meses. Os animais idosos foram mantidos em biotério em gaiolas individuais com fotoperíodo de 12/12h de luz e escuridão (18:00h as 6:00h escuridão) a  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Os ratos tinham acesso a dieta no período de 16:00h a 8:00h, e livre acesso à água. Os animais jovens foram adquiridos um dia antes do sacrifício e mantidos nas mesmas condições descritas.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasil, conforme o UnBDOC nº 100.199/2009.

### 5.2. Tratamento

Animais idosos: após o desmame destes animais, eles foram mantidos com dieta comercial (ração para ratos LABINA - marca PURINA) até o início da intervenção. Para iniciar o estudo, os animais foram aleatoriamente distribuídos em três grupos e tratados por 78 dias com uma das seguintes dietas:

- Controle (CT) (n = 7 animais): dieta AIN-93M (35 mg de ferro/Kg de ração) (REEVES et al., 1993).
- Suplementado (SUP) (n = 8 animais): dieta AIN-93M + 315 mg de ferro/Kg de ração. Esta quantidade de ferro representa 10 vezes a recomendada (AIN-93M).
- Deficiente (DEF) (n = 5 animais): dieta AIN-93M, deficiente em ferro (21 mg de ferro/Kg de ração). A quantidade de ferro deste grupo corresponde a uma redução de 60% do ferro presente na AIN-93M, dieta padrão onde se tem a quantidade de ferro recomendada para roedores.

Animais jovens: foram aclimatizados por um dia recebendo ração para ratos LABINA da marca PURINA.

### **5.3. Determinação da concentração de ferro nas dietas e nos tecidos**

A determinação da concentração de ferro nas dietas (comercial, controle, suplementada e deficiente) e nos tecidos (baço, fígado, coração e músculo esquelético) foi feita segundo o método descrito por Baranowska et al. (1995) com modificações. Brevemente, pesou-se aproximadamente 0,1 g de tecido ou de dieta para determinação da concentração de ferro. A porção previamente pesada foi colocada em cápsula de digestão onde adicionou-se 5 mL de HNO<sub>3</sub> PA (Sigma Aldrich®, Alemanha), e 2,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> PA (Sigma Aldrich®, Alemanha). Para a digestão das amostras, as cápsulas foram colocadas em forno microondas (DGT 100 Plus - Provecta Analítica) e submetidas ao seguinte programa: 5 min a 330W; 6 min a 700W ; 1 min a 800W; 20 min a 0W (resfriamento). Após a digestão, as amostras foram colocadas separadamente em balão de 25 mL e o volume completado com HNO<sub>3</sub> 0,1 mol/L (Sigma Aldrich®, Alemanha). As amostras foram filtradas em papel de filtro quantitativo faixa preta e armazenados em tubos a 4°C. A concentração de ferro foi determinada por Espectroscopia de Emissão Atômica (ICP-AES-Shapes-Spectroflame Modulates – Spectro Analytical Instruments - Kleve-Germany) induzido por plasma, tendo como fonte de excitação o gás argônio. Todas as vidrarias utilizadas nas análises foram previamente colocadas em HCl 10% (Sigma Aldrich®, Alemanha) por 3 horas, e posteriormente lavadas com H<sub>2</sub>O deionizada (sistema Milli-Q, Millipore Corporation).

### **5.4. Determinação dos indicadores de estresse oxidativo**

#### **5.4.1. Peroxidação Lipídica**

A determinação dos níveis de peroxidação lipídica foi feita por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) nos tecidos: baço, fígado, coração, músculo esquelético, intestino e rim, conforme o método de Candan e Tuzmen (2009), modificado por nós. Brevemente, cerca de 0,1 g de tecido foi homogeneizado em ácido sulfúrico 1% (Vetec®, Brasil), com diluição final de tecido : solução de 1:10 (p/v) utilizando homogeneizador elétrico Ultraturrax (Ultra-Turrax T8, IKA®- Werke, Alemanha). Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado a 13.000 rotações por minuto (rpm), a

temperatura de 4°C, por 15 minutos. Do sobrenadante do homogeneizado foi retirada uma alíquota para determinação de proteína total. Um volume de 250 µL deste homogeneizado foi adicionado a 375 µL de ácido fosfórico (440 mmol/L) (Vetec®, Brasil) e 125 µL de ácido tiobarbitúrico (42 mmol/L) (Sigma Aldrich®, Alemanha). A mistura foi então aquecida por 1 hora a 100°C em banho-maria para formação do complexo ácido tiobarbiturico e malondialdeído (TBA-MDA). Após resfriamento das amostras, retirou-se uma alíquota de 500 µL a qual acrescentou-se 500 µL de solução metanol (pureza HPLC, Sigma Aldrich®, Alemanha): hidróxido de sódio 1 mol/L (Vetec®, Brasil) (91:9 v/v). As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm, em temperatura de 4°C, por 5 minutos, o sobrenadante foi filtrado em filtro de membrana de nylon (0,45 µm e 13 mm de diâmetro) (Millipore), e aplicadas em sistema HPLC (Shimadzu) utilizando-se coluna Shim-park C18 CLC-ODS(M) 15 cm (para fígado, baço, intestino e músculo esquelético) ou coluna Shim-park C18 CLC-ODS(M) 25 cm (para coração e rim). A leitura foi realizada em detector de fluorescência, com comprimento de onda de excitação de 553 nm e a emissão monitorada a 532 nm. O volume de amostra injetado foi de 20 e 50 µL de acordo com o tecido. A eluição do complexo MDA-TBA foi realizada utilizando como fase móvel metanol pureza HPLC (Sigma Aldrich®, Alemanha) : tampão fosfato 50 mmol/L (Sigma Aldrich®, Alemanha), na proporção de 60:40, com fluxo mantido em 0,6 mL/min, temperatura de 30°C, e tempo de eluição de 6 minutos (para coluna de 15 cm) e 9 minutos (para coluna de 25 cm) por amostra. Foram obtidas quatro diferentes curvas padrões (Tabela 3.1), conforme a sensibilidade da detecção do equipamento, bem como a quantidade do volume injetado. As curvas padrões de MDA foram feitas a partir da hidrólise do composto 1,1,3,3-tetraethoxy-propano 97% (Sigma Aldrich®, Alemanha) em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% (Vetec®, Brasil) e diluído em água para obtenção das seguintes concentrações: 0,101; 0,202; 0,404; 0,808; 2,02; 4,04 nmol/mL. As soluções padrões foram mantidas a temperatura ambiente por duas horas, e em seguida foram submetidos ao mesmo protocolo descrito anteriormente para os homogeneizados de tecido. A concentração de MDA foi expressa em nmol de MDA por mg de proteína total. A concentração de proteínas totais dos homogeneizados de tecidos utilizados para as dosagens MDA foi determinada



pelo método de Lowry et al. (1951) modificado por Hartree (1972) e será descrita a abaixo.

Tabela 5.1: Colunas utilizadas, volume injetado, sensibilidade de detecção e equações obtidas para a determinação das concentrações de MDA em todas as amostras de tecidos dos ratos.

Coluna	Volume	Sensibilidade	Equação
Shim-park C18 CLC-ODS(M) 15 cm	20 uL	Alta	$y = 7 \cdot 10^{-7} x - 0,132$ $r^2 = 0,9903$
Shim-park C18 CLC-ODS(M) 15 cm	50 uL	Baixa	$y = 1 \cdot 10^{-5} x + 0,0375$ $r^2 = 0,9915$
Shim-park C18 CLC-ODS(M) 15 cm	50 uL	Alta	$y = (7 \cdot 10^{-7} x - 0,132) / 2,5$
Shim-park C18 CLC-ODS(M) 25 cm	50 uL	Baixa	$y = 7 \cdot 10^{-6} x + 0,0473$ $r^2 = 0,9974$

#### 5.4.2. Oxidação Protéica

Baseando-se na reação da 2,4-dinitrofenilhidrazina com o grupo carbonil, os quais formam um complexo que é absorvido a 376 nm, é possível determinar, por espectrofotometria, a concentração de proteína carbonilada em tecidos, segundo Richert et al. (2002). Brevemente, cerca de 0,1 g de amostras de baço, fígado, coração, músculo esquelético, intestino e rim foram homogeneizadas em tampão Tris HCl 25 mmol/L (Vetec®, Brasil) contendo uréia 6 mol/L (pH 9,0) (Vetec®, Brasil) obedecendo uma proporção de 1:20 (p/v). Alíquotas de 200 µL do homogeneizado foram transferidas para três diferentes tubos eppendorfs onde se adicionou 200 µL de ácido tricloroacético 20% (TCA) (Dinâmica®, Brasil), responsável pela precipitação das proteínas. Os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm / 5 min, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspendido em 200 µL do tampão de homogeneização. Em dois dos tubos eppendorfs foi adicionado 700 µL de 2,4-dinitrofenil-hidrazina 0,2% (DNFH) (Sigma Aldrich®, Alemanha) em HCl 2 mol/L (amostras), enquanto no terceiro tubo pipetou-se 700 µL de HCl 2 mol/L (Vetec®, Brasil), utilizado como branco. Os tubos foram novamente centrifugados por 15 min a 4°C e ao pellet adicionou-se 700 µL de TCA 20% (Dinâmica®, Brasil), o qual sofreu nova centrifugação (13.000rpm / 5 min). Novamente descartou-se o sobrenadante, o precipitado de proteína foi lavado por três vezes utilizando 1 mL de solução de acetato de etila (Sigma Aldrich®,

Alemanha) : etanol (Synth®, Brasil) (1:1) e com posterior centrifugação. Após 15 minutos, o precipitado foi dissolvido em 500 µL de tampão fosfato de potássio 500 mmol/L (pH 2,5) (Sigma Aldrich®, Alemanha) contendo guanidina 6M (Invitrogen®, EUA) e, após centrifugação por dois minutos a 13.000 rpm, incubou-se a 4°C por 30 min sob agitação. A absorbância foi então lida a 376 nm em espectrofotômetro (Shimadzu – TCC 240A). A concentração de proteína carbonilada foi expressa em nmol de carbonil por mg de proteína total, utilizando-se um coeficiente de extinção molar do complexo carbonil - dinitrofenil-hidrazina de 22.000 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> a 376 nm. A determinação de proteína total foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951) modificado por Hartree (1972).

#### **5.4.3. Determinação de Proteína Total**

A concentração de proteínas totais no sobrenadante dos homogeneizados dos tecidos utilizados foi determinada pelo método de Lowry modificado por Hartree (1972). Brevemente, pipetou-se 20 µL de homogeneizado de tecido em eppendorf contendo 980 µL de tampão fosfato de potássio 0,5 mmol/L, pH 7,2 (Sigma Aldrich®, Alemanha). Deste homogeneizado diluído retirou-se uma alíquota de 150 µL ou 200 µL, conforme o tecido, e adicionou-se 1 mL de uma solução contendo carbonato de sódio 2% (Synth®, Brasil) em NaOH 0,1mol/L (Vetec®, Brasil), tartarato de sódio e potássio 1% (Proquímios®, Brasil) e sulfato de cobre 1% (Reagen®, Brasil) (100 : 1 : 1) e as amostras foram então misturadas com a utilização de Vórtex. Nos tecidos onde foram utilizados apenas 150 µL de homogeneizado o volume foi completado para 200 µL. Após 10 minutos, acrescentou-se 100 µL de Folin (Sigma Aldrich®, Alemanha) diluído em água milli-Q (sistema Milli-Q, Millipore Corporation) (1:1), as amostras foram misturadas e aguardou-se a reação por 20 minutos. Todas as amostras foram feitas em triplicatas e as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro (Shimadzu – TCC 240A) no comprimento de onda de 660 nm.

#### **5.4.4. Determinação da Atividade Específica de Enzimas Antioxidantes**

#### **5.4.4.1. Preparação do Homogeneizado para as análises enzimáticas**

A preparação do homogeneizado foi feita segundo Joanisse e Storey (1996). Amostras de baço, fígado, coração, músculo esquelético, intestino e rim foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 0,5 mmol/L (pH 7,2), contendo EDTA 50 mmol/L (Reagen®, Brasil) e fluoreto de fenilmetilsulfonil 1 mmol/L (PMSF) (Sigma Aldrich®, Alemanha). A homogeneização foi feita obedecendo a uma proporção tecido : solução de 1:20 (p/v), a 4°C e utilizando homogeneizador Ultraturrax (T8 IKA). O homogeneizado foi posteriormente centrifugado a 13.000 rpm por 20 min em temperatura de 4°C e o sobrenadante utilizado para determinação de atividade enzimática e dosagem de proteínas totais.

#### **5.4.4.2. Ensaio de Catalase (CAT)**

Este ensaio foi realizado avaliando-se o consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela catalase por espectrofotometria (espectrofotômetro Shimadzu – TCC 240A) ( $A_{240\text{nm}}$ ) em 15 segundos, conforme Joanisse e Storey (1996). Para tanto foi utilizado um sistema contendo 10 µL de homogeneizado dos tecidos (baço, fígado e rim), 50 µL (coração), 125 µL (intestino) ou 200 µL (músculo esquelético), tampão fosfato de potássio 50 mmol/L, pH 7,2 (Sigma Aldrich®, Alemanha) com EDTA 0,5 mmol/L (Reagen®, Brasil) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mmol/L (Merck®, Alemanha), concentrações finais. A atividade enzimática foi calculada por meio do coeficiente de extinção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240nm que é de 0,0394 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. Uma unidade de catalase foi definida como a quantidade de enzima necessária para decompor 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / min.

#### **5.4.4.3. Ensaio de Glutathione Peroxidase (GPx)**

A atividade de glutathione peroxidase foi determinada por espectrofotometria (Shimadzu – TCC 240A) ( $A_{340\text{nm}}$ ) de forma indireta, já que foi monitorada a oxidação do NADPH, reação catalisada pela glutathione reductase (GR) conforme Joanisse e Storey (1996). O sistema de reação foi constituído por tampão fosfato de potássio 50 mmol/L, pH 7,2 (Sigma Aldrich®, Alemanha) com EDTA 0,5 mmol/L (Reagen®, Brasil), azida sódica 2 mmol/L (Sigma Aldrich®, Alemanha), GR 1,5 IU/mL (Sigma Aldrich®, Alemanha), NADPH 0,15 mmol/L (Sigma Aldrich®, Alemanha), GSH, 5

mmol/L (Sigma Aldrich®, Alemanha), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,2 mmol/L (Merck®, Alemanha) e 50 µL de homogeneizado, concentrações finais. O ensaio continha dois brancos: branco total, formado por todas as soluções com exceção do homogeneizado e branco específico, necessário para determinar qualquer reação com substratos do próprio tecido (tudo menos o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). O tempo da reação foi de 10 segundos. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar do NADPH a 340nm que é de 6,22 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. Uma unidade (U) de glutathiona peroxidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 nmol NADPH / min.

#### **5.4.4.4. Ensaio de Glutathiona Redutase (GR)**

O ensaio foi feito por espectrofotometria (espectrofotômetro Shimadzu – TCC 240A) (A<sub>340nm</sub>), segundo Joanisse e Storey (1996), no qual foi monitorada a oxidação do NADPH (doador de elétrons para redução da GSSG) por 20 segundos. Nesse ensaio tivemos, em concentrações finais, tampão fosfato de potássio 50 mmol/L, pH 7,2 (Sigma Aldrich®, Alemanha) com EDTA 0,5 mmol/L (Reagen®, Brasil), NADPH 0,2 mmol/L (Sigma Aldrich®, Alemanha), GSSG 1 mmol/L (Sigma Aldrich®, Alemanha) e 75 µL (fígado, baço e rim), 150 µL (intestino) ou 250 µL (coração e músculo esquelético) de homogeneizado de tecido. O branco específico somente não continha a GSSG. Para os cálculos da atividade enzimática, foi considerado o coeficiente de extinção molar do NADPH de 6,22 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> a 340nm. Uma unidade (U) de glutathiona redutase foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 nmol NADPH / min.

#### **5.4.4.5. Ensaio de Glutathiona-S-transferase (GST)**

A atividade de GST foi avaliada segundo Joanisse e Storey (1996), por espectrofotometria (espectrofotômetro Shimadzu – TCC 240A) (A<sub>340nm</sub>), onde se fez a leitura do conjugado de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a GSH (S-2,4-dinitrofenil-glutathiona). O sistema reacional foi formado por tampão fosfato de potássio 50 mmol/L em pH 7,2 (Sigma Aldrich®, Alemanha) com EDTA 0,5 mmol/L (Reagen®, Brasil), CDNB 1 mmol/L (Sigma Aldrich®, Alemanha), GSH 1 mmol/L (Sigma Aldrich®, Alemanha) e 50 µL de homogeneizado de tecido (valores de concentrações finais) e foi feita a leitura

durante 20 segundos. Dois brancos foram utilizados no sistema: branco total (sem homogeneizado, usualmente igual a zero) e branco específico (sem GSH, para avaliar a conjugação entre a GSH do tecido e o CDNB). A atividade enzimática foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar do S-2,4-dinitrofenil-glutathione de  $9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a 340nm. Uma unidade (U) de glutathione-S-transferase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 nmol de conjugado / min.

#### **5.4.4.6. Ensaio da NADPH oxidase**

A atividade da Nox foi medida através do decaimento do consumo de NADPH por espectrofotometria a  $A_{340\text{nm}}$  (espectrofotômetro Shimadzu – TCC 240A), segundo Souza et al. (2002) com modificações. O ensaio durava 300 segundos e era composto por concentrações finais de tampão fosfato de potássio 50 mmol/L em pH 7,2 (Sigma Aldrich®, Alemanha) com EDTA 0,5 mmol/L (Reagen®, Brasil), NADPH 0,1mmol/L (Sigma Aldrich®, Alemanha) e homogeneizado (125  $\mu\text{L}$  para fígado, baço, rim e intestino; 200  $\mu\text{L}$  para músculo esquelético e 250  $\mu\text{L}$  para coração). O branco do ensaio continha todas as soluções exceto o homogeneizado. Para a análise da atividade enzimática foi utilizado o coeficiente de extinção molar do NADPH de  $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a 340nm. Uma unidade (U) de NADPH oxidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 nmol NADPH / min.

### **5.5. Análises Estatísticas**

O tratamento dos dados foi realizado através da estatística descritiva (média e desvio padrão). Para comparação dos dados, primeiramente foi realizado a análise da distribuição das variáveis utilizando o método de Kolmogorov-Smirnov (SPSS). Uma vez que as distribuições de todas as variáveis eram normais, aplicou-se o teste T nas análises comparativas entre as médias das variáveis entre os grupos controle e testes. As análises de correlação entre as variáveis foram realizadas utilizando-se o teste de comparação de Pearson. O valor de significância estabelecido para todos os testes foi de  $P \leq 0,05$ . Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences para Windows®) versão 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA, 2004).

## 6. RESULTADOS

Devido à alteração no teor de ferro dietético, como esperado, a ingestão de ferro foi estatisticamente diferente entre todos os grupos (CT, DEF, SUP), ainda que não tenha ocorrido diferença no consumo alimentar. O grupo Deficiente apresentou maior perda ponderal quando comparado ao grupo Controle (Tabela 6.1).

Tabela 6.1: consumo alimentar, ingestão de ferro e variação de peso de ratos idosos tratados com dieta controle (CT), deficiente (DEF) e suplementada (SUP) com ferro<sup>1</sup>, por 78 dias.

	CT	DEF	SUP
<b>Consumo alimentar (Kg)</b>	1,84 ± 0,03	1,68 ± 0,16	1,79 ± 0,10
<b>Ingestão de ferro (mg)</b>	64,22 ± 1,13	16,81 ± 1,60 (***)	627,64 ± 34,29 (***) †††)
<b>Variação de peso (g)</b>	-29,60 ± 22,02	-64,47 ± 14,32 (*)	-42,77 ± 26,79

<sup>1</sup>Média e desvio padrão: n = 7 (CT); n = 5 (DEF); n = 8 (SUP). Diferença entre o grupo CT e grupos testes: \*p ≤ 0,05; \*\*p ≤ 0,01; \*\*\*p ≤ 0,001. Diferença entre os grupos testes: †p ≤ 0,05; ††p ≤ 0,01; †††p ≤ 0,001 (Teste-t de Student).

Os grupos Deficiente e Jovem apresentaram hematócrito e hemoglobina significativamente maiores que o Controle. O grupo Suplementado apresentou hematócrito, concentração de ferro sérico (FS), capacidade de ligação do ferro (CTLF) e níveis de gama glutamil transferase (GGT) maiores que o Controle. Quando comparado ao grupo Deficiente, o Suplementado apresentou maior concentração de ferro sérico, saturação de transferrina e níveis de GGT (Tabela 6.2).

A análise de correlação Pearson entre a ingestão de ferro e alguns marcadores do estado corporal em ferro mostrou que o aumento da ingestão de ferro resultou em um aumento da CTLF, da saturação de transferrina e dos níveis FS, não havendo correlação significativa entre a ingestão de ferro e as variáveis hemoglobina e hematócrito (Tabela 6.3).

Tabela 6.2: hemoglobina, hematócrito, ferro sérico, capacidade de ligação do ferro, saturação de transferrina, transferrina e gama glutamiltransferase dos ratos idosos tratados com dieta Controle (CT), Deficiente (DEF) e Suplementada (SUP) em ferro e dos ratos jovens (JOV)<sup>1</sup>.

	CT	DEF	SUP	JOV
<b>Hemácia (milhões/mm<sup>3</sup>)</b>	8,6 ± 0,5	8,9 ± 0,7	8,8 ± 0,4	8,8 ± 0,3
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	15,8 ± 0,5	16,5 ± 0,6 (*)	16,2 ± 0,8	17,3 ± 0,9 (**)
<b>Hematócrito (%)</b>	45,1 ± 1,0	47,4 ± 1,7 (*)	46,7 ± 1,2 (*)	51,6 ± 3,2 (***)
<b>Ferro sérico (µg/dL)</b>	224,5 ± 36,1	164,2 ± 99,8	355,7 ± 79,9 (** ††)	242,1 ± 106,0
<b>Capacidade total de ligação do ferro (µg/dL)</b>	401,1 ± 66,0	420,2 ± 36,1	471,0 ± 55,5 (*)	403,6 ± 32,0
<b>Saturação de transferrina (%)</b>	63,7 ± 19,8	39,6 ± 23,6	75,1 ± 13,1 (††)	58,9 ± 22,3
<b>Transferrina (mg/dL)</b>	283,8 ± 49,2	294,1 ± 25,2	320,8 ± 32,6	282,5 ± 22,4
<b>Gama Glutamiltransferase (U/L)</b>	1,2 ± 0,4	1,0 ± 0	6,9 ± 5,3 (* †)	3,0 ± 2,1

<sup>1</sup>Média e desvio padrão: n = 7 (CT); n = 5 (DEF); n = 8 (SUP); n = 6 (JOV). Diferença entre o grupo CT e grupos testes: \*p ≤ 0,05; \*\*p ≤ 0,01; \*\*\*p ≤ 0,001. Diferença entre os grupos DEF e SUP: †p ≤ 0,05; ††p ≤ 0,01; †††p ≤ 0,001 (Teste-t de Student).

Tabela 6.3: coeficiente de correlação de Pearson e grau de significância das correlações entre a ingestão de ferro e o estado corporal em ferro em ratos idosos tratados com dieta controle, deficiente e suplementada em ferro.

	Hem <sup>1</sup>	Hb <sup>2</sup>	Ht <sup>3</sup>	CTLF <sup>4</sup>	ST <sup>5</sup>	Transf <sup>6</sup>	FS <sup>7</sup>
<b>Ingestão de ferro</b>							
Cor. Pearson	-0,026	0,043	0,168	0,512	0,478	0,414	0,732
Sig. (p)	0,917	0,861	0,504	<b>0,030</b>	<b>0,038</b>	0,087	<b>0,000</b>

<sup>1</sup>Hem: Hemácia; <sup>2</sup>Hb: hemoglobina; <sup>3</sup>Ht: hematócrito; <sup>4</sup>CTLF: capacidade total de ligação do ferro; <sup>5</sup>ST: saturação de transferrina; <sup>6</sup>Transf: transferrina; <sup>7</sup>FS: ferro sérico.

A Tabela 6.4 mostra a concentração de ferro nos tecidos. O grupo Deficiente apresentou menor concentração de ferro no músculo esquelético em relação ao Controle. O grupo Suplementado apresentou maior nível de ferro no baço e fígado e menor nível no músculo esquelético (p=0,05) quando comparados ao Controle. Em relação ao grupo Deficiente, o grupo Suplementado apresentou maior acúmulo de ferro no coração. O grupo Jovem apresentou menores níveis de ferro no baço, fígado e músculo esquelético em relação ao Controle.

Tabela 6.4: Concentração de ferro nos tecidos dos ratos idosos, tratados com dieta controle (CT), deficiente (DEF) e suplementada (SUP) em ferro e ratos jovens (JOV)<sup>1</sup> ( $\mu\text{g Fe/g tecido}$ ).

	CT	DEF	SUP	JOV
<b>Baço</b>	1050 $\pm$ 289	1374 $\pm$ 503	1835 $\pm$ 272 (**)	207 $\pm$ 26 (***)
<b>Fígado</b>	139 $\pm$ 26	213 $\pm$ 92	184 $\pm$ 25 (**)	89 $\pm$ 14 (**)
<b>Coração</b>	76 $\pm$ 26	47 $\pm$ 9	67 $\pm$ 12 (†)	70 $\pm$ 29
<b>Músculo Esquelético</b>	16 $\pm$ 3	12 $\pm$ 2 (*)	14 $\pm$ 2 (*)	7,9 $\pm$ 3 (***)

<sup>1</sup>Média e desvio padrão: coração e baço (n = 4); fígado e músculo esquelético (n = 5 a 8, dependendo do grupo). Diferença entre o grupo CT e grupos testes: \*p  $\leq$  0,05; \*\*p  $\leq$  0,01; \*\*\*p  $\leq$  0,001. Diferença entre os grupos DEF e SUP: †p  $\leq$  0,05; ††p  $\leq$  0,01; †††p  $\leq$  0,001 (Teste-t de Student).

A Figura 6.1 apresenta o estado oxidativo dos ratos, avaliado por meio dos níveis de carbonil e MDA, encontrados no baço, fígado, coração, músculo esquelético, intestino e rim dos animais. Os ratos dos grupos Deficiente e Suplementado apresentaram maiores níveis de MDA esplênico que o Controle, enquanto que o grupo Jovem apresentou níveis menores comparado com o Controle. Ainda no baço, não foi observada diferença significativa nos níveis de carbonil entre os grupos (Figura 6.1A).

Os níveis de carbonil e MDA no fígado dos ratos do grupo Deficiente foram menores que do Controle. O grupo Suplementado mostrou aumento dos níveis de carbonil em relação ao Controle e Deficiente e maiores níveis de MDA do que o Deficiente. O grupo Jovem apresentou menores níveis de MDA do que o Controle (Figura 6.1B).

No coração dos ratos dos grupos Suplementado e Jovem foram observados maiores níveis de carbonil comparados ao Controle. Os ratos dos grupos Deficiente, Suplementado e Jovens apresentaram menores níveis de MDA quando comparado com os do Controle (Figura 6.1C).

No músculo esquelético, foi detectado um aumento significativo dos níveis de carbonil nos grupos Deficiente e Suplementado comparados ao Controle. O grupo Jovem apresentou maior dano lipídico, já que teve níveis de MDA mais elevados que o Controle (Figura 6.1D). Não foi observada diferença significativa nos níveis de MDA entre os dois grupos testes e Controle.

No intestino dos ratos do grupo Jovem foi observado menor nível de carbonil em relação ao Controle, não havendo diferença significativa entre o

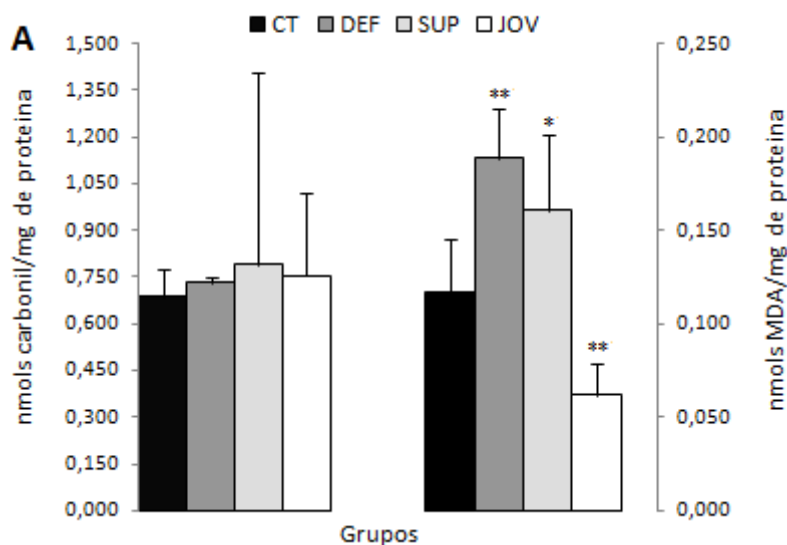


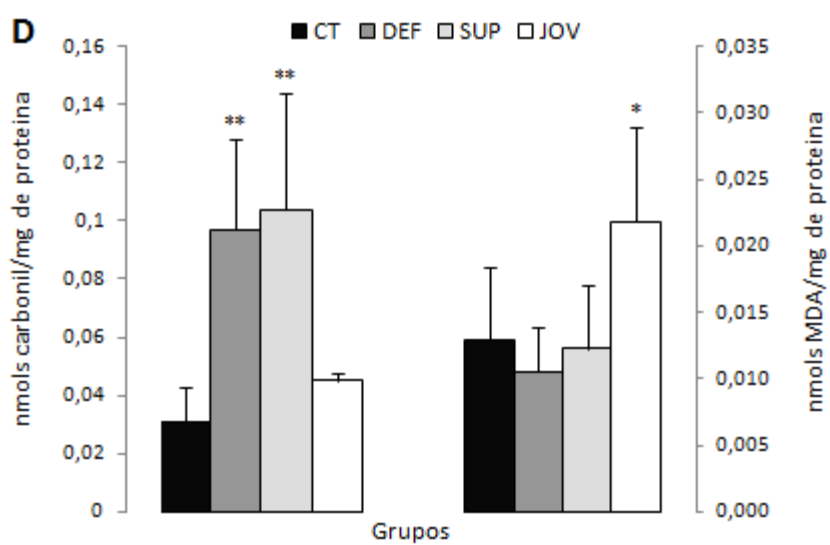
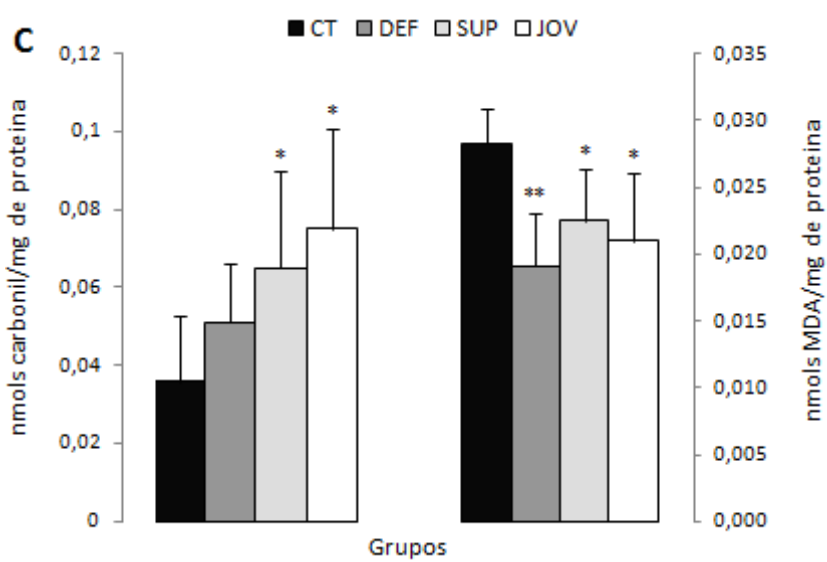
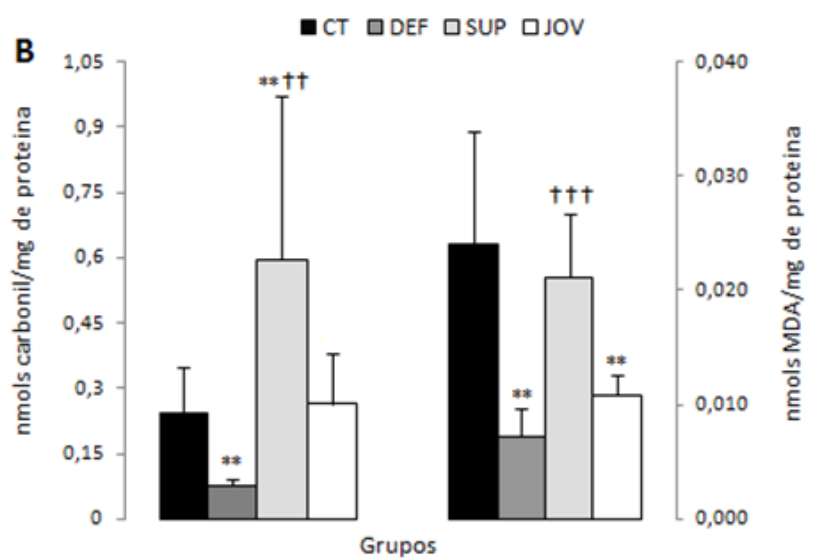
Controle e os dois grupos testes. Os níveis de MDA no grupo Deficiente foram menores que os do grupo Controle, enquanto que o grupo Suplementado apresentou os maiores níveis em relação aos grupos Controle e Deficiente (Figura 6.1E).

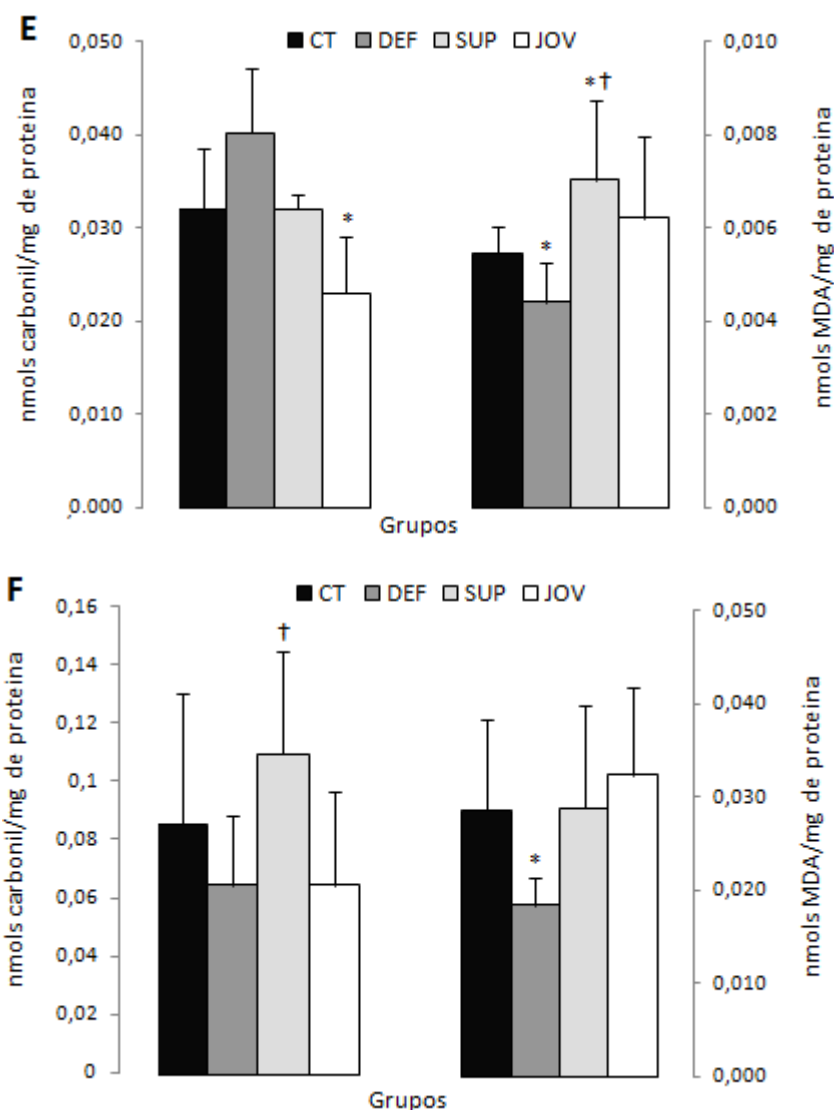
No rim, foi encontrado maior nível de carbonil no grupo Suplementado apenas em relação ao Deficiente. Os níveis de MDA foram menores no grupo Deficiente em relação ao Controle (Figura 6.1F).

Figura 6.1: Concentração de carbonil<sup>1</sup> e malonaldeído (MDA)<sup>2</sup> no baço (A), fígado (B), coração (C), músculo esquelético (D), intestino (E) e rim (F) de ratos idosos tratados com dieta controle (CT), deficiente (DEF) e suplementada (SUP) em ferro durante 78 dias e de ratos jovens (JOV)<sup>1</sup>.

<sup>1,2</sup>Média e desvio padrão: (n entre 5 a 8). Diferença entre o grupo CT e os grupos testes e JOV: \*p ≤ 0,05; \*\*p ≤ 0,01; \*\*\*p ≤ 0,001. Diferença entre os grupos DEF e SUP: †p ≤ 0,05; ††p ≤ 0,01; †††p ≤ 0,001 (Teste-t de Student).







A figura 6.2 mostra a atividade específica das quatro enzimas antioxidantes e da NADPH oxidase. Com relação à atividade específica da catalase (CAT) apresentada na Figura 6.2A, foi observada uma redução na atividade específica da enzima no baço dos animais do grupo Jovem em relação ao Controle. No intestino, o grupo Suplementado apresentou maior atividade que o Controle e Deficiente. Não foi observada diferença significativa nas atividades da catalase no fígado, coração e rim entre os animais dos quatro grupos. Foi observada uma variação na atividade específica da catalase entre os seis órgãos estudados (Tabela 6.5), sendo que no fígado dos quatro grupos foi encontrada maior atividade de catalase em relação aos demais órgãos. O rim foi o segundo órgão com maior valor de catalase em relação aos demais órgãos, nos quatro grupos. No músculo

esquelético, não foi possível detectar atividade enzimática nos quatro grupos estudados.

A atividade específica da glutathiona peroxidase (GPx) no baço dos ratos do grupo Deficiente foi maior que a do Controle. No grupo Jovem, a atividade enzimática foi menor no baço, coração e rim quando comparadas ao Controle (Figura 6.2B). O fígado dos animais dos quatro grupos apresentou os valores de atividade de GPx maiores em relação aos demais órgãos, seguido do coração e rim, cujo valores não foram diferentes entre si. Os menores valores foram observados no músculo em relação aos seis órgãos estudados (Tabela 6.5).

A atividade específica da glutathiona redutase (GR) no baço dos ratos do grupo Deficiente foi maior que no grupo o Suplementado, e o grupo Jovem apresentou menor atividade em relação ao Controle. No rim, os grupos Suplementado e Jovem apresentaram menor atividade que o Controle. Não houve diferença significativa na atividade de GR nos demais tecidos estudados entre os quatro grupos (Figura 6.2C). As mais altas atividades específicas da GR foram detectadas no rim dos animais dos quatro grupos, seguido dos valores encontrados no intestino. O coração e o músculo esquelético apresentaram os menores valores, não havendo diferença entre si (Tabela 6.5).

A atividade específica da glutathiona S transferase (GST) variou apenas no intestino dos ratos Suplementados que apresentaram valores menores que os do grupo Controle (Figura 6.2D). Nos demais órgãos estudados não foi observada diferença significativa da atividade de GST entre os quatro grupos (Figura 6.2D). Os mais altos valores de atividade específica da GST foram encontrados nos fígados dos animais dos quatro grupos, seguido dos valores encontrados no intestino e depois no rim de todos os animais. Os menores valores foram observados no coração, músculo esquelético e baço, entre os quais não foi observada diferença significativa de atividade de GST (Tabela 6.5).

A atividade da NADPH oxidase (Nox) no baço foi significativamente menor nos grupos Suplementado e Jovem comparados ao Controle e, o grupo Deficiente apresentou maior atividade enzimática que o Suplementado. No fígado dos ratos do grupo Deficiente foi observada maior atividade Nox

que do Controle e no intestino, o grupo Suplementado apresentou atividade menor que o Controle (Figura 6.2E). A atividade da Nox variou entre os órgãos estudados (Tabela 6.5). Os maiores valores de atividade da Nox foram encontrados no intestino dos ratos dos quatro grupos, seguido do músculo esquelético e do baço que apresentaram valores maiores que os do fígado, coração e rim, os quais não apresentaram diferença entre si.

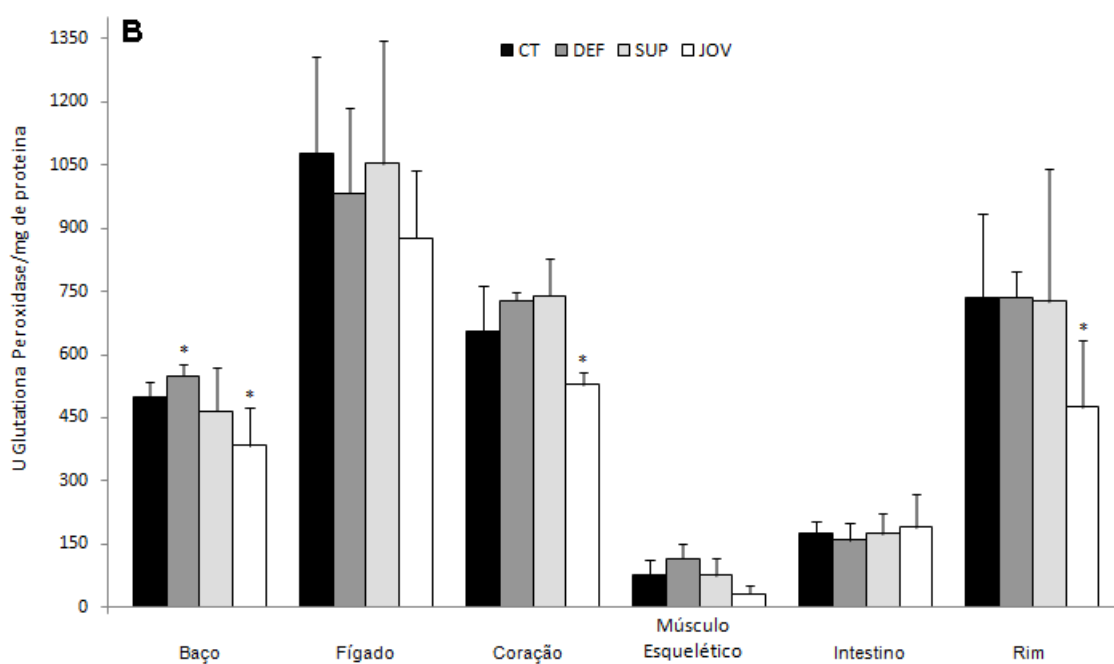
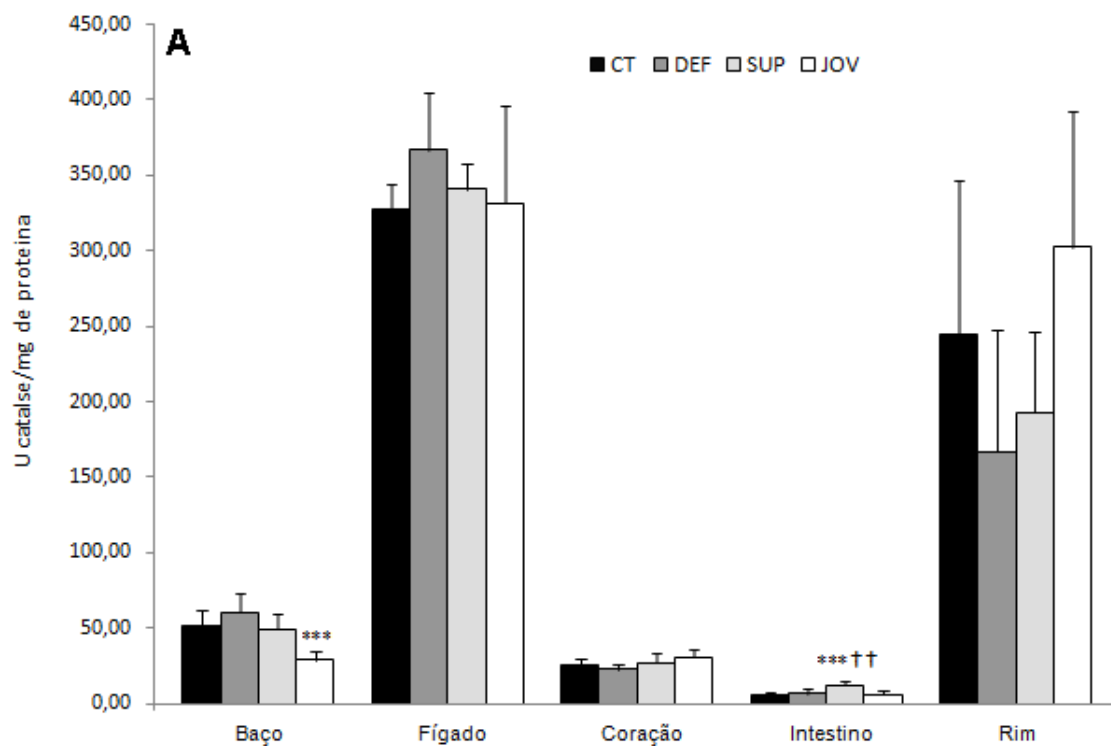
Tabela 6.5: diferença tecido-específica na atividade das enzimas catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR), glutathiona S tranferase (GST) e NADPH oxidase (Nox) de ratos idosos, tratados com dieta controle (CT), deficiente (DEF) e suplementada (SUP) em ferro e ratos jovens (JOV)<sup>1</sup>.

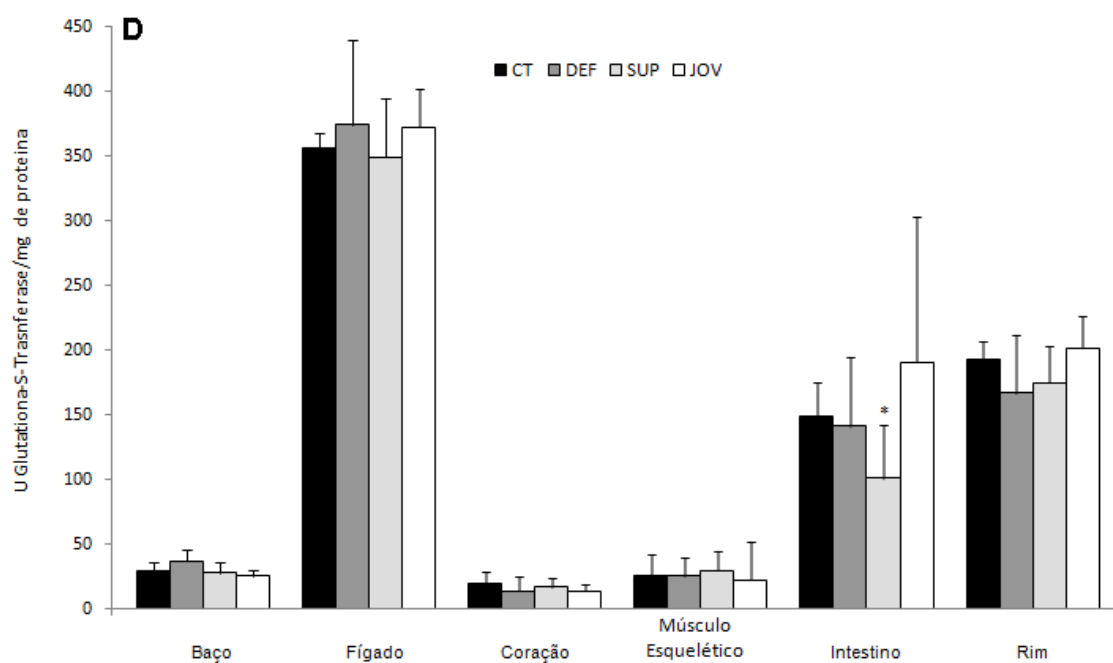
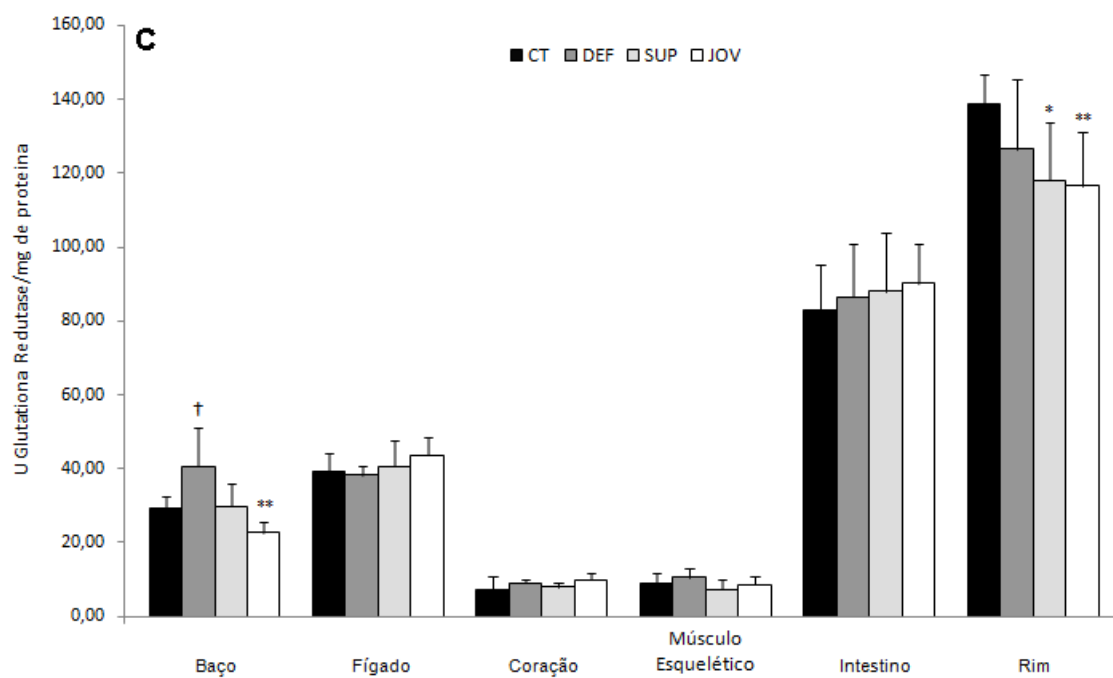
	CAT	GPx	GR	GST	Nox
<b>Baço</b>	47,1 ± 14,5 <sup>c</sup>	471,0 ± 91,0 <sup>c</sup>	30,1 ± 8,3 <sup>d</sup>	29,8 ± 8,1 <sup>d</sup>	2,7 ± 0,6 <sup>b</sup>
<b>Fígado</b>	340,3 ± 39,9 <sup>a</sup>	1008,0 ± 234,0 <sup>a</sup>	40,6 ± 5,4 <sup>c</sup>	361,6 ± 41,9 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,2 <sup>c</sup>
<b>Coração</b>	26,6 ± 5,5 <sup>c,d</sup>	659,0 ± 120,0 <sup>b</sup>	8,4 ± 2,4 <sup>e</sup>	16,4 ± 7,9 <sup>d</sup>	0,7 ± 0,3 <sup>c</sup>
<b>Músculo Esquelético</b>	n.d.	77,0 ± 42,0 <sup>d</sup>	8,6 ± 2,7 <sup>e</sup>	27,1 ± 15,4 <sup>d</sup>	2,3 ± 0,5 <sup>b</sup>
<b>Intestino</b>	8,0 ± 3,7 <sup>d</sup>	175,0 ± 49,0 <sup>d</sup>	86,9 ± 12,9 <sup>b</sup>	144,3 ± 69,1 <sup>c</sup>	3,7 ± 0,9 <sup>a</sup>
<b>Rim</b>	228,3 ± 93,3 <sup>b</sup>	662,0 ± 231,0 <sup>b</sup>	124,6 ± 16,4 <sup>a</sup>	184,6 ± 30,5 <sup>b</sup>	0,8 ± 0,3 <sup>c</sup>

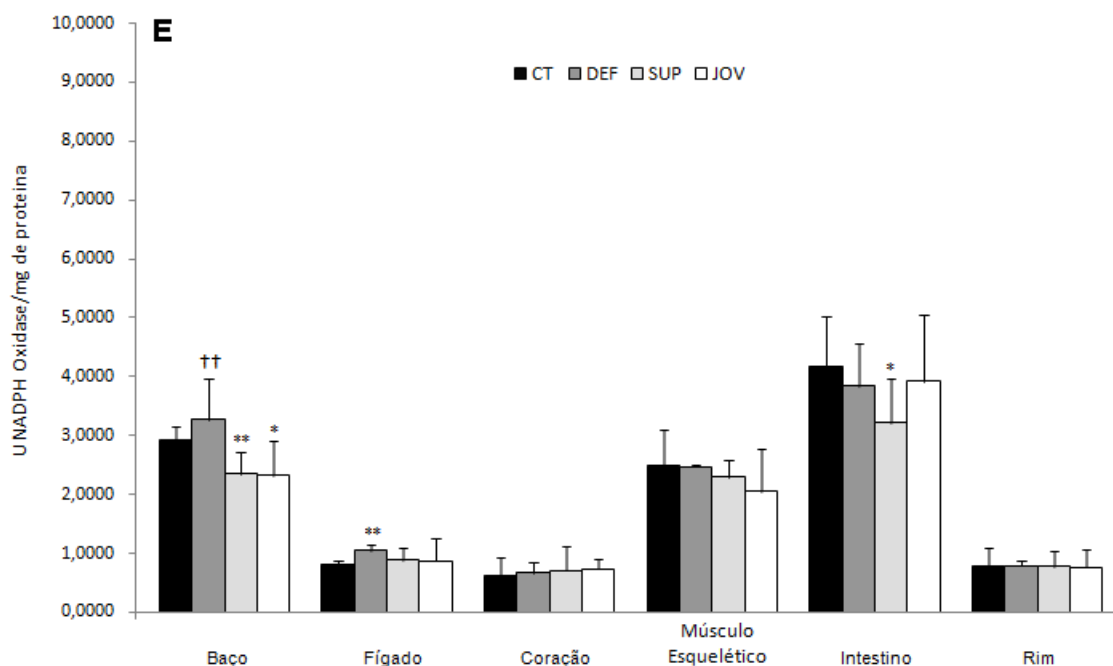
<sup>1</sup>Média e desvio padrão (Bonferroni).

Figura 6.2: atividade específica da catalase (A), glutaciona peroxidase (B), glutaciona redutase (C), glutaciona S tranferase (D) e NADPH oxidase (E) em diferentes tecidos de ratos idosos, tratados com dieta controle (CT), deficiente (DEF) e suplementada (SUP) em ferro e ratos jovens (JOV)<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Média e desvio padrão: (n entre 5 a 8). Diferença entre o grupo CT e os grupos testes e JOV: \*p ≤ 0,05; \*\*p ≤ 0,01; \*\*\*p ≤ 0,001. Diferença entre os grupos DEF e SUP: †p ≤ 0,05; ††p ≤ 0,01; †††p ≤ 0,001 (Teste-t de Student).







Uma análise de correlação de Pearson entre o estado oxidativo e estado corporal em ferro, bem como entre atividade de defesas antioxidantes e estado corporal em ferro foi realizada em cada tecido (Tabelas 6.6 a 6.17). Foi encontrada correlação positiva entre GGT e ferro sérico e uma correlação marginal positiva foi também observada entre GGT e transferrina (Tabela 6.6).

No baço, foi observada uma correlação positiva entre MDA e hemoglobina. Correlação negativa foi detectada entre os valores de Nox e os valores de ferro sérico e ferro esplênico. Foi também detectada uma correlação negativa entre a saturação de transferrina e as atividades de GR e de GST, e ainda um correlação negativa entre GST e carbonil. Correlações marginais positivas foram encontradas entre MDA e as variáveis transferrina sérica e GST. Também foram achadas correlações marginais positivas entre carbonil e CTLF. Finalmente, foram notadas correlações marginais negativas entre ferro sérico e as enzimas GR e GST, bem como correlação marginal negativa entre Nox e saturação de transferrina (Tabela 6.6 e Tabela 6.7).

No fígado, detectou-se uma correlação positiva entre catalase e os valores de hemoglobina e hematócrito, além de uma alta e significativa correlação positiva da catalase com ferro tecidual (Tabela 6.8). Correlação negativa foi detectada entre a atividade da Nox e os valores de MDA. Foi



observada uma correlação marginal negativa entre a atividade da catalase e os níveis de MDA e carbonil (Tabela 6.9).

Correlação negativa foi notada entre ferro do coração e atividade de GR e GPx. Ainda no coração, foi detectada correlação positiva entre carbonil e os valores de CTLF, tranferrina e GGT. Correlação marginal positiva foi encontrada entre GPx e transferrina e também uma correlação marginal positiva entre ferro sérico e catalase (Tabela 6.10 e Tabela 6.11).

Foi observada, no músculo esquelético, uma correlação positiva entre carbonil e transferrina. Correlação inversa foi detectada entre GST e os níveis de MDA e ferro tecidual. Notou-se correlação marginal negativa entre GPx e ferro sérico. GR e saturação de transferrina também apresentaram correlação marginal negativa. Uma correlação marginal negativa também foi encontrada entre a Nox e MDA (Tabela 6.12 e Tabela 6.13).

No intestino, notou-se correlação positiva entre catalase os valores de ferro sérico, saturação de transferrina e MDA. Ferro sérico e MDA também apresentaram correlação positiva. Uma correlação negativa foi observada entre Nox e as variáveis ferro sérico, CTLF e transferrina. Outra correlação negativa foi encontrada entre GST e saturação de transferrina. Correlação marginal negativa foi achada entre GST e ferro sérico (Tabela 6.14 e Tabela 6.15).

Uma correlação negativa entre a catalase e os valores de hematócrito e CTLF foi encontrada no rim. Correlação negativa marginal foi observada entre catalase renal e transferrina. Ainda no rim, GR e hemoglobina mostraram correlação negativa.

Tabela 6.6: Coeficiente de correlação de Pearson (R) e grau de significância (P) das correlações entre as variáveis que caracterizam o estado corporal em ferro e estado oxidativo no baço de todos os ratos adultos, no final do estudo.

		Estado Corporal em Ferro							
		Hem <sup>1</sup>	Hb <sup>2</sup>	Ht <sup>3</sup>	FS <sup>4</sup>	CTLF <sup>5</sup>	ST <sup>6</sup>	Transf <sup>7</sup>	FT <sup>8</sup>
Estado oxidativo	<b>GGT<sup>9</sup></b>								
	R	0,028	0,369	0,060	0,579	0,370	0,362	0,385	0,497
	P	0,896	0,132	0,820	<b>0,012</b>	0,130	0,140	0,069	0,100
	<b>CAT<sup>10</sup></b>								
	R	0,039	0,008	0,225	0,296	-0,143	0,038	0,044	0,347
	P	0,850	0,973	0,368	0,218	0,559	0,873	0,833	0,269
	<b>GR<sup>11</sup></b>								
	R	0,031	0,222	0,105	0,441	-0,139	0,515	0,095	0,268
	P	0,884	0,361	0,678	0,059	0,582	<b>0,024</b>	0,658	0,400
	<b>GPx<sup>12</sup></b>								
	R	0,168	0,164	0,109	0,297	-0,084	0,220	0,046	0,350
	P	0,411	0,502	0,666	0,217	0,733	0,351	0,826	0,265
	<b>GST<sup>13</sup></b>								
	R	0,125	0,357	0,090	-0,405	-0,068	-0,542	0,177	-0,374
P	0,541	0,133	0,724	0,085	0,783	<b>0,014</b>	0,398	0,231	
<b>Nox<sup>14</sup></b>									
R	0,061	0,083	0,050	0,661	-0,382	0,440	-0,181	0,689	
P	0,766	0,736	0,845	<b>0,002</b>	0,107	0,052	0,386	<b>0,013</b>	
<b>MDA</b>									
R	0,175	0,476	0,371	0,080	0,140	0,409	0,359	0,303	
P	0,413	<b>0,046</b>	0,143	0,751	0,580	0,092	0,093	0,338	
<b>Carbonil</b>									
R	0,449	0,410	0,341	0,275	0,483	0,081	0,303	0,473	
P	0,081	0,115	0,213	0,303	0,058	0,765	0,272	0,142	

<sup>1</sup>Hem: Hemácia; <sup>2</sup>Hb: hemoglobina; <sup>3</sup>Ht: hematócrito; <sup>4</sup>FS: ferro sérico; <sup>5</sup>CTLF: capacidade total de ligação do ferro; <sup>6</sup>ST: saturação de transferrina; <sup>7</sup>Transf: transferrina; <sup>8</sup>FT: ferro tecidual; <sup>9</sup>GGT: gama glutamiltransferase; <sup>10</sup>CAT: catalase; <sup>11</sup>GR: glutaciona redutase; <sup>12</sup>GPx: glutaciona peroxidase; <sup>13</sup>GST: glutaciona S transferase; <sup>14</sup>Nox: NADPH oxidase.

Tabela 6.7: Coeficiente de correlação de Pearson (R) e grau de significância (P) das correlações entre as variáveis que caracterizam o estado oxidativo e as defesas antioxidantes no baço de todos os ratos adultos, no final do estudo.

	GGT <sup>1</sup>	CAT <sup>2</sup>	GR <sup>3</sup>	GPx <sup>4</sup>	GST <sup>5</sup>	Nox <sup>6</sup>
<b>MDA</b>						
R	0,152	-0,278	0,217	0,064	0,463	-0,160
P	0,548	0,263	0,388	0,802	0,053	0,527
<b>Carbonil</b>						
R	0,108	-0,123	-0,183	-0,362	-0,519	-0,393
P	0,690	0,650	0,498	0,168	<b>0,039</b>	0,132

<sup>1</sup>GGT: gama glutamiltransferase; <sup>2</sup>CAT: catalase; <sup>3</sup>GR: glutatona redutase; <sup>4</sup>GPx: glutatona peroxidase; <sup>5</sup>GST: glutatona S transferase; <sup>6</sup>Nox: NADPH oxidase.

Tabela 6.8: Coeficiente de correlação de Pearson (R) e grau de significância (P) das correlações entre as variáveis que caracterizam o estado corporal em ferro e estado oxidativo no fígado de todos os ratos adultos, no final do estudo.

		Estado Corporal em Ferro							
		Hem <sup>1</sup>	Hb <sup>2</sup>	Ht <sup>3</sup>	FS <sup>4</sup>	CTLF <sup>5</sup>	ST <sup>6</sup>	Transf <sup>7</sup>	FT <sup>8</sup>
<b>Estado oxidativo</b>	<b>GGT<sup>9</sup></b>								
	R	0,028	0,369	0,060	0,579	0,370	0,362	0,385	0,067
	P	0,896	0,132	0,820	<b>0,012</b>	0,130	0,140	0,069	0,792
	<b>CAT<sup>10</sup></b>								
	R	0,075	0,625	0,488	-0,035	0,170	-0,147	0,098	0,787
	P	0,732	<b>0,007</b>	<b>0,047</b>	0,893	0,530	0,573	0,665	<b>0,000</b>
	<b>GR<sup>11</sup></b>								
	R	0,003	0,138	0,155	0,254	0,033	0,172	-0,015	-0,170
	P	0,988	0,584	0,552	0,309	0,893	0,480	0,945	0,488
	<b>GPx<sup>12</sup></b>								
	R	-0,070	0,319	-0,189	0,111	-0,276	0,142	-0,111	0,070
	P	0,743	0,184	0,453	0,651	0,268	0,563	0,615	0,775
	<b>GST<sup>13</sup></b>								
	R	-0,199	-0,220	0,060	0,027	-0,027	0,130	-0,153	0,029
P	0,363	0,380	0,819	0,916	0,918	0,606	0,497	0,909	
<b>Nox<sup>14</sup></b>									
R	0,106	0,082	0,175	-0,328	-0,194	-0,346	-0,194	-0,098	
P	0,615	0,746	0,502	0,184	0,427	0,147	0,364	0,689	

	<b>MDA</b>								
	R	-0,258	-0,244	-0,380	0,351	0,073	0,147	0,176	-0,289
	P	0,203	0,314	0,120	0,140	0,768	0,535	0,400	0,216
	<b>Carbonil</b>								
	R	-0,181	-0,117	0,036	0,314	0,212	0,219	0,154	-0,129
	P	0,376	0,634	0,887	0,190	0,383	0,353	0,463	0,587

<sup>1</sup>Hem: Hemácia; <sup>2</sup>Hb: hemoglobina; <sup>3</sup>Ht: hematócrito; <sup>4</sup>FS: ferro sérico; <sup>5</sup>CTLF: capacidade total de ligação do ferro; <sup>6</sup>ST: saturação de transferrina; <sup>7</sup>Transf: transferrina; <sup>8</sup>FT: ferro tecidual; <sup>9</sup>GGT: gama glutamiltransferase; <sup>10</sup>CAT: catalase; <sup>11</sup>GR: glutaciona redutase; <sup>12</sup>GPx: glutaciona peroxidase; <sup>13</sup>GST: glutaciona S transferase; <sup>14</sup>Nox: NADPH oxidase.

Tabela 6.9: Coeficiente de correlação de Pearson (R) e grau de significância (P) das correlações entre as variáveis que caracterizam o estado oxidativo e as defesas antioxidantes no fígado de todos os ratos adultos, no final do estudo.

	<b>GGT<sup>1</sup></b>	<b>CAT<sup>2</sup></b>	<b>GR<sup>3</sup></b>	<b>GPx<sup>4</sup></b>	<b>GST<sup>5</sup></b>	<b>Nox<sup>6</sup></b>
<b>MDA</b>						
R	0,190	-0,478	0,049	0,196	-0,203	-0,543
P	0,450	0,052	0,844	0,422	0,419	<b>0,016</b>
<b>Carbonil</b>						
R	0,200	-0,478	0,209	0,275	-0,199	-0,142
P	0,426	0,053	0,389	0,255	0,428	0,562

<sup>1</sup>GGT: gama glutamiltransferase; <sup>2</sup>CAT: catalase; <sup>3</sup>GR: glutaciona redutase; <sup>4</sup>GPx: glutaciona peroxidase; <sup>5</sup>GST: glutaciona S transferase; <sup>6</sup>Nox: NADPH oxidase.

Tabela 6.10: Coeficiente de correlação de Pearson (R) e grau de significância (P) das correlações entre as variáveis que caracterizam o estado corporal em ferro e estado oxidativo no coração de todos os ratos adultos, no final do estudo.

		Estado Corporal em Ferro							
		Hem <sup>1</sup>	Hb <sup>2</sup>	Ht <sup>3</sup>	FS <sup>4</sup>	CTLF <sup>5</sup>	ST <sup>6</sup>	Transf <sup>7</sup>	FT <sup>8</sup>
Estado oxidativo	<b>GGT<sup>9</sup></b>								
	R	0,028	0,369	0,060	0,579	0,370	0,362	0,385	0,160
	P	0,896	0,132	0,820	<b>0,012</b>	0,130	0,140	0,069	0,619
	<b>CAT<sup>10</sup></b>								
	R	0,089	0,251	-0,170	0,439	-0,032	0,356	-0,138	0,244
	P	0,674	0,300	0,499	0,060	0,900	0,135	0,521	0,444
	<b>GR<sup>11</sup></b>								
	R	0,160	0,016	0,002	-0,032	0,383	-0,072	0,219	-0,614
	P	0,456	0,950	0,995	0,898	0,116	0,778	0,316	<b>0,034</b>
	<b>GPx<sup>12</sup></b>								
	R	0,064	0,112	0,136	0,054	0,360	-0,097	0,410	-0,577
	P	0,765	0,657	0,603	0,831	0,142	0,702	0,052	<b>0,050</b>
	<b>GST<sup>13</sup></b>								
	R	0,266	0,066	-0,325	0,108	0,193	0,320	0,203	-0,246
	P	0,209	0,795	0,189	0,669	0,458	0,196	0,352	0,440
	<b>Nox<sup>14</sup></b>								
R	-0,019	-0,235	0,088	-0,055	0,107	-0,198	0,223	0,095	
P	0,928	0,332	0,729	0,823	0,673	0,418	0,296	0,770	
<b>MDA</b>									
R	0,047	-0,235	-0,287	0,126	-0,252	0,249	-0,088	0,175	
P	0,843	0,400	0,299	0,654	0,385	0,372	0,722	0,586	
<b>Carbonil</b>									
R	0,015	0,287	0,108	0,206	0,530	-0,088	0,455	0,163	
P	0,945	0,234	0,671	0,398	<b>0,024</b>	0,719	<b>0,025</b>	0,613	

<sup>1</sup>Hem: Hemácia; <sup>2</sup>Hb: hemoglobina; <sup>3</sup>Ht: hematócrito; <sup>4</sup>FS: ferro sérico; <sup>5</sup>CTLF: capacidade total de ligação do ferro; <sup>6</sup>ST: saturação de transferrina; <sup>7</sup>Transf: transferrina; <sup>8</sup>FT: ferro tecidual; <sup>9</sup>GGT: gama glutamiltransferase; <sup>10</sup>CAT: catalase; <sup>11</sup>GR: glutatona redutase; <sup>12</sup>GPx: glutatona peroxidase; <sup>13</sup>GST: glutatona S transferase; <sup>14</sup>Nox: NADPH oxidase.

Tabela 6.11: Coeficiente de correlação de Pearson (R) e grau de significância (P) das correlações entre as variáveis que caracterizam o estado oxidativo e as defesas antioxidantes no coração de todos os ratos adultos, no final do estudo.

	GGT <sup>1</sup>	CAT <sup>2</sup>	GR <sup>3</sup>	GPx <sup>4</sup>	GST <sup>5</sup>	Nox <sup>6</sup>
<b>MDA</b>						
R	-0,024	-0,179	-0,113	-0,087	0,429	0,061
P	0,934	0,523	0,700	0,768	0,110	0,829
<b>Carbonil</b>						
R	0,471	0,106	-0,002	0,292	-0,032	0,051
P	<b>0,048</b>	0,665	0,993	0,240	0,900	0,836

<sup>1</sup>GGT: gama glutamiltransferase; <sup>2</sup>CAT: catalase; <sup>3</sup>GR: glutaciona redutase; <sup>4</sup>GPx: glutaciona peroxidase; <sup>5</sup>GST: glutaciona S transferase; <sup>6</sup>Nox: NADPH oxidase.

Tabela 6.12: Coeficiente de correlação de Pearson (R) e grau de significância (P) das correlações entre as variáveis que caracterizam o estado corporal em ferro e estado oxidativo no músculo esquelético de todos os ratos adultos, no final do estudo.

		Estado Corporal em Ferro							
		Hem <sup>1</sup>	Hb <sup>2</sup>	Ht <sup>3</sup>	FS <sup>4</sup>	CTLF <sup>5</sup>	ST <sup>6</sup>	Transf <sup>7</sup>	FT <sup>8</sup>
<b>Estado oxidativo</b>	<b>GGT<sup>9</sup></b>								
	R	0,028	0,369	0,060	0,579	0,370	0,362	0,385	-0,158
	P	0,896	0,132	0,820	<b>0,012</b>	0,130	0,140	0,069	0,531
	<b>CAT<sup>10</sup></b>								
	R	0,015	0,017	0,183	-0,271	-0,143	-0,433	-0,064	-0,029
	P	0,944	0,947	0,481	0,276	0,573	0,073	0,771	0,908
	<b>GR<sup>11</sup></b>								
	R	0,072	-0,075	0,357	-0,427	-0,309	-0,341	-0,208	-0,248
	P	0,751	0,766	0,160	0,078	0,227	0,166	0,366	0,320
	<b>GPx<sup>12</sup></b>								
	R	-0,151	0,107	-0,346	0,210	0,026	0,297	0,039	-0,523
	P	0,550	0,692	0,189	0,434	0,925	0,264	0,881	<b>0,038</b>
	<b>GST<sup>13</sup></b>								
	R	-0,214	-0,019	-0,169	-0,170	-0,341	0,152	-0,220	-0,297
P	0,326	0,941	0,530	0,515	0,180	0,559	0,325	0,247	
<b>Nox<sup>14</sup></b>									
R	0,040	-0,287	0,074	-0,054	-0,073	0,017	-0,221	0,195	
P	0,850	0,248	0,777	0,832	0,766	0,945	0,299	0,423	

	<b>MDA</b>								
	R	0,034	0,116	0,240	0,174	0,398	-0,047	0,490	-0,252
	P	0,885	0,668	0,370	0,520	0,142	0,863	<b>0,028</b>	0,347
	<b>Carbonil</b>								
	R	0,028	0,369	0,060	0,579	0,370	0,362	0,385	-0,158
	P	0,896	0,132	0,820	<b>0,012</b>	0,130	0,140	0,069	0,531

<sup>1</sup>Hem: Hemácia; <sup>2</sup>Hb: hemoglobina; <sup>3</sup>Ht: hematócrito; <sup>4</sup>FS: ferro sérico; <sup>5</sup>CTLF: capacidade total de ligação do ferro; <sup>6</sup>ST: saturação de transferrina; <sup>7</sup>Transf: transferrina; <sup>8</sup>FT: ferro tecidual; <sup>9</sup>GGT: gama glutamiltransferase; <sup>10</sup>CAT: catalase; <sup>11</sup>GR: glutathione redutase; <sup>12</sup>GPx: glutathione peroxidase; <sup>13</sup>GST: glutathione S transferase; <sup>14</sup>Nox: NADPH oxidase.

Tabela 6.13: Coeficiente de correlação de Pearson (R) e grau de significância (P) das correlações entre as variáveis que caracterizam o estado oxidativo e as defesas antioxidantes no músculo esquelético de todos os ratos adultos, no final do estudo.

		<b>GGT<sup>1</sup></b>	<b>CAT<sup>2</sup></b>	<b>GR<sup>3</sup></b>	<b>GPx<sup>4</sup></b>	<b>GST<sup>5</sup></b>	<b>Nox<sup>6</sup></b>
	<b>MDA</b>						
	R	-0,397	-0,025	0,341	-0,512	-0,437	-0,397
	P	0,102	0,922	0,181	<b>0,043</b>	0,080	0,102
	<b>Carbonil</b>						
	R	0,160	-0,024	0,102	0,121	0,266	0,160
	P	0,570	0,932	0,707	0,668	0,359	0,570

<sup>1</sup>GGT: gama glutamiltransferase; <sup>2</sup>GR: glutathione redutase; <sup>3</sup>GPx: glutathione peroxidase; <sup>4</sup>GST: glutathione S transferase; <sup>5</sup>Nox: NADPH oxidase.

Tabela 6.14: Coeficiente de correlação de Pearson (R) e grau de significância (P) das correlações entre as variáveis que caracterizam o estado corporal em ferro e estado oxidativo no intestino de todos os ratos adultos, no final do estudo.

		<b>Estado Corporal em Ferro</b>						
		<b>Hem<sup>1</sup></b>	<b>Hb<sup>2</sup></b>	<b>Ht<sup>3</sup></b>	<b>FS<sup>4</sup></b>	<b>CTLF<sup>5</sup></b>	<b>ST<sup>6</sup></b>	<b>Transf<sup>7</sup></b>
<b>Estado oxidativo</b>	<b>GGT<sup>9</sup></b>							
	R	0,028	0,369	0,060	0,579	0,370	0,362	0,385
	P	0,896	0,132	0,820	<b>0,012</b>	0,130	0,140	0,069
	<b>CAT<sup>10</sup></b>							
	R	-0,081	-0,068	0,047	0,604	0,237	0,476	0,125
	P	0,694	0,783	0,852	<b>0,006</b>	0,329	<b>0,034</b>	0,551

	<b>GR<sup>11</sup></b>							
	R	0,016	0,011	0,107	-0,037	0,034	-0,120	-0,028
	P	0,938	0,965	0,673	0,882	0,891	0,615	0,893
	<b>GPx<sup>12</sup></b>							
	R	0,026	-0,222	0,233	0,274	0,321	0,271	-0,114
	P	0,901	0,360	0,353	0,256	0,181	0,249	0,588
	<b>GST<sup>13</sup></b>							
	R	-0,088	0,064	-0,102	-0,412	-0,155	-0,466	-0,008
	P	0,675	0,802	0,688	0,089	0,540	<b>0,044</b>	0,971
	<b>Nox<sup>14</sup></b>							
	R	-0,017	-0,366	-0,353	-0,645	-0,691	-0,241	-0,552
	P	0,935	0,124	0,151	<b>0,003</b>	<b>0,001</b>	0,320	<b>0,005</b>
	<b>MDA</b>							
	R	0,205	0,296	0,079	0,518	0,314	0,330	0,179
	P	0,325	0,233	0,762	<b>0,028</b>	0,191	0,168	0,403
	<b>Carbonil</b>							
	R	0,137	0,097	-0,080	-0,127	0,041	-0,323	0,123
	P	0,506	0,693	0,754	0,605	0,867	0,165	0,558

<sup>1</sup>Hem: Hemácia; <sup>2</sup>Hb: hemoglobina; <sup>3</sup>Ht: hematócrito; <sup>4</sup>FS: ferro sérico; <sup>5</sup>CTLF: capacidade total de ligação do ferro; <sup>6</sup>ST: saturação de transferrina; <sup>7</sup>Transf: transferrina; <sup>8</sup>FT: ferro tecidual; <sup>9</sup>GGT: gama glutamiltransferase; <sup>10</sup>CAT: catalase; <sup>11</sup>GR: glutaciona redutase; <sup>12</sup>GPx: glutaciona peroxidase; <sup>13</sup>GST: glutaciona S transferase; <sup>14</sup>Nox: NADPH oxidase.

Tabela 6.15: Coeficiente de correlação de Pearson (R) e grau de significância (P) das correlações entre as variáveis que caracterizam o estado oxidativo e as defesas antioxidantes no intestino de todos os ratos adultos, no final do estudo.

	<b>GGT<sup>1</sup></b>	<b>CAT<sup>2</sup></b>	<b>GR<sup>3</sup></b>	<b>GPx<sup>4</sup></b>	<b>GST<sup>5</sup></b>	<b>Nox<sup>6</sup></b>
<b>MDA</b>						
R	0,393	0,485	0,221	0,187	-0,140	-0,364
P	0,106	<b>0,035</b>	0,362	0,444	0,579	0,138
<b>Carbonil</b>						
R	-0,244	0,023	-0,015	-0,238	0,026	-0,210
P	0,330	0,924	0,949	0,313	0,915	0,389

<sup>1</sup>GGT: gama glutamiltransferase; <sup>2</sup>CAT: catalase; <sup>3</sup>GR: glutaciona redutase; <sup>4</sup>GPx: glutaciona peroxidase; <sup>5</sup>GST: glutaciona S transferase; <sup>6</sup>Nox: NADPH oxidase.



Tabela 6.16: Coeficiente de correlação de Pearson (R) e grau de significância (P) das correlações entre as variáveis que caracterizam o estado corporal em ferro e estado oxidativo no rim de todos os ratos adultos, no final do estudo.

		Estado Corporal em Ferro						
		Hem <sup>1</sup>	Hb <sup>2</sup>	Ht <sup>3</sup>	FS <sup>4</sup>	CTLF <sup>5</sup>	ST <sup>6</sup>	Transf <sup>7</sup>
Estado oxidativo	<b>GGT<sup>9</sup></b>							
	R	0,028	0,369	0,060	0,579	0,370	0,362	0,385
	P	0,896	0,132	0,820	<b>0,012</b>	0,130	0,140	0,069
	<b>CAT<sup>10</sup></b>							
	R	-0,181	-0,358	-0,526	0,046	-0,503	0,219	-0,348
	P	0,387	0,145	<b>0,025</b>	0,858	<b>0,033</b>	0,368	0,096
	<b>GR<sup>11</sup></b>							
	R	-0,279	-0,407	-0,140	-0,246	-0,145	-0,109	0,081
	P	0,188	0,094	0,579	0,326	0,578	0,667	0,713
	<b>GPx<sup>12</sup></b>							
	R	-0,097	-0,406	0,092	-0,247	-0,034	-0,109	0,004
	P	0,668	0,119	0,734	0,357	0,902	0,687	0,987
	<b>GST<sup>13</sup></b>							
	R	-0,247	-0,276	-0,276	0,198	-0,058	0,298	-0,196
	P	0,246	0,268	0,267	0,430	0,825	0,229	0,370
	<b>Nox<sup>14</sup></b>							
R	-0,029	0,139	0,124	-0,045	0,203	-0,387	0,248	
P	0,891	0,594	0,636	0,863	0,419	0,113	0,253	
<b>MDA</b>								
R	0,153	-0,292	-0,344	0,262	-0,198	0,383	-0,247	
P	0,466	0,239	0,163	0,293	0,431	0,106	0,246	
<b>Carbonil</b>								
R	-0,247	-0,352	-0,232	0,277	0,176	0,126	0,273	
P	0,234	0,153	0,354	0,266	0,485	0,608	0,197	

<sup>1</sup>Hem: Hemácia; <sup>2</sup>Hb: hemoglobina; <sup>3</sup>Ht: hematócrito; <sup>4</sup>FS: ferro sérico; <sup>5</sup>CTLF: capacidade total de ligação do ferro; <sup>6</sup>ST: saturação de transferrina; <sup>7</sup>Transf: transferrina; <sup>8</sup>FT: ferro tecidual; <sup>9</sup>GGT: gama glutamiltransferase; <sup>10</sup>CAT: catalase; <sup>11</sup>GR: glutatona redutase; <sup>12</sup>GPx: glutatona peroxidase; <sup>13</sup>GST: glutatona S transferase; <sup>14</sup>Nox: NADPH oxidase.

Tabela 6.17: Coeficiente de correlação de Pearson (R) e grau de significância (P) das correlações entre as variáveis que caracterizam o estado oxidativo e as defesas antioxidantes no rim de todos os ratos adultos, no final do estudo.

	<b>GGT<sup>1</sup></b>	<b>CAT<sup>2</sup></b>	<b>GR<sup>3</sup></b>	<b>GPx<sup>4</sup></b>	<b>GST<sup>5</sup></b>	<b>Nox<sup>6</sup></b>
<b>MDA</b>						
R	0,211	0,361	0,073	0,064	0,346	-0,221
P	0,417	0,129	0,774	0,815	0,160	0,378
<b>Carbonil</b>						
R	0,125	0,248	0,204	0,118	0,056	0,045
P	0,633	0,305	0,416	0,665	0,824	0,859

<sup>1</sup>GGT: gama glutamiltransferase; <sup>2</sup>CAT: catalase; <sup>3</sup>GR: glutaciona redutase; <sup>4</sup>GPx: glutaciona peroxidase; <sup>5</sup>GST: glutaciona S transferase; <sup>6</sup>Nox: NADPH oxidase.

## 7. DISCUSSÃO

Apesar da existência de um complexo mecanismo responsável pela regulação da absorção do ferro dietético (CHEN et al., 2009), o envelhecimento e o aumento da ingestão dietética de ferro promovem o acúmulo de deste mineral nos tecidos (HAHN et al., 2006; PEREIRA et al., 1999), o que pode resultar na produção de radicais livres (HALLIWELL et al., 2007). Assim, o presente estudo investigou o efeito do teor de ferro dietético no estado corporal e no estado oxidativo de ratos idosos saudáveis. Sabendo-se ainda da associação entre o estresse oxidativo e o envelhecimento (HARMAN, 1956), investigou-se, também, os marcadores do estado em ferro e estado oxidativo entre ratos idosos e jovens.

No presente estudo, contrariando a expectativa, os ratos do grupo Deficiente apresentaram maior nível de hemoglobina do que o grupo Controle (Tabela 5.2). A diferença no hemograma dos ratos deficientes pode ser explicada pelo fato dos eritrócitos terem uma vida média de 110 dias (NELSON et al., 2002), não havendo tempo de intervenção suficiente para diminuição dos níveis de hemoglobina. Além disso, a perda de peso verificada nesses animais pode ter resultado em hemoconcentração (LEVIN et al., 1993), o que também explicaria o aumento do hematócrito no grupo Deficiente.

Os animais do grupo Suplementado não apresentaram alteração de hemoglobina em relação ao Controle (Tabela 6.2). Em um estudo recente, realizado em pacientes não anêmicos que receberam uma alta dose de suplementação de ferro por cerca de três semanas também não foram observadas alterações dos níveis de hemoglobina e hematócrito, apesar de ter ocorrido aumento nos níveis séricos de ferritina (LACHANCE et al., 2011). A ausência de correlação entre a ingestão de ferro e as variáveis hemoglobina e hematócrito do presente estudo (Tabela 6.3), corrobora estes achados.

Ainda com relação ao grupo Suplementado, os animais deste grupo mostraram aumento dos níveis séricos de ferro (Tabela 6.2), sugerindo que o mecanismo molecular de absorção de ferro não foi suficiente para limitar sua absorção. Uma possível explicação para isso é o mecanismo de absorção

paracelular, onde o aumento da permeabilidade intestinal permite a entrada do ferro por entre as células (GONZALEZ et al., 1997).

O aumento na saturação de transferrina (ST) observado no grupo Suplementado (Tabela 6.2) refletiu em um aumento proporcional na concentração de ferro sérico (FS), conforme esperado (ELLERVIK et al., 2011). Segundo Caltagirone et al. (2001), o aumento destes dois marcadores (FS e ST) deve promover o acúmulo de ferro nos tecidos, e este resultado foi observado no presente trabalho, onde o grupo Suplementado apresentou acúmulo de ferro no baço e fígado (órgãos que estocam ferro) comparados ao Controle e no coração em relação ao Deficiente (Tabela 6.4). Estes resultados estão em acordo com a literatura, uma vez que vários estudos têm reportado acúmulo de ferro em tecidos de ratos suplementados com ferro (REARDON et al., 2009; PEREIRA et al., 1999; YOUNES et al., 1989). Uma explicação plausível para este acúmulo de ferro, que parece contrariar a existência de um eficiente mecanismo molecular de regulação da absorção de ferro dietético, seria uma entrada de ferro no organismo via absorção paracelular (GONZALEZ et al., 1997), discutida previamente, o que burlaria o mecanismo de regulação da absorção de ferro no enterócito mediada pelo DMT-1. Como resultado desta absorção paracelular, o ferro seria depositado nos tecidos, já que a demanda de ferro é baixa e os níveis de hepcidina devem estar altos, devido a sua regulação mediada pelo estado corporal em ferro (ANDERSON et al., 2009).

O aumento inesperado na capacidade total de ligação de ferro (CTLF) observada nos ratos Suplementados (Tabela 6.2) contraria as expectativas, uma vez que em situações fisiológicas, a redução nos níveis de ferro sérico deveria resultar em um aumento da CTLF e a suplementação uma redução. (SMITH, 2000).

Os resultados encontrados no presente trabalho para as variáveis hematimétricas nos ratos Jovens (Tabela 6.2) foram semelhantes aos descritos por Lopez-Contreras et al. (2010), onde foi observada, em indivíduos idosos saudáveis (65-96 anos), uma correlação inversa entre idade e valores de hemoglobina. Indivíduos senescentes tendem a apresentar maior processo inflamatório em relação a indivíduos jovens, o que poderia explicar os dados encontrados, uma vez que o aumento de hepcidina, devido a

processos inflamatórios, resulta em menor mobilidade de ferro oriundo dos tecidos de reserva para as células alvo (NEMETH et al., 2006).

Esperava-se que o grupo Deficiente apresentasse menores estoques teciduais de ferro que o Controle, porém, apenas no músculo esquelético foi detectada redução significativa nos níveis de ferro em relação ao grupo Controle (Tabela 6.4). A ingestão prévia de altas quantidades de ferro dos ratos idosos, antes do início deste estudo, quando estes eram tratados com dieta comercial (aproximadamente 290 mg de ferro/Kg de ração) pode ter resultado em acúmulo de ferro nos tecidos durante o desenvolvimento dos ratos, e o período de 78 dias de depleção com a dieta deficiente em ferro, aos quais os ratos Deficientes foram submetidos no presente estudo, pode não ter sido suficiente para diminuir tais estoques na maioria dos tecidos estudados. A redução significativa que ocorreu nos músculos dos ratos Deficientes e a redução marginal ( $p = 0,114$ ) observada no coração destes ratos pode ser devida à especificidade tecidual, já os músculos são tecidos de alta atividade metabólica, que apresentam uma alta taxa de síntese protéica. Assim, os estoques de ferro podem ser depletados mais rapidamente do que os de tecidos como o fígado e baço, sítios de estoque e de reciclagem de ferro de hemoglobina senis, respectivamente.

Trabalhos anteriores já vêm associando o envelhecimento com o acúmulo de ferro em diferentes tecidos (BULVIK et al., 2011; HAHN et al., 2009; XU et al., 2008). Morton et al. (1998) mostraram que a aconitase, uma enzima do ciclo de Krebs que é também precursora da IRP, é um importante alvo da ação do superóxido em mamíferos. Isso pode explicar em parte o acúmulo de ferro, haja vista sua participação na regulação da absorção e exportação intracelular de ferro, via IRE/IRPs. Assim, apesar do grupo Deficiente ter ingerido menos ferro (Tabela 6.1), este continua sofrendo influência da idade, o que, provavelmente, sobrepujou a redução de ferro na ingestão. Isso também explica os dados encontrados no grupo Jovem, que apresentou menores níveis de ferro no baço, fígado e músculo esquelético em relação ao Controle (Tabela 6.4), reforçando a idéia de um acúmulo decorrente da idade.

No que diz respeito à atividade tecido específica das enzimas antioxidantes, a catalase mostrou resultados semelhante aos observados em

estudos anteriores (HALLIWELL et al., 2007), onde a maior atividade enzimática foi encontrado no fígado, seguido do rim, e no baço e coração não foram observadas diferenças significativas (Tabela 6.5). Ainda neste estudo, o músculo esquelético foi o órgão com a menor atividade de catalase dentre os órgãos estudados, onde a atividade não foi detectada por meio da metodologia utilizada. Estudos anteriores mostram uma baixa, porém detectável atividade desta enzima no músculo esquelético (HALLIWELL et al., 2007). A maior atividade da GPx observada no fígado e a menor atividade encontrada no músculo esquelético dos ratos em relação aos demais órgãos estudados (Tabela 6.5) está em acordo com resultados encontrados previamente (HALLIWELL et al., 2007). Diferentemente de estudos anteriores, onde foi observada uma alta atividade da GR no fígado e uma atividade moderada no rim (HALLIWELL et al., 2007), no presente estudo foi detectada maior atividade de GR no rim do que no fígado (Tabela 6.5). Este mesmo trabalho mostrou uma baixa atividade enzimática no músculo esquelético, da mesma forma que o presente estudo.

Os dados obtidos para atividade da Nox no presente trabalho não estão de acordo com o esperado (Figura 6.2), já que era esperado um aumento na atividade da Nox no grupo Suplementado e uma redução no Deficiente. Estudos anteriores mostram que metais podem estimular a ação da NADPH oxidase (JIANG et al., 2011). Li e Frei (2009) mostram que uma maior exposição ao ferro leva ao aumento da atividade da Nox endotelial. A análise de correlação de Pearson reforça estes resultados, tendo em vista que foi encontrada uma correlação negativa entre a Nox e marcadores do estado corporal em ferro, dentre eles o ferro sérico, no baço e intestino. Esperava-se que o grupo Jovem apresentasse menor atividade de Nox em relação ao Controle, tendo em vista estudos anteriores que mostraram um aumento da expressão e atividade da NADPH oxidase com o envelhecimento (VILLAR-CHEDA et al., 2010; AGO et al., 2010; DURRANT et al., 2009). Porém, no presente estudo, somente no baço ocorreu o esperado (Figura 6.2).

No presente estudo, a suplementação de ferro induziu diferentes respostas em cada enzima antioxidante, sendo também observada uma variação de atividade entre os tecidos (Figura 6.2). A menor atividade de

catalase encontrada no intestino do grupo Deficiente em relação ao Controle, bem como a maior atividade de GPx esplênica detectada no grupo Deficiente comparado com o Controle (Figura 6.2), sustentam uma ausência de resposta uniforme. Cand et al. (1989) mostraram nem sempre existe uma correlação entre a atividade de enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica em ratos idosos. Em um estudo com ratos suplementados com ferro, observou-se no músculo esquelético um aumento de atividade da GR e GPx, assim como aumento de MDA (REARDON et al., 2009). Em outro estudo, a alta ingestão dietética de ferro não alterou a atividade da catalase e GPx no fígado (LEE et al., 1981). Lapenna e colaboradores (1998) mostraram que na carótida, a catalase e a GPx são suprimidas pelo estresse oxidativo, porém, no presente estudo, foi observado no intestino um aumento da atividade da catalase, bem como aumento de peroxidação lipídica (aumento de MDA). Estes resultados reforçam a idéia de uma resposta tecido-específica.

Tendo em vista que o grupo Suplementado apresentou em todos os tecidos níveis maiores de, pelo menos, um marcador de estresse oxidativo (MDA ou carbonil) em comparação aos grupos Controle e Deficiente (Figura 6.1), podemos concluir que, de forma geral, o grupo Suplementado apresentou maior estresse oxidativo nos tecidos do que os outros grupos, porém o tipo de dano oxidativo (protéico ou lipídico) variou de acordo com o órgão. No grupo Deficiente, com exceção do baço e músculo esquelético, foi observado menor dano oxidativo protéico e/ou lipídico nos demais órgãos estudados, comparado aos grupos Controle e/ou Suplementado (Figura 6.1). Além disso, foram observados maiores níveis de GGT no grupo Suplementado e níveis menores no grupo Deficiente (Tabela 6.2), bem como uma correlação positiva entre os níveis plasmáticos de GGT e os níveis de ferro sérico (Tabela 6.6).

Um estudo realizado por LAINÉ e cols. (2006), em homens adultos que apresentavam acúmulo de ferro, mostrou que a redução dos estoques de ferro (redução de ferritina sérica para valores  $\leq 100$   $\mu\text{g/L}$ ) por meio de flebotomia resultou em uma diminuição dos níveis de GGT, um marcador de estresse oxidativo. Um estudo mais recente, conduzido em ratos jovens mostrou que a restrição dietética de ferro reduziu a produção de superóxido e os níveis de peróxido lipídico no fígado, pâncreas e plasma (MINAMIYAMA et

al., 2010). Estes dados, assim como os resultados mostrados no presente trabalho, sustentam a hipótese de que uma redução na ingestão de ferro apresenta um efeito protetor contra o estresse oxidativo.

A análise comparativa dos marcadores do estado em ferro e estresse oxidativo realizada no presente estudo mostrou, conforme esperado, que os ratos Jovens apresentaram menores níveis de danos oxidativos a lipídios no baço, fígado e coração comparados ao Controle, corroborando a hipótese de que o estresse oxidativo esteja associado ao processo de envelhecimento (HARMAN, 1956). Porém, no coração e no músculo esquelético foi encontrado um aumento nos danos oxidativos às proteínas e aos lipídios respectivamente (Figura 6.1), o que pode ser explicado por uma maior atividade metabólica e física destes dois tecidos nos ratos jovens comparados aos idosos, como maior frequência cardíaca, maior e mais eficiente contração muscular (DOWNES et al., 1989; THOMPSON e BROWN, 1999).

A grande variação na atividade das enzimas antioxidantes dos ratos Jovens encontrada no presente estudo (Figura 6.2), reforça os dados encontrados por Cand et al. (1989), que mostraram que as respostas das enzimas antioxidantes ao envelhecimento variam entre as enzimas e entre os tecidos. Sobocanec et al. (2008) mostraram, em um estudo em camundongos, que o envelhecimento levou a um aumento da atividade da GPx hepática, sem que houvesse aumento da catalase hepática, resultados semelhante aos observados no presente estudo. Um estudo em ratos, que verificou o efeito da idade sobre enzimas antioxidantes e danos oxidativos, mostrou que o envelhecimento está associado a um aumento de dano protéico sem alterações nos danos lipídicos, além disso, o autor mostra um declínio na atividade das enzimas antioxidantes com o decorrer da idade (TIAN et al., 1998). Aparentemente, os ratos jovens são mais resistentes à ação do  $O_2$  que os adultos, porém a partir dos 30 dias de idade, estes animais começam a perder esta vantagem (HALLIWELL et al., 2007).

Os danos causados pelo oxigênio nos organismos aeróbios variam de acordo com o tipo de espécie reativa, idade, estado fisiológico e dieta. Diferentes tecidos e diferentes células de um mesmo tecido podem ser afetados desigualmente (BALENTINE, 1982; JAMES et al., 1978). Além disso, a quantidade e composição das defesas antioxidantes diferem de um tecido



para outro e de um tipo celular para outro, dentro do mesmo tecido (FINKEL, 2005).

As correlações entre marcadores do estado corporal em ferro e a atividade de enzimas antioxidantes, bem como entre marcadores do estado corporal em ferro e estado oxidativo variaram entre os tecidos, não tendo sido observado um padrão de resposta para todos os tecidos. Estes resultados indicam que tanto a deposição de ferro quanto os danos oxidativos, bem como a resposta celular, são tecido-específicas. As baixas correlações, porém significativas, entre alguns dos marcadores do estado corporal em ferro e de estresse oxidativo podem ser resultante da resposta de cada tecido à regulação intrínseca e extrínseca, responsável pela manutenção da homeostase corporal.

Os dados apresentados no presente trabalho bem como os de estudos prévios nos levam a questionar a eficácia e as repercussões de programas de Saúde Pública adotados em alguns países, incluindo o Brasil. Desde julho de 2004, a fortificação de farinha de trigo e milho é obrigatória no Brasil. Programas de fortificação já foram adotados em outros países, como a Dinamarca, onde não foram observados resultados satisfatórios na prevenção da anemia (MILMAN et al., 2002; OSLER et al., 1999). Na Venezuela, a fortificação das farinhas reduziu em 50% a prevalência de anemia na população (LAYRISSE et al., 1996). Diversos fatores devem ser levados em consideração na avaliação destes resultados. O acesso da população a alimentos fonte de ferro é um deles. Na Dinamarca o farto acesso a estes alimentos mostrou que, mesmo após a interrupção da fortificação, houve um aumento no número de casos de excesso de ferro (MILMAN et al., 2002; OSLER et al., 1999). Na Venezuela, a fortificação foi feita depois de uma crise econômica (LAYRISSE et al., 1996), onde provavelmente o acesso da população à alimentos ricos em ferro era baixo. No Brasil, dados divulgados pelo IBGE (2008-2009) mostram que a carne vermelha está entre os alimentos mais consumidos no país (63,2 g/d). Estes dados ainda mostram um baixo consumo de frutas, verduras e legumes, o qual corresponde a cerca de um quarto do recomendado.

## 8. CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos neste trabalho podemos concluir que o excesso de ferro dietético, bem como a redução da ingestão dietética de ferro, resultam em alterações tecido específica nas atividades de enzimas antioxidantes de ratos senescentes. A ausência de um padrão de alteração comum entre as enzimas dos tecidos estudados pode ser devido às diferentes respostas celulares de cada tecido, conforme sua função e processos específicos de regulação desta função.

Os resultados do presente estudo mostraram, também, que a alta e a baixa ingestão de ferro dietético podem aumentar ou diminuir, respectivamente, os danos oxidativos em ratos senescentes. Porém, o tipo e a intensidade do dano oxidativo também é tecido específica. A partir destes resultados podemos inferir que o ferro pode, sim, apresentar uma importante participação no processo de envelhecimento, não apenas pelo aumento do estresse oxidativo em razão do aumento da ingestão dietética de ferro, mas também pelo acúmulo de ferro tecidual nos ratos idosos. Provavelmente este acúmulo é o responsável pelo aumento do estresse oxidativo verificado nos ratos idosos em relação aos jovens.

Finalmente, considerando-se: as diferentes necessidades de ferro de cada indivíduo; a grande variação do consumo de alimentos fontes de ferro na população em geral; a associação acúmulo de ferro tecidual em diversos processos patológicos e no envelhecimento; a baixa ingestão de alimentos ricos em antioxidantes e fitoquímicos, como frutas e verduras, observada no último censo da população brasileira (IBGE 2008-2009); e ainda tendo em vista as limitações deste modelo de estudo, desenvolvido em ratos, os resultados do presente estudo levantam preocupação adicional ao programa governamental de fortificação mandatória das farinhas de milho e trigo com ferro, implantado em todo o território nacional, desde 2004. O monitoramento de toda a população brasileira não só quanto ao estado corporal em ferro, mas também quanto ao estado oxidativo deve ser estimulado para que seja possível avaliar este programa quanto a sua eficácia no combate a anemia e na promoção da saúde no Brasil. Posto que, a adoção desta política pode estar, por um lado, contribuindo para reduzir a prevalência de anemia no país

e, por outro, pode estar promovendo o aumento da incidência de doenças crônicas associadas ao envelhecimento da população.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGO, T. et al. The NADPH Oxidase Nox4 and Aging in the Heart. **Aging**, v. 2, n. 12, 2010.

ALTUN, M. et al. Iron load and redox stress in skeletal muscle of aged rats. **Muscle & nerve**, v. 36, n. 2, p. 223-33, 2007.

ANDERSON, G. J. et al. Iron absorption and metabolism. **Current Opinion in Gastroenterology**, v.25, p. 129–135, 2009.

ATAMNA, H. et al. Heme deficiency selectively interrupts assembly of mitochondrial complex IV in human fibroblasts: relevance to aging. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, n. 51, issue 21, p. 48410-48416, 2001.

BABBS, C.F. Free-radicals and the etiology of colon cancer, **Free radical biology & medicine**, vol. 8, p. 191–200, 1990.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v. 93, p. 1464–1476, 1999.

BARANOWSKA, I. et al. The analysis of lead, cadmium, zinc, copper and nickel content in human bones from the upper Silesian industrial district. **The Science of the Total Environment**, v. 159, n. 2-3, p.155-62, 1995.

BALENTINE, J. D. Pathology of O<sub>2</sub> toxicity. **Academic Press**, 1982.

BEDARD, K. et al. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 87, p. 245–313, 2007.

BULVIK, B. E. et al. Aging is an organ-specific process: changes in homeostasis of iron and redox proteins in the rat. **Age**, [Epub ahead of print], 2011.

BYUNG, P. Y. Cellular Defenses Against Damage From Reactive Oxygen Species. **Physiological Reviews**, v. 74, n. 1, 1994.

CADENAS, E. Basic mechanisms of antioxidant activity. **Biofactors**, v. 6, Issue 4, p. 391-397, 1997.

CALTAGIRONE, A. Modulation of cellular iron metabolism by hydrogen peroxide: effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the expression and function of iron-responsive element-containing mRNAs in B6 fibroblasts. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 276, n. 23, p. 19738-19745, 2001.

CAND, F. et al. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and lipid peroxidation in the major organs of the aging rats. **Free Radical in Biology Medicine**, v. 7, p. 59-63, 1989.

CANDAN, N.; TUZMEN N. Very rapid quantification of malondialdehyde (MDA) in rat brain exposed to lead, aluminium and phenolic antioxidants by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. **Neurotoxicology**, v. 29, p. 708–713, 2008.

CHEN, H. et al. Changes in iron-regulatory proteins in the aged rodent neural retina. **Neurobiology of Aging**, v. 30, n. 11, p. 1865-1876, 2009.

CRICHTON, R. R. et al. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 25, n. 91(1), p. 9-18, 2002.

DEUGNIER, Y. et al. Iron and hepatocellular carcinoma, **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 16, p. 491–494, 2001.

DOMINICI, S. et al. Prooxidant reactions promoted by soluble and cell-bound  $\gamma$ -glutamyltransferase activity. **Methods in Enzymology**, v. 401, p. 483-500, 2005.

DONAVAN, A. et al. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. **Cell Metabolism**, v. 1, n. 3, p. 191–200, 2005.

DOWNES, T. R. et al. Mechanism of altered pattern of left ventricular filling with aging in subjects without cardiac disease. **American Journal of Cardiology**, v. 64, p. 523–527, 1989.

DURRANT, J. R. et al. Voluntary wheel running restores endothelial function in conduit arteries of old mice: direct evidence for reduced oxidative stress, increased superoxide dismutase activity and down-regulation of NADPH oxidase. **The Journal of Physiology**, v. 587, n. 13, p. 3271–3285, 2009.

ELLERVIK, C. et al. Total mortality by transferrin saturation levels: two general population studies and a metaanalysis. **Clinical Chemistry**, v. 57, n. 3, p. 459-466, 2011.

FINKEL, T. et al. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239-247, 2000.

FINKEL, T. Radical Medicine: treating aging to cure disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, p. 971-976, 2005.

FRAZER, D. M. et al. The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues? **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 30, n. 3, p. 288-297, 2003.

FRIDOVICH I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **The Journal of Experimental Biology**, v. 201, n. 8, p. 1203-1209, 1998.

GALARIS, D. et al. Oxidative stress and aging: the potential role of iron. **Hormones**, v. 7, n. 2, p. 114-22, 2008.

GONZALEZ, P. K. et al. Role of oxidant stress and iron delocalization in acidosis-induced intestinal epithelial hyperpermeability. **Shock**, v. 8, n. 2, p. 108-114, 1997.

GOYAL, M. M. et al. Human catalase: looking for complete identity. **Protein & Cell**, v. 1, n. 10, p. 888–897, 2010.

GUARATINI, T. et al. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 206-213, 2007.

GUENGERICH, F. P. et al. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 14, n. 6, p. 611-650, 2001.

HAAN, J. B. et al. Elevation in the ratio of Cu/Zn-superoxide dismutase to glutathione peroxidase activity induces features of cellular senescence and this effect is mediated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Human Molecular Genetics**, v. 5, n. 2, p. 283-292, 1996.

HAHN, P. et al. Age-dependent and gender-specific changes in mouse tissue iron by strain. **Experimental Gerontology**, v. 44, p. 594–600, 2009.

HALLIWELL, B. et al. Free radicals in biology and medicine. Bioscience Oxford, New York, 2007.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **Journal of Gerontology**, 1956.

HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 422, 1972.

HAYES, J. D. et al. GSH transferases. **The Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 51-88, 2005.

HENTZE M. W. et al. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. **Cell**, v. 117, n. 3, p. 285-97, 2004.

HERMES, L. M.; STOREY, K. B. Relationship between anti-oxidant potential and anoxia tolerance of the frog *Rana pipiens*. **American Journal of Physiology**, v. 271, p. R918-R925, 1996.

HERMES, L. M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: STOREY, K. B. **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, p. 319-368, 2004.

HO, Y. S. et al. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 31, p. 32804–32812, 2004

IBGE. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009 – avaliação nutricional da disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 04 de agosto de 2011.

JAMES, P. K. et al. The effect of dietary fatty acids on the composition of adult rat lung lipids: Relationship to oxygen toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 44, Issue 2, p. 423-430, 1978.

JIANG, F. et al. NADPH Oxidase-Mediated Redox Signaling: Roles in Cellular Stress Response, Stress Tolerance, and Tissue Repair. **Pharmacological Review**, v. 63, p. 218–242, 2011.

JOANISSE, D. R. et al. Oxidative damage and antioxidants in *Rana sylvatica*, the freeze-tolerant wood frog. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 271, p. R545-R553, 1996.

KILLILEA, D. W. et al. Iron accumulation during cellular senescence in human fibroblasts in vitro. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 5, n. 5, p. 507-516, 2003.

KIRKMAN, H. N. et al. Mechanisms of Protection of Catalase by NADPH. **The journal of biological chemistry**, v. 274, n. 20, p.13908–13914, 1999.

LACHANCE, K. et al. Oral Ferrous Sulfate Does Not Increase Preoperative Hemoglobin in Patients Scheduled for Hip or Knee Arthroplasty. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 45, n. 6, p. 764-770, 2011.

LAINÉ, F. et al. Effects of phlebotomy therapy on cytochrome P450 2e1 activity and oxidative stress markers in dysmetabolic iron overload syndrome: a randomized trial. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 24, 1207-1213, 2006.

LAPENNA, D. et al. Glutathione-related antioxidant defenses in human atherosclerotic plaques. **Circulation**, v. 97, p. 1930–1934, 1998.

LARDINOIS, O. M. Reactions of bovine liver catalase with  $O_2^{\cdot-}$  and  $H_2O_2$ . **Free Radical Research**, v. 22, n. 3, p. 251-274, 1995.

LEE, Y. H. et al. Response of glutathione peroxidase and catalase to excess dietary iron in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 111, n. 12, p. 195-202, 1981.

LEOPOLD, J. A. et al. Oxidative Enzymopathies and Vascular Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, p. 1332, 2005.

LEVIN, S. et al. Effects of Two Weeks of Feed Restriction on Some Common Toxicologic Parameters in Sprague-Dawley rats. **Toxicologic Pathology**, v. 21, n. 1, 1993.

LI, L. et al. Prolonged exposure to LPS increases iron, heme, and p22phox levels and NADPH oxidase activity in human aortic endothelial cells: Inhibition by desferrioxamine. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 29, n. 5, p. 732–738, 2009.

LIM, J. et al. Is serum  $\gamma$ -glutamyltransferase inversely associated with serum antioxidants as a marker of oxidative stress? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 37, n. 7, p. 1018–1023, 2004.

LOPEZ-CONTRERAS, M. J. Dietary intake and iron status of institutionalized elderly people: relationship with different factors. **The Journal of Nutrition, health and aging**, v. 14, n. 10, p. 816-821, 2010.

MA, Y. Response to the increase of oxidative stress and mutation of mitochondrial DNA in aging. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, Issue 10, p. 1021-9, 2009.

MARZOCCO, L. et al. **Bioquímica Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MILMAN, N. et al. Iron status in Danish men 1984-94: a cohort comparison of changes in iron stores and the prevalence of iron deficiency and iron overload. **European Journal of Haematology**, v. 68, n. 6, p. 332-40, 2002.

MINAMIYAMA, Y. et al. Iron restriction improves type 2 diabetes mellitus in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 298, p. E1140-E1149, 2010.

MORTON, R. L. et al. Loss of lung mitochondrial aconitase activity due to hyperoxia in bronchopulmonary dysplasia in primates. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 274, p. 127-133, 1998.

MOLLER, M. et al. Direct measurement of NO<sup>•</sup> and O<sub>2</sub> partitioning into liposomes and LDL. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 8850-8854, 2005.

MULLER, F. et al. The nature and mechanism of superoxide production by the electron transport chain: Its relevance to aging. **Journal of the American Aging Association**, v. 23, n. 4, p. 227-253, 2000.

NAGABABU, E. et al. Reaction of hydrogen peroxide with ferrylhemoglobin: superoxide production and heme degradation. **Biochemistry**, v. 10, n. 39, issue 40, p. 12503-12511, 2000.



NELSON, D. L. et al. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. New York: Worth Publishers Inc., 2002.

NELSON, R. L. Dietary iron and colorectal-cancer risk, **Free radical biology & medicine**, v. 12, p. 161–168, 1992.

NEMETH, E. et al. Regulation of iron metabolism by hepcidin. **Annual Review of Nutrition**, v. 26, 323-342, 2006.

PEREIRA, M.C. et al. Histological effects of iron accumulation on mice liver and spleen after administration of a metallic solution. **Biomaterials**, v. 20, p. 2193-2198, 1999.

POLLA, A. S. et al. Iron as the malignant spirit in successful ageing. **Ageing Research Reviews**, v. 2, p. 25–37, 2003.

POLLA, B. S. Therapy by taking away: the case of iron. **Biochemical Pharmacology**, v. 57, p. 1345-1349, 1999.

POMPELLA, A. et al.  $\gamma$ -Glutamyltransferase, redox regulation and cancer drug resistance. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 7, p. 360–366, 2007.

PRATT, D. A. et al. Free Radical Oxidation of Polyunsaturated Lipids: New Mechanistic Insights and the Development of Peroxyl Radical Clocks. **Accounts of Chemical Research**, *in press*, <WWW>. Acessado em 15/06/2011.

QIU, A. et al. Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. **Cell**, v. 127, p. 917–928, 2006.

REARDON, T. F. et al. Iron injections in mice increase skeletal muscle iron content, induce oxidative stress and reduce exercise performance. **Experimental Physiology**, v. 94, n.6, p. 720–730, 2009.

REEVES, P. G. et al. 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. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

RICHERT, S. et al. Assessment of Skin Carbonyl Content as a Noninvasive Measure of Biological Age. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 397, n. 2, p. 430–432, 2002.

SABORIDO, A. et al. Isolated respiring heart mitochondria release reactive oxygen species in states 4 and 3. **Free Radical Research**, v. 39, n. 9, p. 921-31, 2005.

SIQUEIRA, Papel adverso do ferro no organismo. **Comunicação em Ciências da Saúde**, v. 17, n. 3, p. 229-236, 2006.

SMITH, D. L. Anemia in the elderly. **American Family Physician**, v. 62, p. 1565-1572, 2000.

SOBOCANEC, S. et al. Differential response to lipid peroxidation in male and female mice with age: correlation of antioxidant enzymes matters. **Biogerontology**, v. 9, p. 335–343, 2008.

SOUZA, H. P. Quantitation of superoxide generation and substrate utilization by vascular NAD(P)H oxidase. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 282, p. H466-H474, 2002.

STARK, A. A. et al. Glutathione metabolism by  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase leads to lipid peroxidation: characterization of the system and relevance to hepatocarcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 14, p. 183-189, 1993.

STEINBRENNER, H. et al. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, Issue 10, p. 1478-1485, 2009.

TERADA, L. S. Specificity in reactive oxidant signaling: think globally, act locally. **The Journal of Cell Biology**, v. 174, p. 615–623, 2006.

TIAN, L. et al. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 24, n. 9, p. 1477–1484, 1998.

THOMPSON, L. V.; BROWN, M. Age-related changes in contractile properties of single skeletal fibers from the soleus muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 86, p. 881-886, 1999.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 10, n. 160, p. 1-40, 2006.

VILLAR-CHEDA, B. et al. Aging-related changes in the nigral angiotensin system enhances proinflammatory and pro-oxidative markers and 6-OHDA-induced dopaminergic degeneration. **Neurobiology of Aging**, [Epub ahead of print], 2010.

XU, J. et al. Iron Accumulation with Age, Oxidative Stress and Functional Decline. **Plos One**, v. 3, Issue 8, e2865, 2008.

YOO, J. et al. Oxidative Status in Iron-Deficiency Anemia. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 23, n. 5, p. 319–323, 2009.

YOUNES, M. et al. Effect of Iron Overload on Spontaneous and Xenobiotic-induced Lipid Peroxidation in vivo. **Journal Of Applied Toxicology**, v. 9, n. 2, p. 103-108, 1989.