

LORENA FERNANDES ARRUDA

Influência do Teor de Ferro Dietético na Expressão de Genes Reguladores do  
Metabolismo de Ferro, Estresse Oxidativo e Marcadores do Envelhecimento em  
Ratos Adultos

BRASÍLIA, 2013

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LORENA FERNANDES ARRUDA

Influência do Teor de Ferro Dietético na Expressão de Genes Reguladores do Metabolismo de Ferro, Estresse Oxidativo e Marcadores do Envelhecimento em Ratos Adultos

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa Dra Egle Machado de Almeida Siqueira

BRASÍLIA

2013

FOLHA DE APROVAÇÃO  
LORENA FERNANDES ARRUDA

Influência do Teor de Ferro Dietético na Expressão de Genes Reguladores do Metabolismo de Ferro, Estresse Oxidativo e Marcadores do Envelhecimento em Ratos Adultos

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós – Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovada em 29 de Abril de 2013.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Egle Machado de Almeida Siqueira (UnB)

Profa Dra. Maria do Carmo Gouveia Peluzio (UFV)

Profa Dra Maria de Fátima Borin (UnB)

Profa Dra Élide Geralda Campos (UnB)

Profa Dra Nathalia Marcolini Pelucio Pizato Valério (UnB)

Profa Dra Ildinete Silva Pereira (UnB)

“Feliz do homem que encontrou a sabedoria,  
daquele que adquiriu a inteligência,  
porque mais vale este lucro que o da prata,  
e o fruto que se obtém é melhor que o fino ouro”.

(PROVERBIOS 3:13-14)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela vida, por sua presença constante em minha vida e por tornar tudo possível. Proporcionando força, perseverança e persistência, além de iluminar os caminhos e abençoar a vida com proteção, sabedoria, humildade e misericórdia.

Aos meus pais, Diva e Francisco e as minhas irmãs, Andréa e Sandra, que sempre primaram pela Educação; obrigada pelo apoio, oportunidade de estudo e incentivo. Ao Ogui pelo carinho e companheirismo.

A Profa. Egle Machado de Almeida Siqueira por ter acreditado em meu trabalho, por ter sido um exemplo profissional e humano; pela oportunidade de crescimento científico, produzindo novos conhecimentos, sendo esta uma pesquisadora personificada, sempre induzindo a pensar criticamente.

A Profa. Sandra pela co-orientação, pelo apoio intelectual, científico, pelo exemplo de dedicação, pela orientação, profissionalismo e sempre primando pelo profissionalismo com humildade e ética.

Ao Prof. Fernando Fortes de Valencia pelo conhecimento compartilhado no desenvolvimento de novas técnicas, pelo amor a ciência, pelas constantes demonstrações de sabedoria e humildade.

Ao Leandro, Camila e Ana Paula eternos amigos, sempre presentes a qualquer hora e situação, por sempre me apoiarem a dedicação ao trabalho, aceitarem os estresses, as ausências de tempo e as crises!

A Marcela pela companhia a qualquer hora, carinho, fé, amizade, conversas, incentivação, modelo de amor à ciência, momentos de bancada e descontração.

A Fabiani pelo carinho, amizade, companheirismo, fé e força.

Ao Sr Francisco Erivan, Chiquinho, pela companhia, apoio técnico, conversas, experiência de vida, lanches e profissionalismo; exemplo de honestidade e dedicação ao trabalho. A Dona "Santinha", Sra Aurícia, pelo carinho, exemplo de dedicação ao trabalho, sem cansaço, sempre alegre, exemplo de fé e honestidade.

Aos ratos *Wistar* por terem sacrificado suas vidas em prol do desenvolvimento científico e em busca de aumentar a expectativa de vida dos seres humanos.

Aos colegas do laboratório de Biofísica, Adriana, Alinne, Fabiani, Fernanda, João, Juliana, Leandro, Luana, Luciano, Marcos Burger, Marcela e Natália pela companhia, momentos de bancada e descontração; divisão de mesas, equipamentos, reagentes, pipetas, ponteiras, longas conversas, cafés na copa e discussões científicas.

Ao Laboratório de Biologia Molecular, em especial a Profa Maria Sueli Soares Felipe, por ter concedido o espaço e a tecnologia de seu laboratório para o desenvolvimento de parte dos experimentos moleculares. E ao Laboratório de Geoquímica do Prof. Geraldo R. Boaventura e dos técnicos Fernando e Myller por terem cedido equipamento para realização de análises.

As professoras Élide G. Campos, Ildinete S. Pereira, Maria de Fátima Borin, Maria do Carmo G. Peluzio e Nathalia M. P. Pizato Valério por terem aceitado participar da banca dessa defesa e por contribuir com esse trabalho.

Ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq/Brasil, Decanato de Pesquisa e Pós-graduação da UnB (DPP-UnB) e a Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF).

A estrada para o sucesso não é reta.

Há uma curva chamada fracasso,

um trevo chamado confusão,

quebra-molas chamado família.

Mas se você tiver um estepe chamado determinação,

um motor chamado Fé e

um motorista chamado Deus,

você chegará a um lugar chamado SUCESSO.

(autor desconhecido)

## RESUMO

**Introdução** O ferro é um elemento essencial para a vida, no entanto, o ferro livre no organismo pode participar de reações oxiredutoras, produzindo espécies reativas de oxigênio que geram danos oxidativos moleculares, aumentando o risco a doenças crônicas, que contribuem para o processo de envelhecimento tecidual. Ao longo da evolução, os organismos vivos desenvolveram um mecanismo eficiente que regula a absorção de ferro de acordo com o seu teor no corpo, capaz de evitar o excesso desse metal altamente reativo nos tecidos. **Objetivo** Investigar os efeitos da restrição e da suplementação com ferro dietético sobre biomarcadores de estresse oxidativo, do estado corporal de ferro, do envelhecimento e do processo inflamatório em ratos adultos. **Metodologia** Ratos Wistar machos adultos foram alimentados com dietas contendo 10, 35 ou 350 mg de ferro / kg de dieta (grupos restrito em ferro (ARF), controle (CT) e enriquecidos com ferro (AEF), respectivamente) por 78 dias. Adicionalmente, ratos com idade de dois meses foram incluídos como grupo jovem para comparação com os adultos controle. A concentração de ferro nos tecidos foi determinada por espectroscopia de emissão atômica. Os níveis de transcritos de genes marcadores do estado corporal de ferro, estado redox, estado inflamatório e do envelhecimento foram determinados pela técnica de amplificação utilizando o sistema de reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR). E a determinação da proteína hepática ferritina foi realizada por *western blotting*. **Resultados** Os ratos do grupo jovem apresentaram maiores valores de hematócrito e hemoglobina, níveis mais baixos de ferro tecidual e menores níveis de malondialdeído (MDA) ou carbonil na maioria dos tecidos estudados. Os ratos jovens mostraram ainda níveis mais elevados de mRNA da proteína 30 marcadora de envelhecimento (SMP30) nos rins, bem como níveis hepáticos reduzidos de mRNA de hepcidina (Hamp) e interleucina-1 $\beta$  (Il1b). Contrariando as expectativas, os ratos jovens apresentaram níveis de transcritos mais elevados de L-ferritina (Ftl) hepática e cardíaca, embora, no fígado, os níveis da proteína Ftl tenha sido menor em relação aos ratos adultos controle. A dieta restrita em ferro reduziu as concentrações de ferro no músculo esquelético e os danos oxidativos na maioria dos tecidos estudados e, semelhante aos ratos jovens, aumentou os níveis de transcritos da Ftl no coração em relação ao grupo controle. A dieta enriquecida com ferro

aumentou os valores de hematócrito, ferro sérico, da concentração da gama-glutamil transferase e das concentrações de ferro e de danos oxidativos moleculares, na maioria dos tecidos. Além disso, os ratos enriquecidos com ferro apresentaram no fígado um aumento nos níveis de transcritos do fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nfe2l2) e da interleucina 1 $\beta$  (Il1b) e, no intestino, estes ratos apresentaram um aumento nos níveis de transcritos do transportador de metal divalente 1 (Slc11a2) em relação ao grupo controle. **Conclusão** Estes resultados sugerem que a suplementação de ferro em ratos adultos possa acelerar o processo de envelhecimento, por meio do aumento do estresse oxidativo, enquanto que a restrição dietética de ferro poderia retardá-lo. Os resultados sugerem ainda que ratos idosos sejam mais vulneráveis ao aumento de ferro dietético devido à saturação do sistema de regulação da absorção de ferro, mediado pela hepcidina. Ressalvadas as limitações do modelo animal utilizado, o consumo crônico de alimentos fortificados com ferro pode resultar em aumento dos estoques de ferro no corpo e, conseqüentemente, aumento do estresse oxidativo, principalmente nos indivíduos idosos, acelerando o processo de envelhecimento da população.

Palavras-chave: Ferro; envelhecimento; estresse oxidativo; expressão gênica.

## ABSTRACT

**Introduction** Iron is an essential element for life, however, in its free form, iron participates in redox-reactions producing reactive oxygen species that increase molecular oxidative damage and the risk to chronic diseases, which contribute to the tissue aging process. Throughout the evolution, living organisms have evolved an efficient mechanism that regulates iron absorption in accordance with body iron requirement, and avoids the excess of this highly reactive metal in tissues. **Objective** Investigate the effects of the consumption of restricted or enriched iron diets on biomarkers of: oxidative stress; body iron status; aging and inflammatory process, in adult rats. **Methods** Male adult Wistar rats were fed diets containing 10, 35 or 350 mg iron / kg diet (adult restricted-iron - ARF, adult control-iron - CT and adult enriched-iron - AEF groups, respectively), for 78 days. Additionally, rats aged two months were included as a young control group for comparison with the adult control. The concentration of iron in the tissues was determined by atomic emission spectroscopy. The transcript levels of genes markers of the body iron status, redox status, aging and inflammatory process were determined by the amplification system using the polymerase chain reaction in real time (qPCR). The ferritin liver protein determination was performed using western blotting. **Results** Young control group showed higher hemoglobin and hematocrit values, lower levels of tissue iron and lower levels of malondialdehyde (MDA) and carbonyl in the major studied tissues. The young rats also showed higher levels of mRNA senescence marker protein 30 (SMP30) on kidney, as well as lower mRNA levels of hepatic hepcidin (Hamp) and interleukin-1  $\beta$  (Il1b). Contrary to expectations, the young rats showed higher transcript levels of heart and hepatic L-Ferritin (Ftl), although, in the liver, Ftl protein levels have been lower compared to adult rats control. Restricted-iron diet reduced iron concentrations in skeletal muscle and oxidative damage in the majority of tissues and similar to young rats, increased transcript levels of Ftl in the heart in relation to the control group. Enriched-iron diet increased hematocrit values, serum iron, the concentration of gamma-glutamyl transferase and iron concentrations and molecular oxidative damage in the majority of tissues. In addition, enriched-iron adult rats showed in liver increased transcript levels of nuclear factor erythroid derived 2 like 2 (Nfe2l2) and interleukin 1 $\beta$  (Il1b) and, in gut, these rats showed increased transcript

levels of divalent metal transporter-1 (Slc11a2) than the control group. Conclusion These results suggest that iron supplementation in adult rats may accelerate aging process by means of increased oxidative stress, whereas iron dietary restriction may retards it. The results also suggest that aged rats are more vulnerable to increased dietary iron concentration due to saturation of the iron absorption regulation system mediated by hepcidin. Considering the limitations of the animal model used, the chronic consumption of iron-fortified foods may result in increased iron stores in the body and, consequently, increased oxidative stress, especially in older people, accelerating the aging process in population.

Keywords: Iron; aging; oxidative stress; gene expression.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura</b>	<b>Legenda</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1:</b>	Demografia da população por idade em populações rurais e urbanas, em 1975 e 2005. Os dados são estratificados por estrutura social urbano / rural (painéis superior / inferiores), o status econômico de país desenvolvimento (painéis esquerda / direita), sexo (categoria eixo a esquerda / direita) e faixa etária (eixo de valor) em dois tempos instantâneos, 1975 e 2005. Os gráficos são baseados em dados coletados e relatados pela Divisão de População das Nações Unidas em 2009.	23
<b>Figura 2:</b>	Projeções do estado do envelhecimento e da saúde (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION / MERCK INSTITUTE OF AGING - ONU 2004).	24
<b>Figura 3:</b>	Número de pessoas com 60 anos ou mais: Mundo, países desenvolvidos e em desenvolvimento, 1950 – 2050. Fonte: DESA: Envelhecimento da População Mundial 2011, baseado no cenário mediano da projeção feita em Perspectivas da População Mundial: Revisão 2010, da Divisão de População do DESA – Departamento de Assuntos Econômicos e Sociais das Nações Unidas.	24
<b>Figura 4:</b>	Expectativa de vida saudável no nascimento por país em 2010. (A) Expectativa de vida saudável dos homens e (B) expectativa de vida saudável das mulheres.	25
<b>Figura 5:</b>	Absorção, distribuição e reciclagem de ferro no corpo e troca quantitativa de ferro entre as fontes de ferro corporal.	35
<b>Figura 6:</b>	O papel fundamental da sobrecarga de ferro e a toxicidade do ferro.	36
<b>Figura 7:</b>	Regulação do metabolismo de ferro sistêmico.	39
<b>Figura 8:</b>	Regulação sistêmica do tráfego de ferro por hepcidina.	41
<b>Figura 9:</b>	Homeostase do Ferro intracelular.	46
<b>Figura 10:</b>	Concentração de ferro nos tecidos dos ratos jovens e dos ratos adultos tratados com dieta controle, dieta com restrição de ferro (ARF) e enriquecida com ferro (AEF) ( $\mu\text{g}$ de Ferro / g de tecido).	71
<b>Figura 11:</b>	Quantificação do mRNA hepático da proteína 30 marcadora de envelhecimento (SMP30), Ferritina de cadeia leve (Ftl), Hpcidina (Hamp), CREBh (Creb3l3), fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 e da interleucina 1 $\beta$ (Il1b) dos ratos jovens e dos ratos adultos tratados com a dieta controle, dieta com	72

restrição de ferro (ARF) e enriquecida com ferro (AEF) (razão mRNA Gene /  $\beta$ -actina).

- Figura 12:** Quantificação do mRNA de Ferritina (Ftl) do tecido cardíaco, SMP30 do tecido renal e Slc11a2 no intestino dos ratos jovens e dos ratos adultos tratados com a dieta controle, dieta com restrição de ferro (ARF) e enriquecida com ferro (AEF) (razão mRNA Gene /  $\beta$ -actina). 73
- Figura 13:** Níveis da proteína ferritina de cadeia leve hepática pela análise de *Western Blotting* dos ratos jovens e dos ratos adultos tratados com dieta controle, dieta com restrição de ferro (ARF) e enriquecida com ferro (AEF). 74
- Figura A1:** Concentração de malondialdeído (MDA) (A) e de proteína carbonilada (B) em homogeneizados de fígado, baço, coração, rim, intestino e músculo esquelético de ratos jovens e ratos adultos tratados com dieta controle, dieta com restrição de ferro (ARF) e dieta enriquecida com ferro (AEF) (nmoles de MDA / mg de proteína e de nmoles de carbonil / mg de proteína). 94
- Figura A2:** Atividade específica de catalase (A), GR (B), GPX (C), GST (D) e Nox (E) dos homogeneizados dos tecidos dos ratos jovens e dos ratos adultos tratados com dieta controle, dieta com restrição de ferro (ARF) e dieta enriquecida com ferro (AEF) (U/mg de proteína). 95

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>	<b>Legenda</b>	<b>Página</b>
<b>Tabela 1:</b>	Composição da dieta AIN-93M para roedores adultos em manutenção.	57
<b>Tabela 2:</b>	Contribuição dos elementos minerais na composição da mistura mineral da dieta AIN-93M para roedores adultos em manutenção.	58
<b>Tabela 3:</b>	Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na reação de qPCR.	65
<b>Tabela 4:</b>	Consumo de dieta, consumo de ferro, peso corporal inicial e final dos ratos adultos tratados com dieta controle, dieta com restrição de ferro (ARI) e enriquecida com ferro (AEI) durante 78 dias de tratamento.	69
<b>Tabela 5:</b>	Parâmetros hematológicos dos ratos jovens e dos ratos adultos tratados com dieta controle, dieta com restrição de ferro e enriquecida com ferro.	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

•NO -	Óxido nítrico
<sup>1</sup> O <sub>2</sub> -	Oxigênio singleto
AEI -	Adulto com enriquecimento de ferro
ARI -	Adulto com restrição de ferro
CEUA -	Comitê de Ética no Uso Animal
Creb3I3 / CREBh -	Fator de transcrição do elemento responsivo ao AMP cíclico ligado a proteína H
DcytB -	Citocromo duodenal B
DEPC -	Dietilpirocarbonato
DMT1 -	Transportador de metal divalente
EDTA -	Etilenodiamino Tetracético
EROS -	Espécies reativas de oxigênio
Fe <sup>2+</sup> -	Ferro ferroso
Fe <sup>3+</sup> -	Ferro férrico
Ftl -	Ferritina de cadeia leve
GGT -	Gama glutamil transferase
GST -	Glutathione S- transferase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -	Peróxido de hidrogênio
Hamp -	Gene da hepcidina
Il1β -	Interleucina 1 β
IRE -	Elemento responsivo ao ferro
IRP -	Proteína reguladora de ferro
MDA -	Malondialdeído
NADPH -	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase
Nfe2I2 / Nrf2 -	Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2

$O_2^{\cdot -}$ -	Superóxido
$OH^{\cdot}$ -	Hidroxil
$ONOO^-$ -	Peroxinitritos
PCR -	Proteína C reativa
qPCR -	Reação da polimerase em cadeia quantitativa
Slc11a2 -	Gene do transportador de metal divalente 1
SMP30 -	Proteína 30 marcadora de envelhecimento

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	19
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	22
<b>2.1. ENVELHECIMENTO</b>	22
<b>2.2. ESTRESSE OXIDATIVO e EROS</b>	30
<b>2.3. FERRO</b>	32
<b>2.3.1. ABSORÇÃO DE FERRO</b>	38
<b>2.4. MARCADORES MOLECULARES DO ESTADO CORPORAL DE FERRO</b>	40
<b>2.4.1. HEPCIDINA</b>	40
<b>2.4.2. FERRITINA</b>	44
<b>2.4.3. DMT-1 – TRANSPORTADOR DE METAL DIVALENTE-1</b>	47
<b>2.5. MARCADORES MOLECULARES DO ESTADO REDOX</b>	48
<b>2.5.1. CREBh</b>	48
<b>2.5.2. Nrf2 – FATOR NUCLEAR ERITRÓIDE 2 RELACIONADO AO FATOR 2</b>	49
<b>2.6. MARCADORES MOLECULARES DO ENVELHECIMENTO</b>	50
<b>2.6.1. PROTEÍNA 30 MARCADORA DE ENVELHECIMENTO (SMP30)</b>	50
<b>2.6.2. FERRITINA</b>	52
<b>2.6.3. HEPCIDINA</b>	53
<b>2.7. MARCADOR MOLECULAR DA RESPOSTA</b>	53

	<b>INFLAMATÓRIA</b>	
2.7.1.	<b>IL1<math>\beta</math> – INTERLEUCINA 1-<math>\beta</math></b>	53
3.	<b>OBJETIVO GERAL</b>	55
3.1.	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	55
4.	<b>METODOLOGIA</b>	56
4.1.	<b>ANIMAIS</b>	56
4.2.	<b>RECORDATÓRIO DE PESO E CONSUMO DE DIETA</b>	60
4.3.	<b>ESTADO CORPORAL de FERRO</b>	60
4.4.	<b>DETERMINAÇÃO DE FERRO NOS ÓRGÃOS</b>	60
4.5.	<b>DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE TRANSCRITOS</b>	62
4.5.1.	<b>EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL, ELETROFORESE, PRECIPITAÇÃO COM ACETATO E SÍNTESE DE cDNA</b>	62
4.5.2.	<b>DETERMINAÇÃO DOS BIOMARCADORES MOLECULARES DO ESTADO REDOX, DO ESTADO CORPORAL de FERRO, DO ENVELHECIMENTO E DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA</b>	64
4.6.	<b>ANÁLISE POR IMUNOTRANSFERÊNCIA (<i>WESTERN BLOT</i>) DA FERRITINA TECIDUAL</b>	66
4.7.	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	68
5.	<b>RESULTADOS</b>	69
6.	<b>DISCUSSÃO</b>	75
7.	<b>CONCLUSÃO</b>	82
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	84
	<b>APÊNDICE</b>	90

	<b>METODOLOGIA SUPLEMENTAR</b>	90
	<b>Peroxidação lipídica</b>	90
	<b>Oxidação de proteínas</b>	90
	<b>Preparação de homogeneizados de tecidos para os ensaios de enzimas</b>	91
	<b>Ensaio de catalase</b>	91
	<b>Ensaio de Glutathione peroxidase (GPx)</b>	91
	<b>Ensaio de Glutathione Redutase (GR)</b>	92
	<b>Ensaio de Glutathione-S-transferase (GST)</b>	92
	<b>Ensaio de NADPH oxidase</b>	93
	<b>RESULTADOS SUPLEMENTARES</b>	93
	<b>ANEXOS</b>	97
<b>I</b>	<b>Comprovante do Comitê de Ética em Uso Animal</b>	97
<b>II</b>	<b>Artigo Publicado na Revista <i>Plos One</i>: Dietary iron concentration may influence aging process by altering oxidative stress in tissues of adult rats</b>	98

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 50 anos de forma global, a expectativa de vida aumentou em 50%, resultando na recente inversão das pirâmides etárias em todo o mundo. Em outras palavras, houve um aumento significativo da população idosa e esse grupo etário deve continuar a crescer quantitativamente e em importância social, tornando urgente e iminente a necessidade da compreensão e promoção do envelhecimento saudável.

Devido ao fato do envelhecimento estar intrinsecamente associado ao declínio fisiológico, à perda de independência e à redução das funções cognitivas que têm como consequência o aumento da incidência das doenças crônicas e subsequente redução na qualidade de vida, tais mudanças demográficas ocasionadas pelo aumento da expectativa de vida humana terão implicações significativas para a sociedade como um todo.

De acordo com a teoria do papel dos radicais livres no envelhecimento, como postulado por Denham Harman em meados dos anos 1950, os animais com altas taxas metabólicas têm a expectativa de vida reduzida. Segundo essa teoria, os radicais livres produzidos e acumulados com a idade seriam os responsáveis pelo processo de envelhecimento celular. As espécies reativas de oxigênio produzidas endogenamente durante a respiração celular promovem o acúmulo de danos oxidativos nos tecidos, o que resulta no envelhecimento celular (1). O equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e as defesas antioxidantes determina o estado oxidativo do corpo. Um aumento na produção de EROS, ou uma redução na capacidade antioxidante do corpo induz danos oxidativos progressivos nos tecidos, levando à disfunção de órgãos, que caracteriza o envelhecimento (1-3).

Devido à sua versatilidade química, o ferro foi, provavelmente, um catalisador essencial para a formação de compostos orgânicos complexos em ambiente primitivo e, em seguida, tornou-se mais comumente utilizado em modernos sistemas biológicos (4). Embora o ferro seja um nutriente essencial para a saúde e esteja envolvido em vários processos biológicos, tais como a eritropoiese, metabolismo oxidativo, respostas imunes celulares e a regulação do crescimento e

diferenciação de células (5), o ferro livre pode potencialmente tornar-se tóxico (6-7). Durante o fluxo de elétrons, na cadeia de transporte de elétrons, eventualmente, o oxigênio molecular sofre apenas uma redução parcial, produzindo o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Este radical reage com os íons férricos reduzindo a íons ferrosos, que por sua vez, podem reagir com o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), conforme a reação de Fenton (6). Nesta reação é produzido o radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ), que é uma das EROS mais reativas (6) dentro dos sistemas biológicos. A sobrecarga de ferro no organismo favorece a disponibilidade de ferro lábil redox-ativo nos tecidos e, portanto, pode favorecer o aumento da produção de radicais livres e, conseqüentemente, o aumento nos danos oxidativos a lipídeos, proteínas e DNA que promovem à disfunção de órgãos (7).

Os efeitos potencialmente deletérios do ferro, adversamente ao seu papel essencial nos processos fisiológicos, levaram os organismos vivos à evolução de um sistema molecular cuja função seria a de blindar os efeitos deletérios do ferro propiciando a sua utilização inócua e eficaz dentro do organismo vivo. Várias proteínas envolvidas no metabolismo de ferro, desde a sua absorção, mobilidade e utilização nas células tem sido identificadas e, a cada dia, uma nova proteína, envolvida não só no metabolismo, mas no complexo mecanismo de regulação deste metabolismo têm sido descoberta (8-10). Dentre estas, aquelas que participam do transporte de ferro através de membranas, tais como o transportador de metal divalente 1 (DMT-1); receptor de transferrina e a ferroportina. Ainda, a proteína ferritina, que armazena ferro nos tecidos e a transferrina, que proporciona a mobilidade do ferro através da circulação sanguínea de uma forma segura e disponível para as necessidades metabólicas dos sistemas biológicos, evitando sua filtração através dos glomérulos, no rim (8-10). O teor de ferro celular regula pós-transcricionalmente os níveis de DMT-1, ferritina, receptor de transferrina e ferroportina pelas proteínas reguladoras de ferro (IRP1 ou IRP2) e o elemento responsivo a ferro (IRE) do sistema (IRP / IRE). Os IREs estão nas regiões não traduzidas de mRNAs localizado na região 5' ou 3' (2, 11). A hepcidina, um hormônio sintetizado predominantemente pelo fígado, apontada como a principal proteína que regula a homeostase de ferro sistêmica, ajusta a absorção de ferro e a mobilização de ferro no organismo de acordo com a demanda fisiológica (8, 10). No entanto, apesar do eficiente mecanismo molecular que controla a homeostase de ferro no

corpo, os níveis de ferro dos tecidos normalmente aumentam com a idade, presumivelmente devido a uma falha na regulação (12-13).

Vários estudos têm sugerido uma relação positiva entre a perda de homeostase do ferro, o acúmulo de danos oxidativos e envelhecimento celular (14-16). Alguns autores sugerem o uso de quelante de ferro como uma terapia alternativa para doenças associadas ao envelhecimento e estresse oxidativo (17-19). A deficiência de ferro durante o período reprodutivo em mulheres tem sido apontada como um dos fatores responsáveis por sua longevidade em comparação com os homens e o ferro considerado como o espírito maligno do envelhecimento prematuro para alguns autores (18).

Assim, considerando que o acúmulo de ferro nos tecidos pode ser um fator causal do dano oxidativo acumulado em células senescentes (5), este trabalho foi baseado na hipótese de que a suplementação com ferro oral e crônica é prejudicial ao organismo e pode contribuir para o envelhecimento. Para testar esta hipótese, foram investigados os efeitos do consumo crônico de dietas restritas e enriquecidas de ferro sobre os biomarcadores moleculares de oxidação nos tecidos e sobre a expressão de genes marcadores de envelhecimento, do estado redox, da resposta inflamatória e do estado corporal de ferro nos ratos. Os níveis de expressão dos genes da proteína 30 marcadora de envelhecimento (SMP30), ferritina de cadeia leve (Ftl) e do hormônio peptídico hepcidina (Hamp) foram analisados quantitativamente por qPCR, como marcadores de envelhecimento (12, 20-21). Os níveis de mRNA do fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nfe2l2) e o fator de transcrição do elemento responsivo ao AMP cíclico ligado a proteína H (CREBh / Creb3l3), ambos fatores de transcrição hepáticos marcadores de estresse oxidativo foram também analisados como marcadores do estado oxidativo nos ratos (22-26). O nível de transcrito do gene *Slc11a2* que sintetiza o transportador de metal divalente - 1 (DMT-1), que é responsável pela absorção de ferro nos enterócitos foi também analisado (27) para auxiliar na interpretação dos níveis de ferro teciduais, marcadores do estado corporal de ferro e, ainda, os níveis de transcritos de IL - 1 $\beta$  (Il1b) foram analisados como marcadores da resposta inflamatória (28), haja visto a relação entre processo inflamatório e estado corporal de ferro.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. ENVELHECIMENTO

Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), em seu último relatório técnico “Previsões sobre a população mundial”, elaborado pelo Departamento de Assuntos Econômicos e Sociais, nos próximos 37 anos, o número de pessoas com mais de 60 anos de idade será três vezes maior do que o atual. Os idosos representarão um quarto da população mundial projetada, ou seja, cerca de 2 bilhões de indivíduos (no total de 9,2 bilhões). No critério da Organização Mundial da Saúde (OMS), é considerado idoso o habitante de país em desenvolvimento com 60 anos ou mais e o habitante de país desenvolvido com ou acima de 65 anos (29).

Em 2050, a expectativa de vida nos países desenvolvidos será de 87,5 anos para os homens e 92,5 para as mulheres (contra 70,6 e 78,4 anos em 1998). Já nos países em desenvolvimento, será de 82 anos para homens e 86 anos para mulheres, ou seja, 21 anos a mais do que os 62,1 e 65,2 anos atuais. Este fenômeno vem ocorrendo devido à redução nas taxas de fecundidade e mortalidade (30).

A idade média da população humana é cada vez maior, um fenômeno que trará desafios sociais, político, econômico e biomédico para as futuras gerações em todo o mundo. Rasmussen e colaboradores (2011) (31) ilustraram essa tendência na evolução da população em relação à pirâmide etária nos países mais e menos desenvolvidos e é bem expressa nas Figuras 1 e 3, além das projeções de mudanças futuras na demografia etária, as quais já foram modeladas no Brasil (Figura 2). Essa inversão na pirâmide etária nos desafia a entender e desenvolver uma capacidade para gerir a saúde humana e doenças na população idosa. Para enfrentar este desafio, os pesquisadores devem fazer planejamento de programas abrangentes para compreender o envelhecimento humano e as doenças relacionadas ao envelhecimento (31).

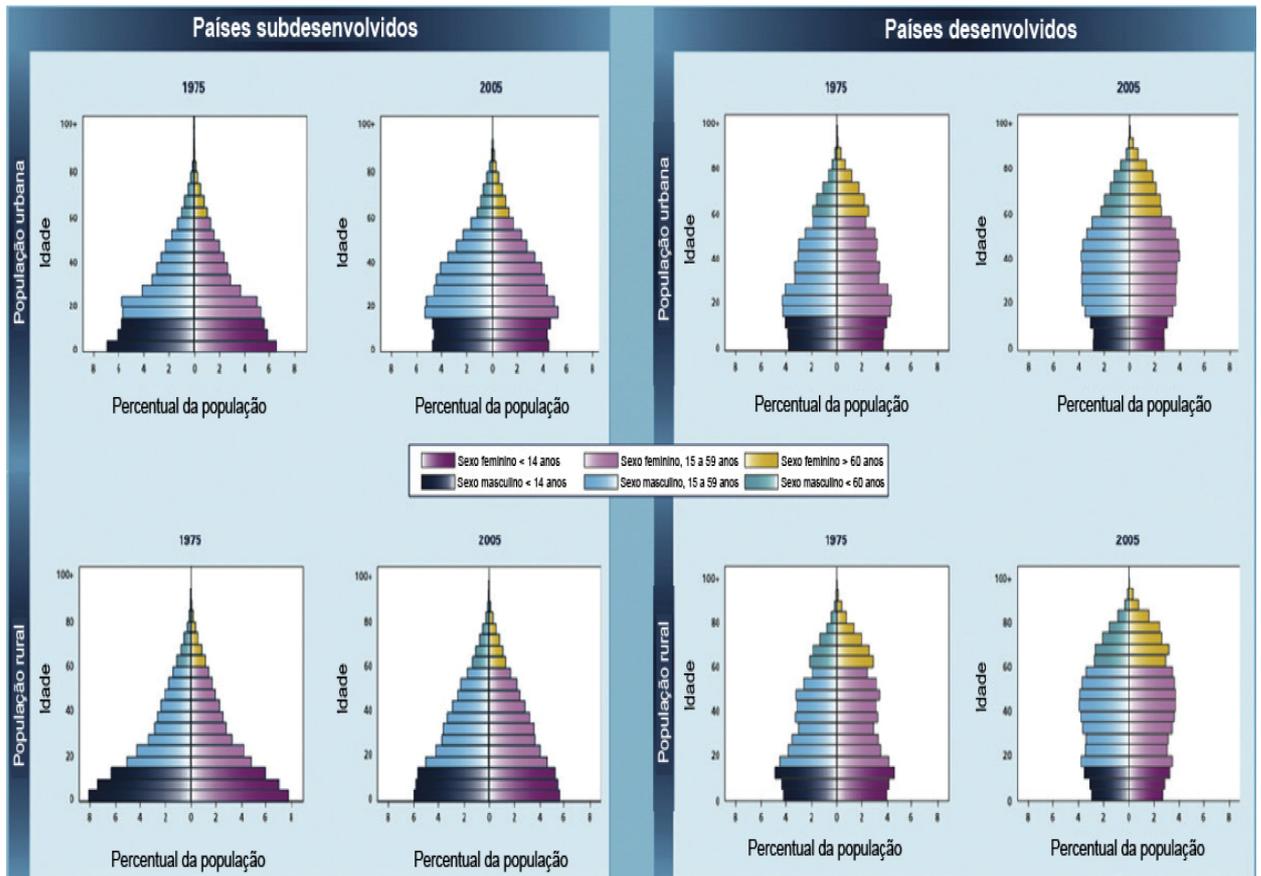


Figura 1: Demografia da população por idade em populações rurais e urbanas, em 1975 e 2005. Os dados são estratificados por estrutura social urbano / rural (painéis superior / inferiores), o status econômico do país relativo ao desenvolvimento (painéis esquerda / direita), sexo (categoria eixo a esquerda / direita) e faixa etária (eixo de valor) em dois tempos instantâneos, 1975 e 2005. Os gráficos são baseados em dados coletados e relatados pela Divisão de População das Nações Unidas em 2009 (31).

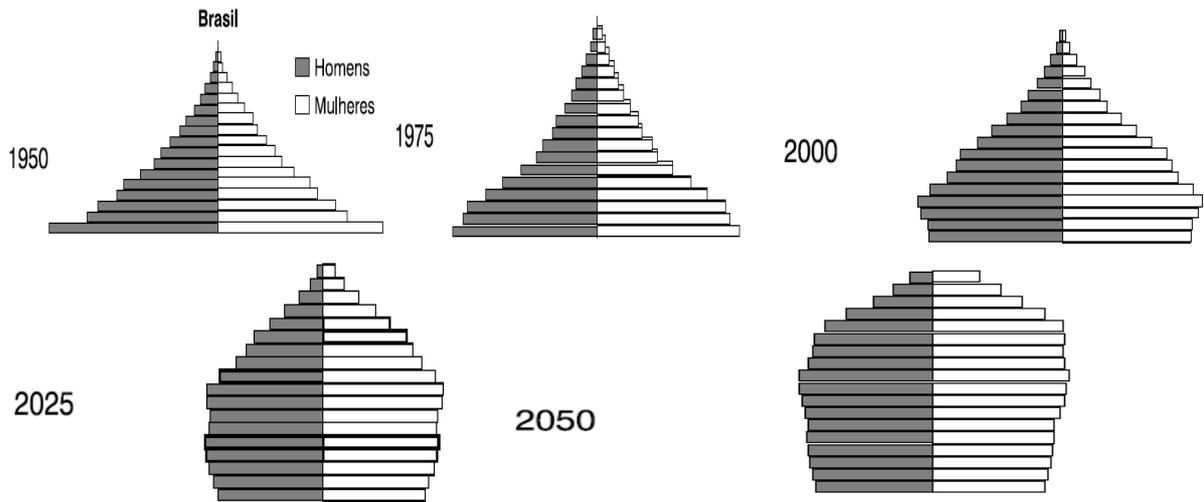


Figura 2: Projeções do estado do envelhecimento e da saúde (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION/MERCK INSTITUTE OF AGING - ONU 2004) (32).

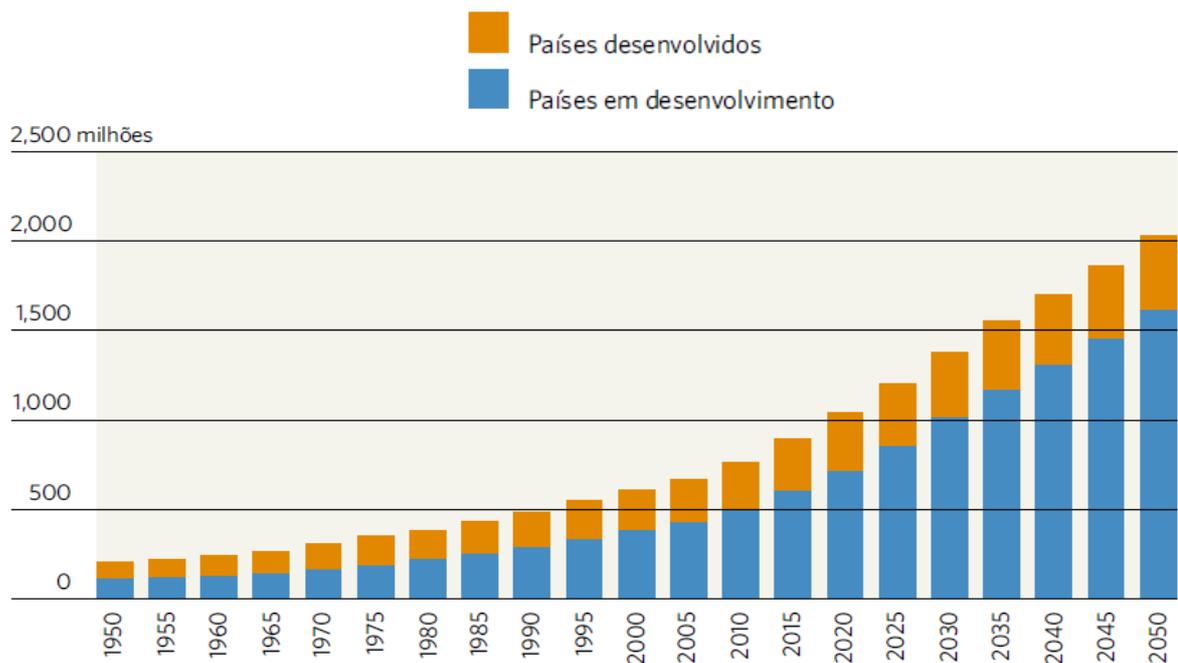
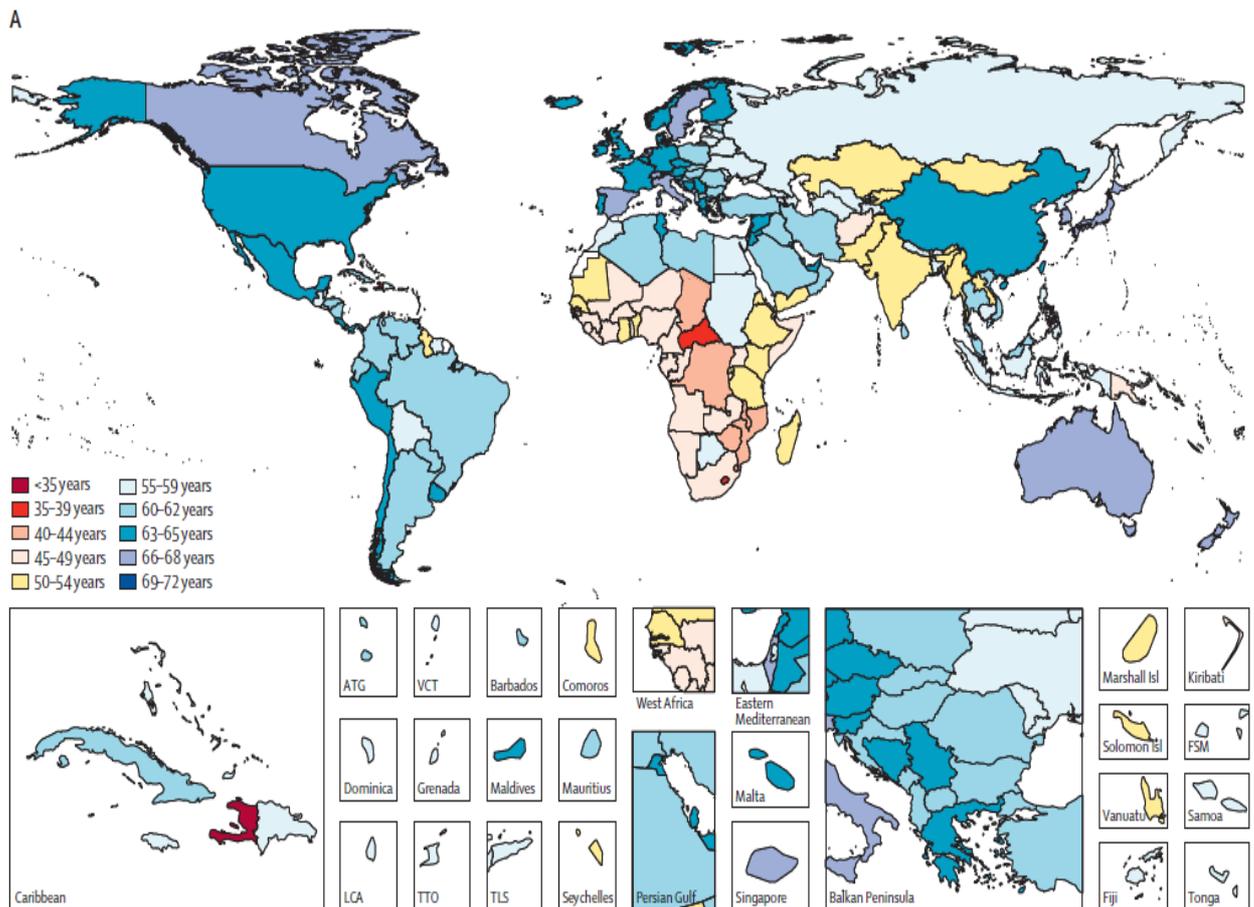


Figura 3: Número de pessoas com 60 anos ou mais: Mundo, países desenvolvidos e em desenvolvimento, 1950 – 2050. Fonte: DESA: Envelhecimento da População Mundial 2011, baseado no cenário mediano da projeção feita em Perspectivas da População Mundial: Revisão 2010, da Divisão de População do DESA – Departamento de Assuntos Econômicos e Sociais das Nações Unidas (33).

Durante o século XX e no início do século XXI, a mortalidade humana, reduziu especialmente durante a primeira e a última década de vida, levando a um aumento da expectativa de vida humana. Como consequência, octogenários, nonagenários e centenários e supercentenários (<110 anos) estão aumentando em número e a probabilidade de morrer em qualquer idade específica está diminuindo na maioria dos países desenvolvidos do mundo. No entanto, é importante questionar se a população (em média) vive mais tempo e vive melhor (31). A Figura 4 apresenta a expectativa de vida saudável em homens (A) e mulheres (B) mostrando a prevalência de idosos no mundo.



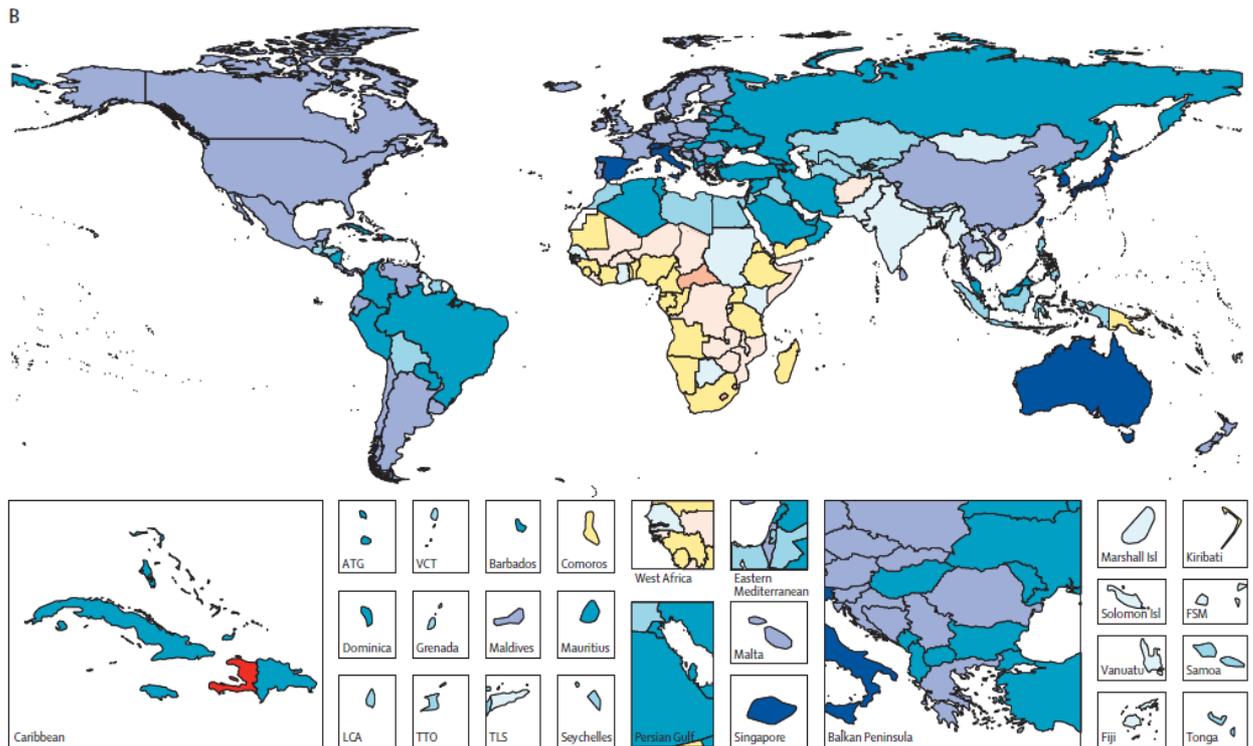


Figura 4: Expectativa de vida saudável no nascimento por país, no ano 2010. (A) Expectativa de vida saudável entre indivíduos do sexo masculino e (B) expectativa de vida saudável do sexo feminino. ATG = Antigua e Barbuda. VCT = São Vicente e Granadinas. Isl = Ilhas; FSM = Estados Federados da Micronesia. LCA = Santa Lucia. TTO = Trinidad e Tobago. TLS = Timor-Leste. Fonte: (34).

Muitos dos conceitos descritos como teorias de envelhecimento são provenientes da aplicação dos domínios das ciências da vida para o envelhecimento. Considerando esse contexto, em genética molecular, propostas de alteração de proteínas, mutação somática e encurtamento dos telômeros são discutidos; em bioquímica a teoria dos radicais livres e as taxas metabólicas; e na evolução das teorias aqueles que enfatizam o envelhecimento não como um fenômeno biológico nos indivíduos, mas como um processo de evolução (3).

O envelhecimento é caracterizado por um declínio progressivo na eficiência da função fisiológica e pelo aumento da susceptibilidade a doenças e, conseqüente, a morte, além das células normais perderem progressivamente a capacidade replicativa. As células senescentes sofrem mudanças fenotípicas substanciais, que incluem alteração de volume, morfologia, expressão gênica e metabolismo. Animais

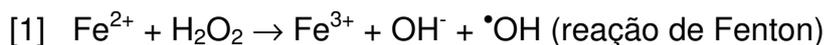
com taxas metabólicas elevadas apresentam tempo de vida reduzido, o que fortalece a teoria do papel dos radicais livres no envelhecimento (1, 13, 35-37).

Para elucidar o mecanismo molecular da senescência, vários aspectos ainda precisam ser melhor caracterizados como o mecanismo de geração de EROS intracelular, a interação de radicais de oxigênio com biomoléculas, os mecanismos de defesa e reparo que inibem ou reduzem danos irreversíveis em biomoléculas e as consequências da acumulação de macromoléculas danificadas na função celular (2, 38).

O estresse oxidativo também é mediado por metais capazes de catalisar reações de óxido redução, como o ferro que é o abundante no organismo. Ao lado do essencial papel que desempenha em diversas vias e processos fisiológicos, este também participa da formação de agentes oxidantes que podem danificar macromoléculas celulares. Em condições fisiológicas normais, a homeostase celular do ferro é sensivelmente mantida havendo uma sincronia entre a absorção e as demandas celulares, capaz de evitar o acúmulo de ferro nos tecidos, minimizando a participação desse mineral nas reações químicas pró-oxidantes como a reação de Fenton (13).

O acúmulo de ferro não-hêmico em tecidos relacionados ao envelhecimento aumenta a disponibilidade de ferro lábil redox-ativo, que pode causar danos oxidativos às moléculas observadas nos tecidos senescentes (7).

A origem da teoria do envelhecimento e estresse oxidativo / radical livre é investigada desde antes do século XIX, quando Fenton em 1894 descobriu que o  $\text{Fe}^{2+}$  catalisa a reação de redução do peróxido de hidrogênio. E Haber e Weiss (1932) propuseram que radicais hidroxil, peróxido de hidrogênio e anions radicais superóxido sofrem uma reação em cadeia que resulta na conversão do peróxido de hidrogênio em radical hidroxil. Esta reação conhecida como reação Haber-Weiss acredita-se que seja responsável pela maioria da geração de espécies reativas de oxigênio na célula (39).



Fonte: (40).

Harman (1956) sugeriu que os radicais de oxigênio produzidos endogenamente, durante a respiração celular, exerçam efeitos deletérios nos componentes celulares e promovam acúmulo de danos oxidativos nos tecidos, resultando no envelhecimento celular. O balanço entre a produção de espécies reativas ou radicais livres e as defesas antioxidantes determina o desenvolvimento da condição de estresse oxidativo. As consequências do estresse oxidativo incluem a alteração estrutural e funcional das proteínas, lipídios e DNA. Alguns estudos têm mostrado que o envelhecimento celular e do organismo está associado a elevados níveis de DNA nuclear danificado e que falhas ou redução da capacidade antioxidante do organismo resulta em danos oxidativos progressivos nos tecidos, levando à disfunção dos órgãos que caracterizam o envelhecimento. O aumento na taxa de formação dos radicais livres em animais senis, o acúmulo de danos oxidativos em proteínas e DNA e as reduções nas concentrações de antioxidantes endógenos reforçam a teoria Denham Harman (1, 35, 38). A teoria do estresse oxidativo como causa do envelhecimento pressupõe uma perda do equilíbrio entre os compostos oxidantes agressivos e antioxidantes defensivos / protetores, em favor dos primeiros (18).

A presença dos produtos da interação entre os metabólitos de oxigênio reativos com macromoléculas levou ao conceito de que as defesas antioxidantes não são totalmente eficientes, que as células estão cronicamente sob estresse oxidativo e que o envelhecimento é uma consequência dos danos oxidativos (41). Estudos mostram o aumento do dano oxidativo relacionado com a idade em várias moléculas, como lipídios, proteínas e DNA ocorrendo em organismos desde invertebrados até humanos (39).

A exposição ao estresse oxidativo, endógeno ou exógeno, estimula a atividade endógena geradora de compostos antioxidantes. Com a idade, o suprimento de compostos antioxidantes endógenos é reduzido, tornando a ingestão de compostos antioxidantes, provenientes da dieta fundamental para a manutenção do equilíbrio redox principalmente em indivíduos mais velhos. Os antioxidantes exógenos são aqueles derivados a partir da ingestão de alimentos ricos em nutrientes (18).

Os níveis de ferro corpóreo aumentam com a idade, provavelmente, como consequência de falha no sistema de regulação da homeostase corporal de ferro (12). Estudos recentes demonstraram que a ingestão de antioxidantes de hortaliças e frutas previne doenças relacionadas com EROs, aumenta a expectativa de vida e contribui para um envelhecimento bem sucedido, que depende de um equilíbrio sutil entre oxidantes e antioxidantes. Devido ao envolvimento do ferro nas reações de produção de radicais livres, especula-se que o excesso de ferro livre acumulado no organismo contribua para o desequilíbrio entre oxidantes/antioxidantes, favorecendo os primeiros. Desta forma o excesso de ferro nos tecidos dos idosos poderia ser o responsável por acelerar o aparecimento e o desenvolvimento de várias doenças relacionadas com a idade. Alguns autores sugerem que os estoques diminuídos de ferro contribuem para um aumento da expectativa de vida (18, 42).

O acúmulo de ferro com a idade sugere uma alteração gradual no equilíbrio entre a absorção e a utilização de ferro. Nos mamíferos, incluindo os seres humanos, o estado corporal de ferro depende, essencialmente, da regulação da absorção nos enterócitos, uma vez que o único mecanismo natural bem descrito de perda de ferro nestes organismos é através da menstruação. As mulheres no período fértil têm níveis mais baixos de ferritina sérica que os homens. Alguns autores sugerem inclusive que este seria o principal fator responsável pela maior longevidade no sexo feminino (18, 42). Em outras palavras, o aumento da longevidade das mulheres em comparação com os homens poderia ser o resultado de deficiência crônica de ferro, causada pela menstruação e o parto nas mulheres no período fértil. Segundo esses autores, se o estresse oxidativo e o desequilíbrio progressivo de oxidante / antioxidante desempenham papéis importantes no envelhecimento, então a privação de ferro poderia prevenir lesões nas células,

tecidos e órgãos associados ao envelhecimento, contribuindo assim para o envelhecimento bem sucedido (18).

O princípio básico da hipótese do estresse oxidativo está alicerçado na tese de que a perda de função celular e orgânica, relacionadas com a senescência, possa ser devido ao acúmulo progressivo e irreversível de danos oxidativos moleculares. Essa teoria tem sido consubstanciada em achados na literatura como os estudos que evidenciaram correlação positiva entre os níveis de danos oxidativos moleculares e a idade dos indivíduos (13, 36); estudos que evidenciaram maior expectativa de vida entre as espécies de animais que apresentam menores níveis teciduais de danos oxidativos e ainda os estudos que verificaram aumento da expectativa de vida em mamíferos submetidos a regimes de restrição calórica, que também apresentaram menores níveis de danos oxidativos celulares (41).

O acúmulo de ferro em células senescentes tem sido também observado em vários estudos (13, 16). Níveis altos de ferro têm sido encontrados em órgãos como baço, fígado, coração e cérebro em pacientes com doenças associadas ao envelhecimento como Alzheimer, doença de Parkinson, diabetes tipo 2 e doença cardiovascular. Acredita-se que o acúmulo de ferro nas células nervosas possa contribuir para o declínio da função cognitiva, relacionada com a idade, por meio da geração de espécies reativas de oxigênio (13, 36). Dessa forma, acredita-se que o acúmulo de ferro no corpo possa representar um fator oxidante e a sua privação relativa possa prevenir o dano oxidativo tecidual e, conseqüentemente, desacelerar o processo de envelhecimento, bem como a morte do indivíduo (17-19). Juntos, tais resultados sugerem uma correlação positiva entre a perda da homeostase de ferro, o aumento de danos oxidativos e o envelhecimento celular (13, 16).

## **2.2. ESTRESSE OXIDATIVO e EROS**

Os radicais livres são espécies químicas com um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo, sendo que esse elétron

desemparelhado ocupa sozinho um orbital atômico ou molecular, que o torna instável. O elétron desemparelhado é altamente reativo, pois tende a emparelhar com outro elétron livre para maior estabilidade. Em sistemas biológicos os radicais livres roubam os elétrons das biomoléculas que estão a sua volta, na tentativa de estabilizar-se. Cada vez que uma biomolécula perde um elétron, ou seja, é oxidada, esta sofre uma modificação na sua forma e função. A maioria dos radicais livres que causam danos aos sistemas biológicos são os radicais de oxigênio (35).

As espécies reativas de oxigênio (EROS) incluem os radicais livres superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ), hidroxil ( $^{\bullet}OH$ ), o não-radical intermediário oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), bem como o óxido nítrico ( $^{\bullet}NO$ ) e os peroxinitritos ( $ONOO^-$ ). Em baixas concentrações, as EROs podem atuar como segundos mensageiros, reguladores de genes e mediadores de ativação celular. Mas, sob condições de produção excessiva ou reduzida disponibilidade, as EROs podem gerar danos oxidativos a vários componentes celulares, tais como as proteínas (desdobramento, agregação, desolubilização e perda de função), lipídios (peroxidação de célula e das membranas subcelulares), DNA e mitocôndria (18, 43).

As EROS são um grupo de moléculas químicas reativas derivadas da redução parcial do oxigênio molecular. O papel das EROS no envelhecimento e na longevidade tem sido sugerido em vários estudos, no entanto o mecanismo envolvido nessa associação ainda não é totalmente claro. O estresse oxidativo e o dano a macromoléculas, devido ao aumento das EROS mitocondrial, são comumente considerados como importantes contribuintes para o envelhecimento e foram documentadas em uma grande variedade de espécies, desde levedura aos seres humanos (44).

Os radicais livres podem causar danos no DNA que potencialmente desencadeiam a mutagênese e assim a transformação celular e a proliferação não controlada. Além disso, o estresse oxidativo contribui para o desenvolvimento de doenças humanas, incluindo, a doença de Alzheimer (AD), doença cardiovascular, aterosclerose, doença de Parkinson (DP), a artrite reumatóide, diabetes e doenças dos neurônios motores entre outras. Um aumento no nível basal de oxidação do DNA, as quebras nas fitas simples e os danos oxidativos às bases nitrogenadas, têm sido associados a várias doenças relacionadas com a idade, incluindo: doença

cardiovascular, diabetes mellitus, doenças neurodegenerativas e estágio final da doença renal (45). O nível de lesões oxidativas do DNA depende de uma variedade de fatores, incluindo a idade, o tempo de exposição a riscos ambientais, fatores genotóxicos, o tabagismo, consumo de álcool e metabolismo intracelular e extracelular (45).

Em circunstâncias normais, os efeitos deletérios causados pelas EROs são controlados por ação dos antioxidantes e o desequilíbrio entre agressores oxidantes e defensores antioxidantes resulta em um processo conhecido como estresse oxidativo (43).

Assim, o papel do estresse oxidativo como uma consequência do metabolismo normal tem emergido como um mecanismo possível para explicar o processo de envelhecimento molecular. Os danos oxidativos tecidual do metabolismo normal se acumulam com a idade. Dessa forma, a geração contínua de EROS pela mitocôndria durante a vida inteira, provoca um estresse oxidativo crônico, que desempenha um papel crítico no envelhecimento (46).

### **2.3. FERRO**

O metal de transição ferro é o mais abundante metal na Terra, sendo um elemento essencial para a maioria das espécies vivas, excetuando alguns microorganismos da família *Lactobacillus* (19). As formas que comumente ocorrem são insolúveis e é pouco biodisponível em seres humanos e nas dietas dos animais. É um elemento traço essencial que pode ser encontrado nos sítios ativos de muitas enzimas e proteínas de transporte de oxigênio e é um componente importante de muitos processos celulares, incluindo a respiração, reações de transferência de elétrons, metabolismo energético, síntese de DNA e regulação dos genes. Em condições fisiológicas, o ferro livre existe principalmente em um de dois estados de oxidação, o estado relativamente solúvel ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ferroso e o estado férrico pouco solúvel ( $\text{Fe}^{3+}$ ) em sistema aquoso. Sua capacidade de converter rapidamente entre

as diferentes valências, principalmente  $\text{Fe}^{2+}$  para  $\text{Fe}^{3+}$ , faz deste um excelente transportador de elétron e ainda o torna danoso se presente na forma livre. O ferro é normalmente associado com processos prejudiciais, muitos destes ocorrem no lisossomo onde o ferro em sua forma redox ativa participa de reações tipo Fenton reagindo com o peróxido de hidrogênio, produzindo radical hidroxil, que pode difundir através do citosol (6, 47-48). A utilização biológica de ferro é, portanto, limitada por sua baixa solubilidade nos sistemas biológicos e a sua propensão em participar em reações de geração de radicais livres (6).

A aquisição de ferro é um processo essencial no qual várias proteínas participam, assegurando que a absorção do ferro seja suficiente e adequada às necessidades das células e dos organismos. Além disso, as proteínas envolvidas no transporte e sequestro de ferro evitam que este reaja com espécies de oxigênio, que geram radicais livres. O número exato de proteínas envolvidas no metabolismo do ferro em mamíferos é desconhecido, mas muitas foram identificadas e caracterizadas, cuja síntese é regulada de forma integrada, o que mantém a homeostase do ferro no organismo (49).

Indubitavelmente, o ferro é essencial para a vida. A maioria do ferro no corpo esta localizado nos eritrócitos como parte da hemoglobina, porém esse metal de transição tem distribuição ubíqua em todos os tecidos, como parte integrante não só de proteínas que contém grupo hêmico, como os citocromos, mas também de proteínas que possuem grupamento Ferro-Enxofre (FeS), que participam da cadeia de transporte de elétrons e outras proteínas. A manutenção da concentração de ferro livre baixa previne a conversão de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ao altamente reativo radical hidroxil ( $\text{OH}^\bullet$ ), desse modo, a ferritina e a transferrina, constituem moléculas antioxidantes, uma vez que proporcionam o armazenamento celular e o transporte de ferro no sangue, respectivamente, protegendo as células do potencial oxidativo deste elemento (50-51).

O ferro é um cofator essencial e fundamental em vários processos fisiológicos, como o transporte de oxigênio, para a síntese de DNA e metabolismo energético (11, 19, 51-52). Além disso, o ferro é essencial para a neurogenesis, para o desenvolvimento cerebral e para atividades do cérebro, como a neurotransmissão. Paradoxalmente, o ferro em excesso pode ser tóxico e ainda responsável pela

redução da atividade cognitiva e, conseqüentemente, pela redução da expectativa de vida (5, 53). Nos mamíferos ainda é utilizado principalmente na síntese da hemoglobina (Hb) nos eritroblastos, da mioglobina nos músculos e dos citocromos no fígado. Um indivíduo adulto tem no seu organismo de 3 a 5 g de ferro, sendo que a maioria cerca de 2,5 g na forma de hemoglobina, 300 mg na mioglobina dos músculos e cerca de 1 mg de ferro por mililitro de eritrócitos (51-52, 54-55). Por outro lado, o plasma sanguíneo contém apenas 2-3 mg de ferro, ligado a transferrina, o transportador de ferro plasmático que é a fonte exclusiva de ferro para a eritropoiese (48, 50-51, 56).

Para exemplificar, para um homem de 70 kg, o ferro corporal total soma cerca de 3500 mg (50 mg/kg peso corporal). A maioria do ferro corporal está em hemoglobinas dos glóbulos vermelhos (65%; 2300 mg). Aproximadamente 10% encontram-se nas fibras musculares (mioglobina) e outros tecidos (enzimas e citocromos) (350 mg). O ferro corporal remanescente está estocado no fígado (200 mg), macrófagos do sistema retículo endotelial (500 mg) e medula óssea (150 mg). Em uma dieta convencional contendo 15- 20 mg de ferro, o corpo absorve apenas 1-2 mg/dia do ferro dietético. A absorção é balanceada com as perdas de ferro via descamação de células da mucosa intestinal, menstruação e outras perdas sanguíneas (Figura 5). Portanto, a recapitação interna de ferro é essencial para satisfazer as necessidades da medula óssea para a eritropoiese (20-30 mg/dia) (5, 48, 56-57). O ferro dos hepatócitos e macrófagos são armazenados em ferritina citoplasmática e é prontamente mobilizado durante o período de demanda de ferro (56).

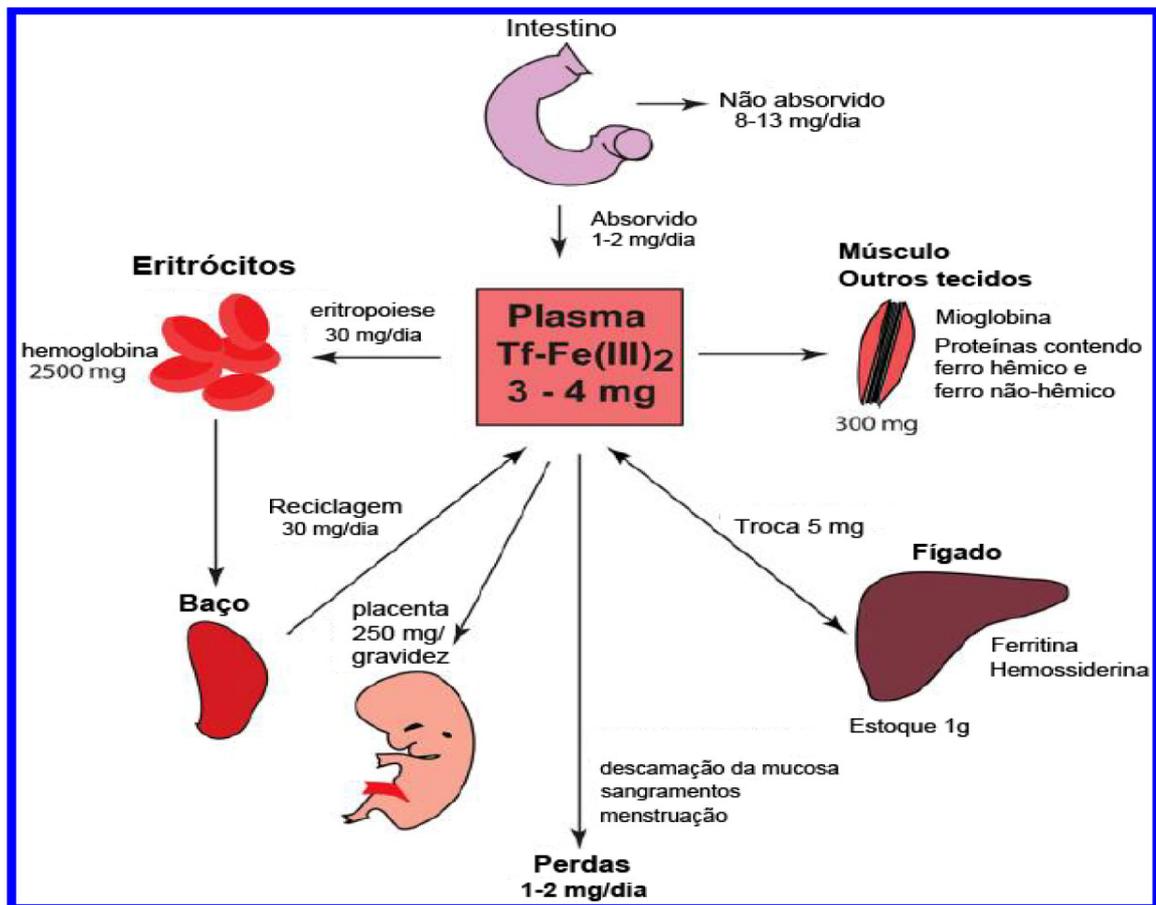


Figura 5: Absorção, distribuição e reciclagem de ferro no corpo e troca quantitativa de ferro entre as fontes de ferro corporal (54).

Diferente do processo de absorção, o corpo não possui um meio ativo de excretar ferro, assim, é a regulação da absorção de ferro dietético a partir do duodeno que desempenha um papel crítico na homeostase do ferro. O mecanismo de regulação da absorção de ferro é importante porque o ferro é essencial para o metabolismo celular e para a respiração aeróbica e pelo fato de que quando em excesso, o ferro pode causar toxicidade e morte celular via formação de radicais livres e consequente oxidação das moléculas essenciais à célula. Devido a esses efeitos adversos do ferro no organismo, os sistemas biológicos desenvolveram um mecanismo de manutenção da homeostase do ferro por meio de uma fina regulação molecular, orquestrada pelo hormônio hepcidina (5, 57).

A eritropoiese é um processo altamente dinâmico com  $2 \times 10^{11}$  novos glóbulos vermelhos produzidos em uma base diária e com uma vida útil média de

eritrócitos de 120 dias. A absorção média de ferro diária (1 e 2 mg) é equilibrada pela perda de ferro através da descamação de células epiteliais e de cabelo, sangue menstrual e transpiração. À medida que a ingestão nutricional de ferro não é suficiente para cobrir as necessidades diárias de ferro para a eritropoiese (20 – 25 mg), a reciclagem de ferro é necessária. Os eritrócitos senescentes sofrem fagocitose pelas células do sistema macrófago-monócito principalmente no baço, mas também no fígado. Uma vez dentro das células, o ferro é liberado do grupo heme por meio da hemoxigenase. Quando os níveis de ferro corporal são baixos, o ferro armazenado no baço e fígado é novamente liberado na circulação. A maioria do ferro usado pelas células é reciclado. As perdas diárias de ferro representam apenas 1 - 2 mg, com o mesmo montante a ser ingerido para manter o equilíbrio de ferro corporal. Os níveis corpóreos de ferro são regulados em nível de absorção duodenal, da dieta em torno de 1 a 2 mg de ferro por dia, e a partir da reciclagem de hemácias senescentes pela liberação dos macrófagos e dos estoques de ferro dos hepatócitos (10) (Figura 6).

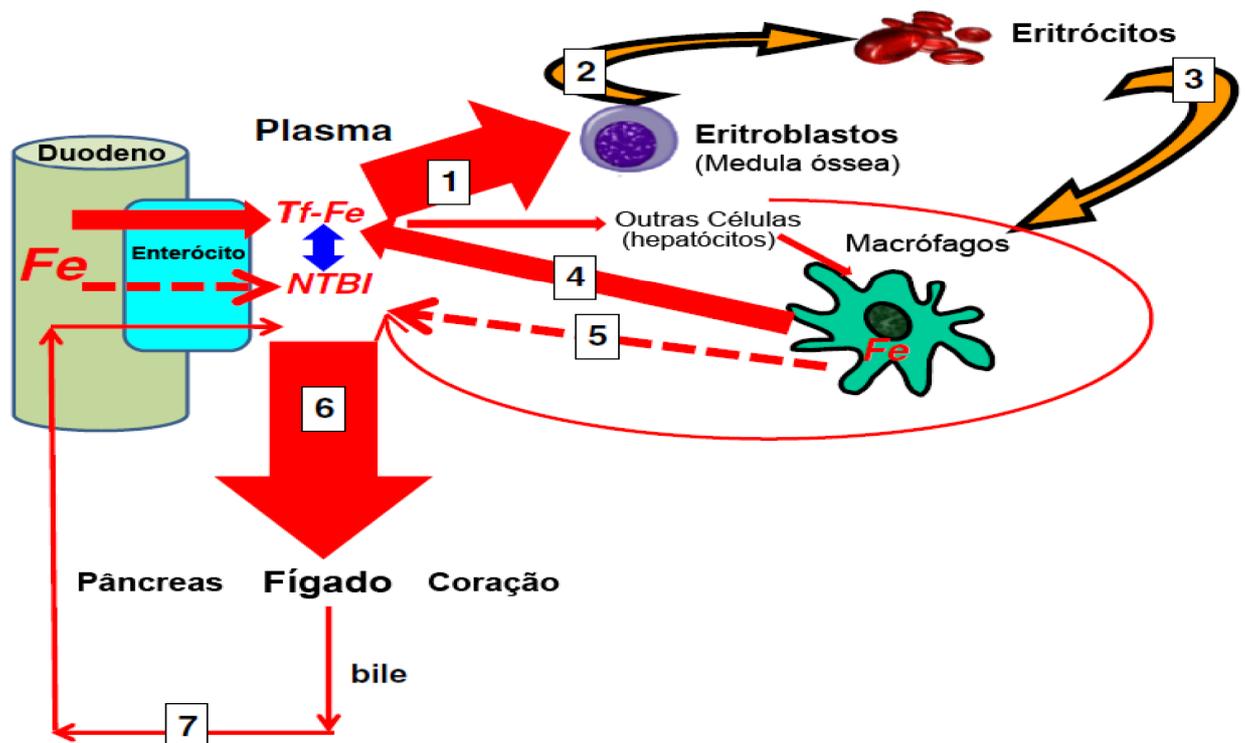


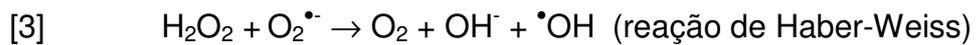
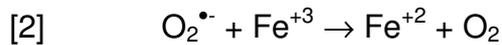
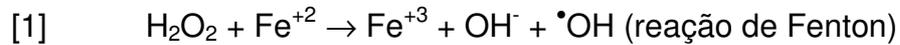
Figura 6: O papel fundamental da sobrecarga de ferro e a toxicidade do ferro. A origem e destino do ferro-transferrina (Fe-Tf) e do ferro não ligado a transferrina (NTBI). Tf-Fe visa essencialmente (seta 1) a medula óssea, contribuindo para a produção (seta 2) de células vermelhas

do sangue, que após se tornarem senescentes são subseqüentemente degradadas (seta 3), dentro do sistema reticulo-endotelial (macrófagos), principalmente no baço. O ferro, uma vez liberado do baço, liga-se à transferrina (seta 4), ou pode constituir o pool de ferro livre (seta 5), NTBI (se a saturação de transferrina é superior a 45%). NTBI visa essencialmente (seta 6), o fígado (hepatócitos), o pâncreas e o coração. NTBI pode também ser reabsorvido no fígado (ciclo entero-hepática) (seta 7) (58).

Em geral, as dietas contêm de 15 a 20 mg de ferro, dos quais somente 1 a 2 mg serão absorvidos na forma inorgânica ou na forma heme. A maior parte do ferro inorgânico encontrado nos alimentos está presente na forma  $Fe^{3+}$ , sendo fornecido por vegetais e cereais. A aquisição do ferro da dieta na forma heme corresponde a 1/3 do total e é proveniente da quebra da Hb e mioglobina contidas na carne vermelha. Ovos e laticínios fornecem menor quantidade da forma de heme-ferro, que é melhor absorvida do que a forma inorgânica (52).

Devido a sua alta reatividade, o ferro tornou-se indispensável para a maioria dos seres vivos, porque participa de vários processos fundamentais e essenciais para a vida. Além disso, o ferro desempenha um papel importante no estresse oxidativo, via reação química de Fenton (Reação 1), onde íons ferrosos ( $Fe^{2+}$ ) são estequiometricamente oxidados pelo peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a  $Fe^{3+}$ , gerando a altamente reativa espécie de radical livre hidroxil ( $\bullet OH$ ). Entre as EROs, o  $\bullet OH$  é a mais reativa e extremamente tóxica,  $\bullet OH$  é produzida quando e onde o ferro está disponível e também disponível exista a EROS ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ). Ao passo que o ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) pode reduzir o ferro férrico para íons ferroso (Reação 2) que mantêm a produção de ( $\bullet OH$ ). O  $Fe^{2+}$  pode reagir com o oxigênio ( $O_2$ ) para formar o superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ). O ferro reage com o  $O_2^{\bullet -}$  produzindo o radical  $\bullet OH$ , conforme a reação de Haber-Weiss (Reação 3). Na verdade, durante a respiração celular normal, o fluxo de elétrons na cadeia respiratória pode gerar  $O_2^{\bullet -}$  e  $H_2O_2$ , proporcionando assim os substratos, que na presença de ferro, produz o  $\bullet OH$ . A toxicidade do ferro e a capacidade da privação do ferro em evitar a formação de  $\bullet OH$ , pela inibição da reação de Haber-Weiss, fornecem um forte argumento para a utilização de quelantes de ferro ou dietas deficientes em ferro na prevenção do estresse oxidativo (6, 18, 42-43). O radical hidroxil ( $\bullet OH$ ) é uma molécula de curta

duração (meia-vida  $\sim 10^{-9}$  s) que reage diretamente onde é formado sem ter o tempo para se difundir e é oxidante (47).



Fonte: (40).

A perda da homeostase de ferro pode induzir a vários estágios de doença de um organismo. Milhões de pessoas em todo o mundo sofrem com insuficiência de ferro a qual resulta em sínteses insuficientes de proteínas que contém ferro em suas estruturas das quais a redução da hemoglobina é facilmente diagnosticada. Em contraste a hemocromatose consiste na absorção anormal de ferro, levando a seu acúmulo em vários órgãos, o que favorece a formação de radicais livres e, conseqüente, danos oxidativos (59).

### 2.3.1. ABSORÇÃO DE FERRO

O ferro dietético é absorvido predominantemente no duodeno e no jejuno proximal, quer como heme ou não-heme. O ferro férrico,  $\text{Fe}^{3+}$ , tem a absorção facilitada através de um sistema de transporte. Assim, a ferreredutase DcytB (citocromo duodenal B), uma enzima heme da superfície apical do enterócito, transfere os elétrons do NADPH para o  $\text{Fe}^{3+}$  convertendo-o na forma mais facilmente absorvível, o  $\text{Fe}^{2+}$ . O  $\text{Fe}^{2+}$  liga-se ao transportador apical transmembranar DMT-1 (transportador de metal divalente 1) (Figura 7) que o libera no citoplasma celular. No citoplasma do enterócito, o ferro pode se ligar à proteína de armazenamento ferritina ou ser translocado para o outro lado da membrana basolateral. A ferritina, cuja

expressão é estimulada pelo ferro, pode atuar como um inibidor da absorção deste, pois quando os enterócitos são descartados, por renovação celular do intestino, naturalmente o ferro complexado a ferritina é excretado. A ferroportina é o transportador mais importante de ferro sobre a superfície basolateral do intestino. Esta proteína é responsável pela exportação de ferro intestinal para o sangue. O  $\text{Fe}^{3+}$  é então incorporado à transferrina, que faz seu transporte através do plasma, para os tecidos. O complexo transferrina é captado pelos tecidos através do receptor de transferrina (5, 8, 10-11, 51-52, 60).

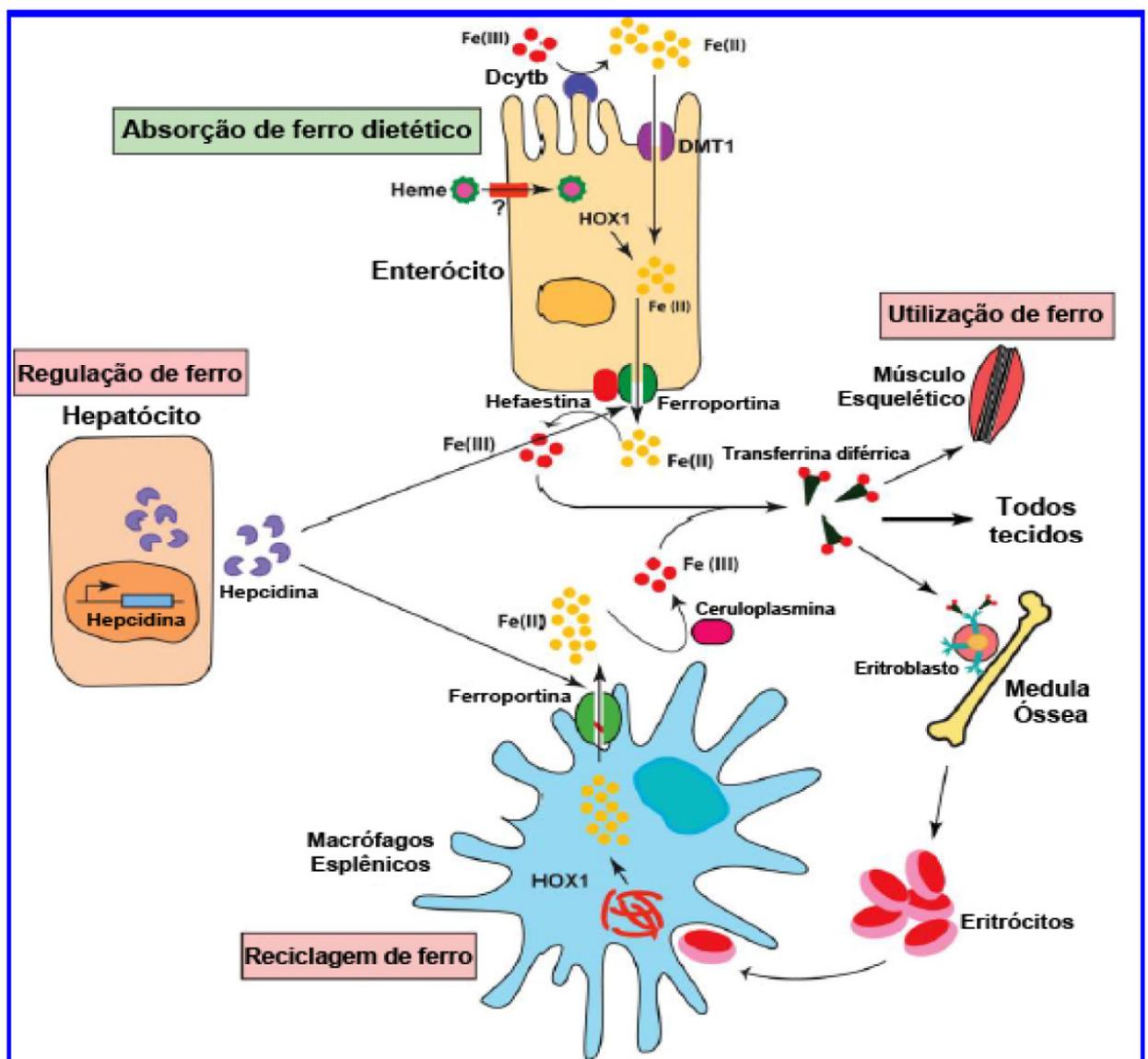


Figura 7: Regulação do metabolismo de ferro sistêmico. Órgãos e células envolvidas no balanço de ferro sistêmico são visualizados. Os enterócitos duodenais absorvem o ferro dietético via DMT-1 localizado na superfície apical, após a redução do  $\text{Fe}^{3+}$  para  $\text{Fe}^{2+}$  pela duodenal citocromo B

(DcytB). Os macrófagos do reticuloendotelial esplênico reciclam o ferro das células vermelhas senescentes do sangue. As células liberam o ferro via ferroportina, com o auxílio da hephaestina que oxida o  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ . Alternativamente, o ferro pode ser oxidado pela ação da ceruloplasmina, uma enzima plasmática, que possui em sua estrutura o íon cobre. A transferrina plasmática captura e circula com o ferro pelo corpo. A hepcidina hepática regula o efluxo de ferro a partir destas células através da regulação da estabilidade da ferroportina. A síntese e a secreção da hepcidina pelos hepatócitos são influenciadas pelos níveis de ferro no corpo, bem como as condições que afetam o metabolismo do ferro indiretamente, tais como a inflamação, estresse do retículo endoplasmático, eritropoiese e hipóxia, além de outros processos (54).

## **2.4. MARCADORES MOLECULARES DO ESTADO CORPORAL DE FERRO**

### **2.4.1. HEPCIDINA**

O papel hormonal da hepcidina foi descoberto em experimentos animais em que camundongos deficientes de hepcidina desenvolviam sobrecarga de ferro, especialmente no fígado, pâncreas e coração. Por outro lado, animais que superexpressavam a hepcidina apresentavam anemia microcítica hipocrômica ao nascimento e morriam rapidamente. Ficou assim estabelecido que a hepcidina seria um regulador negativo do metabolismo do ferro (52).

A mobilização de ferro dos tecidos de reserva é controlada pelo hormônio regulador da homeostase sistêmica de ferro a hepcidina, o qual foi primeiramente purificado no plasma e na urina (54). A hepcidina é um hormônio peptídeo sintetizado primeiramente na forma de um propeptídeo com 84 aminoácidos e, subsequentemente, é processado e secretado na circulação, contendo resíduos de aminoácidos, podendo ser detectado no plasma e na urina. Sua síntese aumenta em resposta aos níveis altos de ferro e à inflamação e reduz em resposta à eritropoiese ativada. Quando os níveis de ferro são elevados, os hepatócitos sintetizam e excretam hepcidina na circulação (51-52, 55-56, 61). A hepcidina interage com a ferroportina, uma proteína transmembrana, exportadora de ferro, localizada na membrana basolateral das células exportadoras de ferro (enterócitos, macrófagos e

hepatócitos). O complexo formado, hepcidina e ferroportina sofre endocitose, sendo então degradado. O mecanismo de *feedback* é importante para a regulação dos níveis de ferro circulante impedindo a exportação de ferro quando os níveis plasmáticos estão aumentados (47).

A hepcidina inibe a exportação de ferro para o plasma a partir de três fontes principais de ferro: absorção dietética no duodeno, a liberação de ferro reciclado dos macrófagos e a liberação de ferro armazenado dos hepatócitos (56, 62). A hepcidina age nas células alvo, regulando a quantidade de ferro que lançam para o plasma, regulando, portanto o efluxo de ferro celular ao se ligar ao exportador de ferro ferroportina (FPN), induzindo a internalização e degradação da ferroportina, o que resulta na redução da liberação de ferro (8, 62). A ferroportina é o único exportador de ferro inorgânico, identificado nas células de mamíferos. A transcrição de hepcidina é induzida por ferro ou estresse do retículo endoplasmático e é inibida pela deficiência de ferro (54).

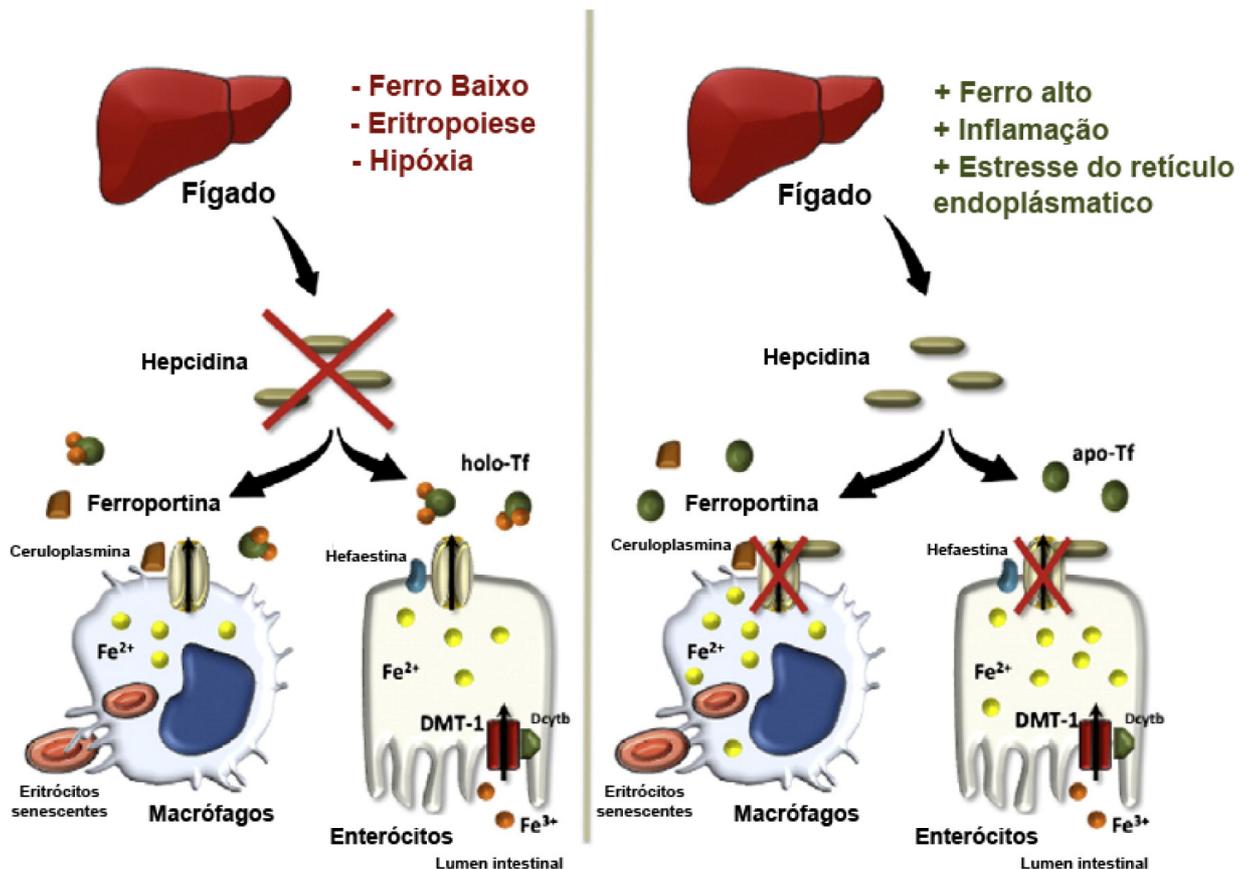


Figura 8: Regulação sistêmica do tráfego de ferro por hepcidina. Enterócitos duodenais assimilam ferro dietético a partir do lúmen intestinal através DMT-1, após a redução de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$

por ação da enzima Dcytb. Macrófagos reticuloendotelial reciclam ferro por degradação de células vermelhas senescentes do sangue. Ambos os tipos de células liberam  $\text{Fe}^{2+}$  para o plasma, via ferroportina, o qual é então re-oxidado a  $\text{Fe}^{3+}$  por ação das enzimas hefaestina ou ceruloplasmina, e capturado pela apo-Tf na circulação sanguínea. A hepcidina liberada pelo fígado inibe o efluxo de ferro a partir destas células através da ligação a ferroportina, que promove a sua internalização e degradação lisossomal (63).

Os hepatócitos funcionam não apenas como células de armazenamento de ferro, mas também como células endócrinas que produzem o hormônio hepcidina. A Figura 8 mostra o papel de hepcidina na homeostase de ferro e nas desordens. A hepcidina regula negativamente os principais fluxos de ferro que entram no compartimento de plasma, desde a absorção de ferro dietético no duodeno, a liberação de ferro reciclado a partir de macrófagos e a liberação de ferro armazenado nos hepatócitos. Por sua vez, a produção de hepcidina é regulada pelos níveis de ferro nos hepatócitos, de modo que a síntese de hepcidina é aumentada nos hepatócitos, a medida que os níveis de ferro aumentam nos hepatócitos. Uma vez secretada no plasma sanguíneo, a hepcidina limita tanto a absorção de ferro, quanto a exportação dos estoques. Enquanto na deficiência de ferro, os hepatócitos reduzem a síntese de hepcidina, permitindo que mais ferro seja liberado no plasma via absorção e a mobilização dos estoques. Outros efetores atuam na regulação da síntese de hepcidina, entre estes os níveis de transferrina diférrica. Além disso, a hepcidina é homeostaticamente regulada também pela atividade eritropoiética. Durante a eritropoiese ativa a produção de hepcidina é suprimida, assim aumenta a disponibilização de ferro para a síntese de hemoglobina. A natureza do sinal supressor é desconhecida, mas há evidências de que este pode ser um fator circulante produzido por precursores eritróides na medula óssea (48, 56).

A homeostase sistêmica de ferro é controlada pela hepcidina que inibe o tráfego de ferro para o corrente sanguínea. A hepcidina funciona ligando-se ao exportador de ferro, ferroportina, o que leva a sua internalização e degradação por lisossomos. Assim, a hepcidina inibe o efluxo de ferro das células que expressam ferroportina, tais como os enterócitos duodenal, macrófagos reticulo endotelial e hepatócitos. Estas células repõem a circulação com os reservatórios de ferro derivados de absorção dietética, fagocitose de eritrócitos senescentes ou dos

estoques corporais. A manutenção de fontes adequadas de ferro no plasma é essencial para a eritropoiese e para as funções metabólicas celulares. Sob condições de deficiência de ferro ou demanda eritropoiética aumentada, os níveis de hepcidina reduzem estimulando os fluxos de ferro para o plasma, onde a metal é capturado pela transferrina e entregue aos eritroblastos e outras células. Por outro lado, a ingestão de ferro aumenta a expressão de hepcidina, que por sua vez inibe a absorção de ferro dietética e resulta na retenção do metal nas células. Sugere-se que essas respostas existam para evitar o acúmulo de ferro no organismo, uma vez que o ferro livre é potencialmente tóxico e promove o estresse oxidativo e danos nos tecidos, conforme reações de Fenton e de Haber-Weiss, já descritas acima. A hepcidina foi originalmente identificada como sendo um hormônio antimicrobiano, isto porque seu efeito hipoferrêmico relacionado à inflamação pode proteger o organismo contra a invasão de patógenos privando-os de uma fonte potencial de ferro, que é necessário para o seu crescimento (64).

Pesquisadores mostraram que uma dieta com sobrecarga de ferro pode exceder a capacidade da hepcidina em inibir a absorção de ferro. Esta hipótese sugere que o sistema regulatório de hepcidina registra exclusivamente o ferro que sofreu o processamento metabólico e é compartimentalizado dentro da transferrina plasmática ou das células hepáticas. A hepcidina eficientemente regula a absorção de ferro da dieta quando a fonte nutricional do metal se encontra dentro de um limiar fisiológico, mas aparentemente não responde adequadamente aos desafios supra-fisiológicos de ferro, tais como uma ração enriquecida com ferro carbonil 2%. Esses pesquisadores mostraram que a capacidade da hepcidina de funcionar como um regulador negativo da absorção de ferro é diminuída acima dos níveis fisiológicos da oferta de ferro (64).

Além dos níveis intracelulares de ferro nos hepatócitos, dos níveis de transferrina biférrica e da atividade eritropoiética, outros elementos alteram a expressão da hepcidina hepática. Dentre estes, o elemento responsivo ao AMP cíclico ligado à proteína H (CREBh) está implicado na ativação transcricional da hepcidina durante o estresse do retículo endoplasmático e mostra contribuir parcialmente para a resposta da hepcidina ao estímulo inflamatório *in vivo* (55).

## 2.4.2. FERRITINA

As espécies reativas de oxigênio (EROS) funcionam como moléculas de sinalização intracelulares, como ativadores de fatores de transcrição redox e pela regulação da expressão de genes. As EROS estão associadas ao processo de envelhecimento aumentando os níveis de produtos oxidados, que são deletérios para a célula. Os danos oxidativos causados pelo excesso de EROS induzem mecanismos celulares protetores que promovem um processo adaptativo (65).

Portanto, o excesso de ferro na célula é transformado em uma forma inerte, capaz de evitar os danos oxidativos intracelulares. Uma dessas formas é a ferritina, proteína esférica, composta por 24 subunidades polipeptídicas, cadeias leves (L) e pesadas (H), capaz de armazenar dentro desta molécula cerca de 4500 átomos de ferro. Na ferritina, o ferro é armazenado na forma férrica. Cada subunidade de ferritina pesada tem um sítio catalítico que oxida e um par de átomos ferrosos. Quando os níveis de ferro celulares são escassos, o ferro pode ser liberado a partir da ferritina por mecanismos que ainda são desconhecidos (6, 10, 47, 66).

A maioria da ferritina é localizada no citosol ou nos lisossomos, onde é degradada. As duas subunidades possuem diferentes funções no metabolismo do ferro. A ferritina H está associada a utilização de ferro e com sua atividade ferroxidase, que a torna responsável pela conversão de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ , enquanto a ferritina L está associada ao armazenamento de ferro celular e estabiliza a estrutura da ferritina além de facilitar a absorção de ferro. Esta distinção é importante porque a proporção das formas H: L é célula e tecido específico e determina o padrão de armazenamento de ferro e sua utilização. Em tecidos como o fígado e o baço, que desempenham um papel dominante no armazenamento de ferro, a ferritina é predominantemente composta da subunidade L. Em contraste, em órgãos tais como o cérebro e coração, onde há uma grande necessidade de disponibilidade de ferro, a razão H: L é muito mais elevada (6, 47, 60, 67).

A ferritina rica em subunidades H localizada no coração e cérebro tem uma elevada atividade ferroxidase, portanto esta oxida e sequestra ativamente o ferro e tem uma atividade antioxidante pronunciada, enquanto a ferritina rica na subunidade

L localizada no baço e no fígado forma moléculas fisicamente mais estáveis, as quais podem conter uma grande quantidade de ferro na cavidade e tem uma maior função pronunciada de estocar ferro (68). A subunidade de ferritina H possui ferro catalítico ligado aos sítios que compõem o centro ferroxidase. A subunidade L de ferritina possui resíduos de aminoácidos conhecidos como os sítios de nucleação que proporcionam ligantes para a ligação dos íons  $\text{Fe}^{3+}$  que iniciam o crescimento dos cristais no interior da ferritina (66).

Em geral, 95-98% de ferro não-heme está ligado à ferritina, o maior armazenador de ferro e proteína de desintoxicação. Os níveis de ferro lábil determinam a extensão da síntese de novas subunidades de ferritina ou a degradação de ferritina existente, conforme os níveis intracelulares de ferro. Em excesso, o Fe é neutralizado dentro da ferritina e na escassez, o ferro é liberado para atender às necessidades fisiológicas. Este processo é regulado por meio de proteínas reguladoras de ferro citoplasmático (IRP) e elementos responsivos a ferro (IRE) localizados na extremidade 5' do mRNA das subunidades de ferritina (20, 65). As IRPs quando ligados aos IREs, impedem a ligação do mRNA aos ribossomos prevenindo assim a tradução da proteína ferritina. Esses mecanismos regulatórios controlam a quantidade de ferritina que é expressa na célula (66) (Figura 9).

A regulação pós-transcricional da ferritina permite a rápida produção da ferritina em resposta ao ferro intracelular ou ao estresse oxidativo e inibe a síntese de ferritina na ausência desses sinais, a Figura 9 ilustra este mecanismo. O fato da ferritina ser expressa na resposta ao estresse oxidativo pode indicar um importante papel para ferritina na redução do *pool* de ferro lábil capaz de minimizar o potencial de formação das espécies reativas de oxigênio (66).

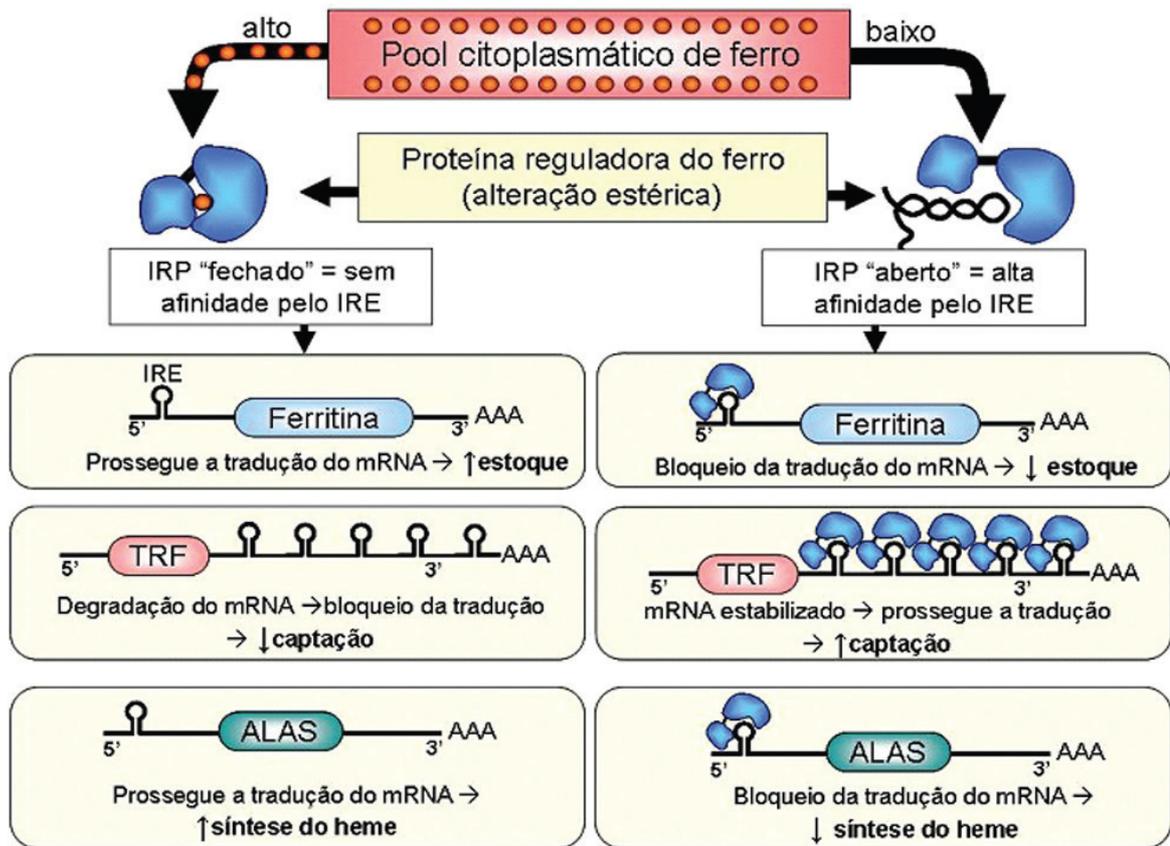


Figura 9: Homeostase do ferro intracelular; IRP: proteína reguladora do ferro; IRE: elementos responsivos ao ferro; TfR: receptor da transferrina (Tf); ALA-S: 5-aminolevulinato sintase. À esquerda condições com altas concentrações de ferro intracelular. A não ligação da IRP ao IRE na extremidade 5' do mRNA favorece a síntese das proteínas (ferritina e ALA-S), enquanto na extremidade 3' bloqueia sua tradução (TfR), diminuindo a captação do ferro pela célula. À direita: condições com baixas concentrações de ferro intracelular. A ligação da IRP ao IRE leva à redução de estoque e da utilização do ferro para a síntese do heme e, por outro lado, estabiliza o mRNA do TfR, favorecendo uma maior captação do ferro pela célula (69).

A expressão de ferritina nos tecidos é regulada em nível de tradução, pelo ferro intracelular lábil, por meio do sistema de IRP / IRE. Os IREs são regiões não traduzidas do mRNA de ferritina localizadas na extremidade 5' e as IRPs são proteínas citoplasmáticas que são isoformas da aconitase e contêm o centro ferro enxofre (Fe-S) com a capacidade de se ligar a quatro átomos de ferro (11, 66). Com a dieta restrita em ferro, essas proteínas perdem os átomos de Fe do centro  $Fe_4-S_4$ , alterando a sua conformação tetraédrica e transformando-os em IRPs que se ligam aos IRES situados no mRNA de várias proteínas relacionadas com metabolismo do

ferro. Quando os IRES estão localizados na extremidade 5' dos mRNAs, como por mRNAs das cadeias L e H da ferritina e em mRNA de ferroportina, a ligação da IRP / IRE impede a tradução destas proteínas. No entanto, quando os IRES estão localizados na região 3', os quais ocorrem nos mRNAs de transportador de metal divalente-1 (DMT-1) e do receptor de transferrina (TfR), a ligação da IRP / IRE promove a estabilização destes mRNAs contra as enzimas RNAases (endonuclease), favorecendo a síntese das proteínas DMT-1 e TfR. Por outro lado, o excesso de ferro promove a formação do centro tetraédrico  $Fe_4-S_4$ , transformando a proteína IRP na enzima aconitase. Nesta conformação, a proteína perde a capacidade de se ligar aos IRES, permitindo assim a síntese das cadeias L e H da ferritina e ferroportina. No entanto, a ausência de ligação das IRPs aos IRES localizados na extremidade 3' do mRNA torna-os mais susceptíveis à hidrólise, o que resulta na redução da tradução das proteínas de DMT-1 e TfR (11, 66).

As interações entre o elemento responsivo ao ferro (IRE) e as proteínas reguladoras de ferro (IRP) são afetadas pelas concentrações de ferro celular, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e oxigênio molecular. É sugerido que o peróxido de hidrogênio sinaliza o alerta oxidante e inicia a tradução adicional de ferritina em consequência do envelhecimento. Alterações oxidativas associadas a idade podem indicar não só a deterioração do mecanismo de defesa celular, mas também a adaptação celular ao envelhecimento (20, 65).

### **2.4.3. DMT-1 – TRANSPORTADOR DE METAL DIVALENTE - 1**

O transportador de metal divalente 1 foi identificado pela primeira vez em duodeno de ratos, onde este bombeia ferro e outros metais divalentes, por um mecanismo acoplado a hidrogênio através da membrana celular apical do enterócito. O DMT-1 é, também, de grande importância para a liberação de ferro do endossoma para o citoplasma, uma vez que mutações desse transportador levam ao desenvolvimento de anemia por deficiência de ferro. Esse transportador coopera com uma redutase duodenal citocromo B ligada a uma membrana férrica,

denominada DcytB, a qual reduz o ferro férrico a ferroso na membrana externa, um pré-requisito para o transporte desse mineral por DMT-1 (70).

As espécies reativas de oxigênio (EROS) contribuem com o dano celular em doenças inflamatórias e na sobrecarga de ferro. Pouco se sabe sobre a regulação do transporte de ferro durante o ataque inflamatório. Um estudo recente, desenvolvido por Hansen e colaboradores (2012) (71) demonstrou que em uma combinação de ensaios *in vitro* e estudos *in vivo*, pode-se concluir que a citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  induz a expressão do transportador de metal divalente 1 (Dmt1) correlacionando com maior teor de ferro celular e com o aumento na produção de EROS. No entanto, quelantes de ferro e a expressão gênica de Dmt1 reduzem a formação de EROS induzida por citocinas e a morte celular (71).

## **2.5. MARCADORES MOLECULARES DE ESTADO REDOX**

### **2.5.1. CREBh**

As células têm vários mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo molecular. O CREBh, um fator de transcrição hepatócito-específico pertencente à família do fator de transcrição do elemento responsivo ao AMP cíclico ligado a proteína H (CREBh) (72-73), é ativado pelo estresse do retículo endoplasmático. Uma vez ativado, esse fator de transcrição (CREBh) regula o metabolismo do ferro através da indução de hepcidina (55), e também é necessário para induzir a expressão da proteína C reativa (PCR), que está envolvida na resposta de fase aguda (74).

Esse fator de transcrição denominado CREBh está localizado no retículo endoplasmático e sua expressão é restrita ao fígado (22, 75). Sendo específico do fígado seus níveis aumentam em resposta a indutores de estresse do retículo endoplasmático e a citocinas proinflamatórias (75). Este fator de transcrição, o

CREBh ativa diretamente a transcrição de genes envolvidos na resposta da fase aguda (26). O CREBh se liga à região promotora do gene da hepcidina induzindo a sua expressão (26). O CREBh pode ser um modulador da síntese de hepcidina via sinalização da eritropoietina na eritropoiese aprimorada. Estudos recentes mostram que este fator de transcrição influencia a expressão da hepcidina (76).

### **2.5.2. Nrf2 – FATOR NUCLEAR ERITRÓIDE 2 RELACIONADO AO FATOR 2**

Evidências ao longo da última década apontam para Nrf2 como um regulador chave da resposta celular ao estresse oxidativo, em vários tipos de células e tecidos, incluindo o fígado. Recentemente foi identificado o Nrf2 como um regulador transcricional da proteção celular antioxidante (25).

O fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2/Nfe2l2) é um membro da subfamília dos fatores de transcrição. O Nrf2 não foi demonstrado como sendo essencial para a diferenciação celular sanguínea, mas foi caracterizado por mediar a indução de um conjunto de enzimas metabolizadoras de drogas, tal como a glutathione S-transferase (GST). A principal função emergente do Nrf2 é o seu papel na resistência ao estresse oxidativo. O RNA do Nrf2 expresso de forma ampla e independentemente de indutores, sugere um mecanismo pós-transcricional para a ativação do Nrf2. O Nrf2 afeta diretamente a homeostase de EROS e espécies reativas de nitrogênio (ERNS), regulando os sistemas de defesa antioxidante através de vários mecanismos (24).

Estudos anteriores reportaram que o envelhecimento está associado com a redução na capacidade antioxidante e com o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROS/ERNS). Os níveis de EROS/ERNS celular são regulados pelo sistema de defesa induzido incluindo as enzimas antioxidantes. Estes são normalmente regulados pelo fator de transcrição Nrf2. A ativação do estado de equilíbrio do Nrf2 fornece citoproteção do estresse oxidativo (23).

O estresse oxidativo é igualmente regulado pelo fator de transcrição nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nfe2l2) em vários tipos de células e tecidos, incluindo o fígado (24-25). O Nfe2l2 controla a expressão basal e induzida de um conjunto de genes que apresentam na região promotora elementos responsivos a antioxidantes (ARE) e regulam as respostas fisiológicas e patofisiológicas da exposição oxidante (24).

## **2.6. MARCADORES MOLECULARES DO ENVELHECIMENTO**

### **2.6.1. PROTEÍNA 30 MARCADORA DE ENVELHECIMENTO (SMP30)**

No intuito de identificar proteínas hepáticas associadas ao envelhecimento, pesquisadores realizaram uma eletroforese bidimensional de poliácridamida com tecidos hepáticos de ratos jovens e idosos para definir diferentes perfis de proteínas solúveis em água. Isso resultou na detecção, isolamento e purificação de uma proteína de 30 kDa independente de andrógenos e cuja expressão era reduzida na senescência. Sendo designada assim como proteína 30 marcadora de envelhecimento (SMP30) (77).

Análises em tecidos de ratos mostraram que a SMP30 é expressa especificamente no fígado e no rim, onde sua imunoreatividade foi localizada nos hepatócitos e no epitélio tubular renal (78-80). Em camundongos a expressão é restrita ao fígado e em humanos, além do fígado e rim, também pode ser expresso no pâncreas e coração. Com o avanço da idade no processo da senescência, os níveis de transcritos da SMP30 reduzem significativamente no fígado e no rim de ratos (78).

Especula-se que a SMP30 tenha um papel importante na homeostase de  $Ca^{2+}$  intracelular. Além disso, durante o processo de envelhecimento a redução da

SMP30 pode conduzir a alterações senis na capacidade de tamponamento para o  $\text{Ca}^{2+}$  e desregulações dos sinais de  $\text{Ca}^{2+}$  no fígado e rim de idosos (78).

A SMP30 é reconhecida por possuir capacidade de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$ , por isso também é conhecida como regucalcina. Mais recentemente, a SMP30 foi caracterizada por ser multifuncional como proteína reguladora no processo de sinalização intracelular, tal como, a ativação de proteínas na apoptose e a regulação de proteínas dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ , proteína fosfatase, óxido nítrico sintase e supressão de DNA nuclear e síntese de RNA (80).

A ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  com a SMP30 facilita o transporte deste íon através da membrana celular para o meio extracelular, resultando em uma concentração intracelular reduzida de  $\text{Ca}^{2+}$ . A SMP30 tem sido responsabilizada pelo aumento da atividade de bombeamento de  $\text{Ca}^{2+}$  na membrana plasmática do fígado e rim. Como um importante regulador dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , as alterações que ocorrem na SMP30 tornam-se significantes funcionalmente para manter a homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  durante o envelhecimento. Quando a expressão de SMP30 reduz durante o envelhecimento o organismo torna-se susceptível para que os estímulos nocivos aumentem. A modulação da atividade de bombeamento de  $\text{Ca}^{2+}$  pela SMP30 pode ser um fator crucial na homeostase celular e na sobrevivência da célula (21, 81).

Embora a sua função genuína em humanos seja ainda desconhecida, estudos em uma linhagem celular de hepatoma humano sugeriram que a SMP30 regule os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmáticos, por meio da modulação da atividade de bombeamento de  $\text{Ca}^{2+}$  independente de sódio em membranas plasmáticas. Em ratos, esta proteína participa na síntese da vitamina C (82) e parece proteger as células contra a apoptose e outras lesões (81), por outro lado existe uma correlação negativa entre a expressão de SMP30 e níveis de espécies reativas de oxigênio no fígado e rins de ratos (80). Assim, a redução de SMP30 com o envelhecimento parece estar associada à fragilidade senescente, que contribui para a deterioração das funções celulares.

Camundongos que não expressam a proteína SMP30 (*knock-out*) mostraram 20% de perda de peso corporal e redução da expectativa de vida comparado com os selvagens. Em relação a mudanças fenotípicas, os camundongos SMP30 *knock-out*

apresentaram mudanças que mimetizam o processo de envelhecimento precoce (79-80, 83).

A SMP30, ainda participa do controle da atividade de enzimas antioxidantes. Sugere-se que a redução da SMP30 associada à idade está relacionada com o estresse oxidativo. Essa proteína parece ser capaz de suprimir a geração de espécies reativas nos hepatócitos e a redução dos níveis de SMP30 no processo de envelhecimento está correlacionada com o aumento dos níveis da geração de espécies reativas no fígado e nos rins de ratos (80).

Recentemente foi observado que a proteína SMP30 em ratos é homóloga a gluconolactonase, a qual no metabolismo dos mamíferos é envolvida na biossíntese de ácido-ascórbico (79). No entanto, os seres humanos são incapazes de sintetizar a vitamina C *in vivo*, porque há mutações no gene da gulonolactona oxidase. Essa enzima catalisa a conversão da gulono- $\gamma$ -lactona-L em ácido ascórbico-L (82). Conseqüentemente, como a vitamina C é um antioxidante, baixos níveis dessa vitamina pode ser um dos fatores responsáveis pela indução do processo de envelhecimento. Resumindo, se o organismo apresentar menor concentração de SMP30, provavelmente, menos vitamina C será sintetizada acelerando a senescência.

### **2.6.2. FERRITINA**

Além dos níveis dos transcritos da ferritina serem marcadores do estado de ferro, são também associados ao envelhecimento. Associações entre o teor de ferro, os níveis de ferritina e o envelhecimento podem ser observados em diversas pesquisas, como já relatado nesse trabalho, tal como Bulvik et al. (2009 e 2011) (20, 65) que analisaram o efeito da ferritina em tecidos de ratos jovens e velhos, além de Kurz et al. (2011) (47) que forneceu novas pistas sobre a associação do envelhecimento com a ferritina e o metal ferro.

### 2.6.3. HEPCIDINA

Como o envelhecimento pode ser devido a acúmulo de ferro nos tecidos de animais e seres humanos (12, 17-18, 42, 84), assim, níveis elevados de hepcidina diminuem a mobilização de ferro no corpo, levando a esse acúmulo de ferro nos tecidos (62, 75). A identificação de uma sobrecarga de ferro nos tecidos suporta a hipótese de que o excesso de ferro no organismo possa estar envolvido na etiologia de patologia do processo de envelhecimento. Assim, os níveis dos transcritos da hepcidina são marcadores do estado de ferro e também estão indiretamente associados ao envelhecimento.

## 2.7. MARCADOR MOLECULAR DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

### 2.7.1. INTERLEUCINA 1- $\beta$ - IL1 $\beta$

A ativação do sistema imune inato e a presença de baixo grau de inflamação são características comuns do processo de envelhecimento. Pesquisadores consideram esse estado pró-inflamatório crônico como “*inflammaging*”. Os inflamassomas são complexos intracelulares de multiproteínas que podem ser ativados por um grande conjunto de sinais de riscos evocados pela presença de agentes patogênicos e de estresse celular, por exemplo, estresse oxidativo, o efluxo de potássio e acúmulo de lipídeos. A imunidade inata é crucial no sistema de defesa que pode reconhecer os patógenos invasores e endógenos, sinais relacionados ao estresse, a fim de evitar lesões de hospedeiros. Inúmeros ativadores do complexo inflamassoma são fatores comuns no próprio processo do envelhecimento e, ainda, mais frequentes em muitas doenças relacionadas a idade (85).

As citocinas fazem parte de um grupo de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes e processos inflamatórios. Todas as células nucleadas são capazes de sintetizar estas

proteínas e, por sua vez reagir a estas. Tradicionalmente, as citocinas foram divididas em pró-inflamatórias (por exemplo, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) e citocinas anti-inflamatórias (por exemplo, IL-1Ra, IL-4, IL-10, IL-13). As funções efetoras mediadas por citocinas pró-inflamatórias podem ser inibidas por citocinas anti-inflamatórias ou por antagonistas específicos dos receptores de citocinas. A IL-1 $\beta$  é primeiramente sintetizada como uma proteína imatura de 31 kDa denominada Pro-IL-1 $\beta$ . Esta Pro IL-1 $\beta$  permanece no citosol até ser convertida em uma IL-1 $\beta$  madura de 17,5 kDa por clivagem proteolítica (86). Um desequilíbrio entre as citocinas pró- e anti-inflamatórias tem sido observado em várias doenças. Os efeitos sistêmicos da IL-1 $\beta$  estão refletidos na regulação da taxa metabólica basal, nos níveis de glicose no sangue, na pressão arterial, no metabolismo do ferro e na remodelação óssea. Além disso, a IL-1 $\beta$  tem emergido como uma ligação molecular crítica entre os sistemas imunológico e neuroendócrino, tendo um papel fundamental em processos tais como a regulação termostática, percepção da dor e do apetite. A IL-1 $\beta$  liberada por vários tipos de células é induzida pelos diversos estímulos inflamatórios, tais como os produtos de bactérias (por exemplo, LPS), citocinas (por exemplo, TNF- $\alpha$ ) e lipídios bioativos (fator ativador de plaquetas). Essa e outras citocinas semelhantes desempenham um papel central no crescimento celular, na reparação de tecidos e nas doenças inflamatórias crônicas (86).

Para entender as bases moleculares do envelhecimento e para identificar biomarcadores do envelhecimento usamos a técnica de qPCR para caracterizar perfis de expressão gênica tecido-específico associados a senescência dos ratos.

### **3. OBJETIVO GERAL**

Investigar o efeito da suplementação e da restrição de ferro dietético nos biomarcadores de estresse oxidativo e de envelhecimento em ratos adultos.

#### **3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o efeito do teor de ferro dietético sobre a concentração dos biomarcadores do status ou estado nutricional relativo ao ferro em ratos adultos,
- Avaliar o efeito do teor de ferro dietético sobre os níveis de danos oxidativos a lipídeos e proteínas nos tecidos em ratos adultos,
- Avaliar o efeito do teor dietético de ferro sobre os níveis de transcritos dos genes envolvidos na homeostase do ferro e no estresse oxidativo e de proteínas marcadoras de envelhecimento em tecidos de ratos adultos.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. ANIMAIS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, UnB, UnBDOC nº100.199/2009.

Nesse experimento foram utilizados 26 ratos Wistar machos, adquiridos do Laboratório Bioagri® localizado em Planaltina, Distrito Federal, Brasil. Os ratos foram separados em quatro grupos recebendo tratamentos diferentes, alojados no biotério do Laboratório de Biofísica em gaiolas individuais de inox com grade, aclimatados com temperatura controlada entre  $22 \pm 2$  °C, submetidos ao ciclo de luz/escurecimento de 12h/12h. As dietas (30 g) foram oferecidas durante o ciclo de escurecimento com livre acesso à água. Os animais (20 ratos adultos - 15 meses) tiveram um período de aclimação de três meses com dieta comercial (Ração Labina - Purina®) para posterior separação aleatória nos grupos e tratamentos com as respectivas dietas abaixo descritas por um período de 78 dias (12 semanas). Seis ratos com dois meses de idade foram considerados ratos controle jovens, para efeito de comparação com os ratos adultos, foram sacrificados por deslocamento cervical, não sendo submetido a nenhum tratamento.

Para o período de tratamento, os ratos adultos foram tratados com uma dieta padrão para roedores denominada AIN- 93M, formulada, em 1973, por um comitê *ad hoc* formado pelo Instituto Americano de Nutrição (AIN) que identificou padrões dietéticos para estudos nutricionais com roedores de laboratório (87). E o “M” no final do nome da dieta AIN-93M, significa manutenção, a qual é recomendada para roedores adultos para manutenção. A composição dessa dieta AIN-93M esta apresentada na Tabela 1. E, especificadamente, a composição da mistura mineral na Tabela 2.

A dose de suplementação e restrição de ferro foi determinada a partir do valor denominado “Limite Superior Tolerável de Ingestão” (40 mg/dia) descrito para

indivíduo adulto de 70 kg, ajustando-se o valor proporcional à recomendação para ratos. E a quantidade de ferro na dieta com restrição de ferro correspondeu à contaminação com ferro inerentes dos ingredientes da dieta, sendo estimada em 30% da recomendação descrita na AIN-93M, após a dosagem.

Tabela 1 – Composição da dieta AIN-93M para roedores adultos em manutenção (87).

Ingredientes	g/kg de dieta
Amido	465,692
Caseína ( $\geq$ 85% de proteína)	140
Amido Dextrinizado (90-94% de tetrassacarídeos)	155
Sacarose	100
Óleo de soja (sem aditivos)	40
Fibra	50
Mistura mineral	35
Mistura vitamínica	10
L-Cistina	1,8
Bitartarato de Colina (41,1% de colina)	2,5
Tert-butilhidroquinona	0,008

Tabela 2 – Contribuição dos elementos minerais na composição da mistura mineral da dieta AIN-93M para roedores adultos em manutenção (87).

Elementos minerais	mg/kg de dieta
Cálcio	5000
Fósforo <sup>1</sup>	1992
Potássio	3600
Enxofre	300
Sódio	1019
Cloreto	1571
Magnésio	507
Ferro	35
Zinco	30
Manganês	10
Cobre	6
Iodo	0,2
Molibdênio	0,15
Selênio	0,15
Elementos minerais potencialmente benéficos	
Silício	5
Cromo	1
Flúor	1
Níquel	0,5
Boro	0,5
Lítio	0,1
Vanádio	0,1

<sup>1</sup> Um total de 3000 mg P / kg de dieta é recomendado para esta dieta. A diferença entre a contribuição do mix e a quantidade recomendada na dieta é feita a partir da contribuição de fósforo da caseína.

Abaixo está a descrição dos grupos com as respectivas dietas caracterizadas, as quais os ratos foram submetidos por um período de 78 dias (12 semanas):

- Grupo Adulto Controle (CT): sete ratos submetidos a dieta AIN-93M com 35 mg de Fe/kg dieta. Este teor corresponde à recomendação de ferro para roedores (87).
- Grupo Adulto com Restrição de Ferro (ARF): cinco ratos submetidos a dieta AIN-93M isenta de Ferro, contendo apenas 10 mg de Fe/kg dieta, proveniente dos contaminantes residuais dos ingredientes (87).
- Grupo Adulto Enriquecido com Ferro (AEF): oito ratos submetidos a dieta AIN-93M; Enriquecida para um final de 350mg de Fe/kg dieta com sulfato ferroso heptahidratado (Sigma Aldrich®- Saint Louis, MO, EUA) (87).
- Grupo Jovem Controle: seis ratos obtidos com dois meses de idade.

Após o período de tratamento os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e seus órgãos - fígado, baço, coração, rim, intestino delgado (1 cm de comprimento de intestino delgado distal para o piloro e 1 cm proximal à válvula ileocecal foi excisado e o lúmen foi lavado com solução salina) e músculo esquelético (membro inferior) foram extraídos e lavados com solução salina 0,9% para retirada do excesso de sangue, o excesso de salina removido em papel toalha; os tecidos foram pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -70 °C em recipientes livres de RNase, tratados com DEPC 0,1% e DEPC 0,001% (Dietilpirocarbonato – Sigma- Aldrich® - Saint Louis, MO, EUA) até a realização das análises posteriormente. As amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca em tubos com e sem EDTA 7%.

## **4.2. RECORDATÓRIO DE PESO E CONSUMO DE DIETA**

Os animais foram pesados semanalmente para avaliação da evolução ponderal em balança de precisão com capacidade mínima de 0,5g e máxima de 2000g (Balança de precisão AS 2000C - Marte®). O consumo de dieta foi obtido diariamente através da diferença de peso entre a quantidade de dieta ofertada e a sobra.

## **4.3. ESTADO CORPORAL de FERRO**

Os parâmetros hematológicos foram obtidos no Laboratório Sabin® (Distrito Federal, Brasil). As células vermelhas, hemoglobina e hematócrito foram quantificados por analisador hematológico automatizado. A concentração de proteína C reativa (PCR) foi mensurada utilizando o método de imunoturbidimetria, o qual é baseado na aglutinação das partículas de látex revestidas com anticorpos anti-PCR, quando estes são misturados com soro contendo PCR. A atividade de gama glutamil transferase (GGT) foi determinada por ensaio cinético colorimétrico. Os parâmetros de ferro para ferro sérico, saturação de transferrina e concentração de transferrina foram determinados usando o ensaio colorimétrico baseado na ferrozina (Goodwin modificado).

## **4.4. DETERMINAÇÃO DE FERRO NOS ÓRGÃOS**

A concentração de ferro foi determinada usando o método descrito por Baranowska, Czernicki e Aleksandrowicz (1995) (88) com modificações. As amostras de fígado, coração, baço, rins, músculo esquelético e intestino foram

digeridas em digestor microondas (DGT 100 Plus) e o teor de ferro determinado por espectroscopia de emissão atômica (ICP – AES), utilizando a linha 238 nm. Uma curva de calibração foi obtida no intervalo de 0 a 10 ppm com solução Titrisol-Merck de Fe, para o cálculo das concentrações de ferro no tecido (88).

Foram utilizados aproximadamente 0,3 g do fígado e do músculo esquelético; 0,1 g do baço e coração; 0,4 g do intestino e do rim para determinação da concentração de ferro. Na cápsula de digestão foram adicionados às amostras 5 mL de HNO<sub>3</sub> PA (Sigma Aldrich Co., St Louis, MO, USA) e 2,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> PA (Sigma Aldrich Co., St Louis, MO, USA). As amostras foram então digeridas em forno microondas (DGT 100 Plus - Provecta Analítica Microwave System, Jundiaí, São Paulo, Brasil, 2003), de acordo com a metodologia descrita por Baranowska e colaboradores (1995) (88), utilizando o seguinte programa: 5 min – 330W; 6 min – 700W; 1 min – 800W; 20 min – 0W (resfriamento). Após a digestão, o volume das amostras foi completado para 25 mL com HNO<sub>3</sub> 0,1 mol/L, e filtrado em papel de filtro quantitativo faixa preta e armazenados em tubos sob refrigeração. A concentração de ferro nas amostras foi determinada por Espectroscopia de Emissão Atômica (ICP - AES - Shapes-Spectroflame Modulates – Spectro Analytical Instruments - Kleve-Germany) induzido por plasma e utilizando como fonte de excitação o gás argônio. Foi utilizada uma curva padrão construída com solução de ferro Titrisol Merck (Merk, Darmstadt, Germany) nas concentrações de 0 a 10 ppm. As emissões do elemento ferro foram registradas a 238nm. Os resultados foram expressos em µg de ferro por g de tecido. A exatidão do método para quantificação de ferro foi determinada utilizando uma amostra de referência (Rice Flour (1568a), United States Department of Commerce, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Maryland), analisada em triplicata. Todas as vidrarias utilizadas na realização das análises foram lavadas com HCl 10% por três horas no mínimo e, posteriormente, lavadas com H<sub>2</sub>O deionizada (sistema Milli-Q, Millipore Corporation) (88).

## 4.5. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE TRANSCRITOS

### 4.5.1. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL, ELETROFORESE, PRECIPITAÇÃO COM ACETATO E SÍNTESE DE cDNA

Os órgãos – coração, fígado, intestino e rim - foram macerados e homogeneizados em nitrogênio líquido, utilizando gral mortalha e as amostras aliqüotadas para extração do RNA. A extração do RNA total dos tecidos dos animais foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante do reagente Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), clorofórmio e o RNA presente na fase aquosa precipitado com álcool isopropílico lavado com etanol 70%, seco e ressuspendido em água deionizada e armazenado a -70 °C. Durante a homogeneização da amostra, o reagente Trizol® mantém a integridade do RNA, enquanto rompe células e dissolve componentes celulares. Depois de homogeneizar a amostra com o reagente Trizol®, clorofórmio é adicionado e o produto homogeneizado após centrifugação separa em uma fase aquosa e outra fase orgânica. O RNA permanece exclusivamente na fase aquosa. O RNA é precipitado a partir da camada aquosa com álcool isopropílico. O precipitado de RNA é lavado para remover as impurezas e em seguida ressuspensão para utilização em aplicações.

A determinação da concentração e o grau de pureza das amostras de RNA totais foram verificados através da determinação das absorbâncias a 230, 260 e 280 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 3000 UV-Visible, Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra) (89).

A verificação da pureza das amostras de RNA para resquícios de proteínas foi também realizada através de medida espectrofotométrica nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm e da determinação da razão 260/280nm, enquanto para contaminação com compostos aromáticos (como fenóis) foi utilizada a razão 260/230 nm. O valor de referência utilizado para avaliar as razões  $A_{260}/A_{280}$  e  $A_{260}/A_{230}$  foi maior ou igual a 1,8, onde:  $A_{260}$  = leitura espectrofotométrica de absorbância no comprimento de onda 260nm;  $A_{280}$  = leitura espectrofotométrica de absorbância no comprimento de onda 280nm;  $A_{230}$  = leitura espectrofotométrica de absorbância no comprimento de onda 230nm (89).

Posteriormente, as amostras de RNA total foram precipitadas com acetato de sódio anidro 3 mol/L e pH 5,2 (0,1 vol) (Sigma, Saint Louis, MO, EUA), etanol 100% (2,5 vol) a 4 °C (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) e incubado em gelo por 30 minutos. Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 10000 x g / 4 °C / 30 min (centrífuga Eppendorf, 5415R, Hamburgo, Alemanha). Após o descarte do sobrenadante foi adicionado ao precipitado 1 mL de etanol a 75% a 4 °C (Sigma, Saint Louis, MO, EUA). As amostras foram agitadas por inversão dez vezes e incubadas em gelo por cinco minutos. As amostras foram novamente centrifugadas a 10000 x g / 4 °C por cinco minutos e o sobrenadante descartado. O material foi seco a temperatura ambiente e posteriormente ressuspendido em 20µL de água deionizada.

Após esse procedimento, as absorvâncias a 230, 260 e 280 nm das amostras de RNA foram registradas (Ultrospec 3000 UV-Visible, Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra) e as razões  $A_{260}/A_{280}$  e  $A_{260}/A_{230}$  novamente determinadas para avaliação da pureza e determinação da concentração de RNA no material tratado.

Após a precipitação com acetato, a integridade do RNA total foi avaliada por eletroforese. Uma alíquota de RNA total de 300 ng foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1%, tampão de corrida TAE 1X (Tris: Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; EDTA: Sigma, Saint Louis, MO, EUA; ácido acético: Vetec) e corada com 5 µL de gel Green<sup>TM</sup> (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA) (89). O gel foi analisado utilizando o *software* do sistema de fotodocumentação L – Pix HE Image (Loccus Biotecnologia, SP, Brasil) para confirmar a ausência de material genético degradado.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA precipitado com acetato de sódio anidro (3 mol/L e pH 5,2/ 0,1 vol)/ etanol 100% (2,5 vol) a 4 °C, utilizando-se o Kit Improm II Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, EUA). Foram adicionados ao RNA total os Oligos (dT) seguidos da desnaturação a 70 °C durante 5 minutos. Improm-II Transcriptase Reversa foi adicionado e as amostras foram incubadas a 42 °C durante 50 min, seguido de inativação a 70 °C durante 15 minutos. Uma reação de síntese de cDNA sem a enzima transcriptase reversa foi realizada para cada amostra (controle negativo). Uma alíquota dessa reação controle (sem transcriptase reversa) foi submetida a

qPCR para visualizar que não havia contaminações com DNA, empregando-se um sistema de reação já testado e as sequências de oligonucleotídeos foram as já utilizadas por outros pesquisadores descritas em artigos científicos, as quais serão citadas abaixo.

#### **4.5.2. DETERMINAÇÃO DOS BIOMARCADORES MOLECULARES DO ESTADO REDOX, DO ESTADO CORPORAL de FERRO, DO ENVELHECIMENTO E DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA**

As concentrações de mRNA dos genes de interesse, biomarcadores do estado redox, do estado corporal de ferro, do envelhecimento e da resposta inflamatória, proteína 30 marcadora de envelhecimento (SMP30), ferritina de cadeia leve (Ftl), hepcidina (Hamp), fator de transcrição CREBh (Creb3l3), fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nfe2l2), interleucina-1 beta (Il1b) e transportador de metal divalente-1 (Slc11a2) foram determinadas pela amplificação utilizando-se o sistema de reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR) (7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Cingapura), com 2 µL da reação de síntese de cDNA (correspondendo a 0,2 ng de RNA total) em um volume final de 10 µL, 5µL de Fast SyBr Green Master Mix e 0,2 µmol/L (concentração final) de cada primer. Sendo o Fast SyBr® Green Master Mix (Applied Biosystems Foster City, CA, USA) o detector da sequência alvo empregando-se um sistema de reação (desnaturação - *holding stage*: 95 °C por 20 segundos; hibridação - *Cycling stage*: 95 °C por 3 segundos e 60 °C por 30 segundos; estágio da curva de dissociação (*Melt curve*): 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 60 segundos, 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 15 segundos) e as seqüências de oligonucleotídeos descritas por protocolos já testados por outros autores. Todas as reações foram feitas em triplicata, inclusive o controle negativo para cada transcrito. Após a amplificação foi obtida a curva de dissociação do transcrito amplificado para verificar a formação de dímeros de oligonucleotídeos e/ou outros produtos não específicos. Este método foi realizado como descrito no

tutorial “Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR” (Part #: 4371095 Rev B, Applied Biosystems).

A expressão do mRNA dos biomarcadores de envelhecimento, SMP 30, ferritina, hepcidina, CREBh, Nfe2l2, Il1b e Slc11a2, foi quantificada usando a metodologia de qPCR. A seqüência dos primers já descritas por outros autores estão especificadas na Tabela 3. Os primers de Dmt1 podem amplificar elementos responsivos a ferro e elementos não responsivos a ferro das formas de cDNA de Dmt1. A reação da qPCR foi realizada utilizando o 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) por 40 ciclos a 95 °C por 20 segundos, 3 segundos a 60 °C e 20 segundos a 60 °C.

Tabela 3: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na reação de qPCR.

Biomarcador	Gene	Oligonucleotídeos (5' – 3')	Referência
Proteína 30 marcadora de envelhecimento	SMP30	AGGCATCAAAGTGTCTGCTGTTT (Forward)	(90)
		GACTGTCTGAAGTGCCACTGAACT (Reverse)	
Ferritina de cadeia leve	Ftl	CCTACCTCTCTCTGGGCTTCT (Forward)	(20)
		CTTCTCCTCGGCCAATTC (Reverse)	
Hepcidina	Hamp	TGATGCTGAAGCGAAGGA (Forward)	(62)
		TGTGTTGAGAGGTCAGGAC (Reverse)	
CREBh	Creb3l3	TCAGAGCCCTTTACCCAGACAG (Forward)	(22)
		ATGGTTGGGCTTAGGGTTCAG (Reverse)	
Fator nuclear eritróide relacionado ao fator 2	Nfe2l2	GAGACGGCCATGACTGAT (Forward)	(91)
		GTGAGGGGATCGATGAGTAA (Reverse)	
Interleucina-1 $\beta$	Il1b	CACCTCTCAAGCAGAGCACAG (Forward)	(28)
		GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC (Reverse)	
Transportador de metal divalente-1	Slc11a2	CTGATTTACAGTCTGGAGCAG (Forward)	(92)
		CACTTCAGCAAGGTGCAA (Reverse)	
$\beta$ -actina	Actb	GTCGTACCACTGGCATTGTG (Forward)	(92)
		CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA (Reverse)	

A especificidade de amplificação de cada produto amplificado foi verificada utilizando uma curva de dissociação (Melting). A eficiência da amplificação da PCR foi avaliada através da execução das curvas padrão para cada fragmento amplificado em diferentes diluições.

A expressão de todos os genes foi normalizada pela expressão do gene constitutivo  $\beta$ -actina e as reações foram executadas em duplicata. Os ensaios de qPCR foram realizados usando amostras de cDNA diluídas 1:10, 1:100, 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:10000 para determinar a eficiência das reações de amplificação. Uma curva padrão foi representada para cada gene estudado correlacionando o  $\Delta$ CT (CT alvo – CT referência/constitutivo) versus o log da quantidade de cDNA. A eficiência de amplificação foi determinada a partir da inclinação obtida pela curva padrão relacionando  $\log$  [mRNA transcrito] x variação do ciclo *threshold* (TC), através da equação:  $E = (10^{-1/\text{inclinação}} - 1) \times 100$ . Um valor da inclinação menor que 0,1 foi usado como um critério geral para aceitar a validação do experimento. A eficiência da PCR foi entre 91 e 104% para todos os genes. A partir dos dados obtidos previamente determinou-se a diluição de 1:500 do cDNA para trabalhar na análise de qPCR em que a eficiência obtida foi superior a 99%. A análise da curva de dissociação (Melting) foi usada para examinar a especificidade dos produtos gerados para cada conjunto de primers. O método comparativo de CT foi utilizado para quantificar a abundância do mRNA dos gene alvo e é dado por  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (93). Este método foi realizado como descrito no tutorial “Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR” (Part #: 4371095 Rev B, Applied Biosystems).

#### **4.6. ANÁLISE POR IMUNOTRANSFERÊNCIA (WESTERN BLOTTING) DA FERRITINA TECIDUAL**

Para a extração da proteína as amostras de fígados dos ratos foram homogeneizadas em quatro volumes de 0,25 M de sacarose, 15 mM de Tris-HCl (pH 7,9), 15 mM de NaCl, 60 mM de KCl, 5 mM de EDTA, 0,15 mM de espermina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 0,5 mM de espermidina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO,

EUA), 0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 1,0 mM de ditioneitol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), coquetel inibidor de protease 1% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e centrifugadas a 10000 x g por dez minutos. O sobrenadante foi utilizado como um extrato (94). A densidade local da banda de ferritina foi normalizada para a quantidade de proteína, pelo carregamento de quantidade equivalente de 5 µg de proteína em cada poço, para cada extrato de fígado analisado. A concentração de proteína total do padrão ferritina (95) e os homogeneizados de fígado dos animais foram determinados pelo método de Hartree (1972) (96). A banda da proteína ferritina de cadeia leve tem 19 kDa. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE de 15% e 5% (89) e transferidas para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,45 µm (membrana de transferência Immobilon<sup>®</sup>-P - IPVH00010 - Millipore - Billerica MA, EUA). O marcador de peso molecular da ferritina padrão foi utilizado em cada gel e membrana (blot) (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder – Thermo Scientific<sup>®</sup>), dado não apresentado. Após a transferência das proteínas do gel, as membranas foram primeiramente incubadas durante uma hora com tampão de bloqueio (contendo PBS, 0,1% de Tween 20 e leite em pó desnatado 5%) e depois incubadas com anticorpo primário durante uma hora à temperatura ambiente sob agitação mediana em agitador basculante. O anticorpo primário anti-FTL de cabra (SAB2500431 - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizado na concentração de 1:1000 diluído em uma solução contendo PBS, 0,1% de Tween 20 e 5% de leite em pó desnatado. As membranas foram então lavadas três vezes em 0,1% de PBS-T, incubadas durante uma hora à temperatura ambiente sobre agitação em agitador basculante com anticorpo secundário IgG anti-cabra, conjugado para fosfatase alcalina diluído 1:3000 diluído em uma solução contendo PBS, 0,1% de Tween 20 e 10% de leite em pó desnatado (A4187 - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As membranas foram então lavadas três vezes em 0,1% de PBS-T e as bandas foram visualizadas por solução BCIP<sup>®</sup> / NBT (B6404 - Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA).

#### **4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

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, as análises comparativas entre o grupo controle e os demais grupos foram realizadas utilizando-se o teste de amostra independente teste - t para igualdade de médias usando o software SPSS versão 17 (SPSS Inc., Chicago, EUA). Em todos os testes, o valor de  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 5. RESULTADOS

Por meio da pesagem da dieta ofertada diariamente ao final do dia e da sobra no dia posterior pela manhã foi calculado o consumo de dieta de cada rato adulto durante os 78 dias de tratamento, além do consumo de ferro realizado a partir da quantidade de dieta consumida. Sendo também registrado o peso corporal de todos os ratos semanalmente. Esses resultados estão apresentados na Tabela 4. Não houve diferença significativa na ingestão de dieta entre os três grupos de ratos adultos. Como esperado e de acordo com a concentração de ferro da dieta, os ratos do grupo com restrição de ferro mostraram um menor consumo de ferro ( $p < 0,001$ ) e os ratos do grupo com suplementação de ferro apresentaram maior consumo de ferro ( $p < 0,001$ ) comparado com os ratos do grupo controle. Os ratos adultos dos três grupos apresentaram perda de peso ao final do período de tratamento relativo ao início do experimento, no entanto, os ratos tratados com restrição de ferro mostraram maior perda de peso em relação ao grupo controle ( $p = 0,024$ ).

Tabela 4: Consumo de dieta, consumo de ferro, peso corporal inicial e final dos ratos adultos tratados com dieta controle (CT;  $n = 7$ ), dieta com restrição de ferro (ARF;  $n = 5$ ) e enriquecida com ferro (AEF;  $n = 8$ ) durante 78 dias de tratamento. Média e desvio padrão. Diferença entre o grupo controle e os grupos testes: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  (teste t de Student).

Variável	Controle	Restrição de ferro	Enriquecido com ferro
Consumo de Dieta (kg)	1,83 ± 0,04	1,68 ± 0,16	1,79 ± 0,09
Consumo de ferro (mg)	64,22 ± 1,13	16,81 ± 1,60 (***)	627,64 ± 34,29 (***)
Peso Corporal Inicial (g)	526,52 ± 42,45	510,75 ± 79,97	514,62 ± 39,38
Peso Corporal Final (g)	496,91 ± 31,32	446,28 ± 68,89	471,85 ± 48,56
Perda de peso (g)	29,6 ± 22,0	64,5 ± 14,3 (*)	42,8 ± 26,8

Para verificar o estado corporal de ferro e o estado redox no sangue, amostras de sangue dos ratos jovens e adultos, após o tratamento, foram encaminhadas ao Laboratório Sabin® e os resultados estão apresentados na Tabela 5. O grupo jovem apresentou diferença significativa na concentração de hemoglobina ( $p = 0,006$ ) e hematócrito ( $p = 0,001$ ) com níveis mais elevados que o grupo controle. O grupo enriquecido com ferro obteve hematócrito, ferro sérico e gama-glutamil transferase significativamente maior que o grupo controle ( $p = 0,025$ ,

$p = 0,005$  e  $p = 0,019$ , respectivamente) e níveis reduzidos de proteína C reativa ( $p = 0,047$ ). Inesperadamente os níveis de hematócrito foram superiores no grupo com restrição de ferro em relação ao grupo controle ( $p = 0,036$ ) (Tabela 5).

Tabela 5: Parâmetros hematológicos dos ratos jovens ( $n = 6$ ) e dos adultos tratados com dieta controle (CT;  $n = 7$ ), dieta com restrição de ferro (ARF;  $n = 5$ ) e enriquecida com ferro (AEF;  $n = 8$ ). Média e desvio padrão. Diferença entre o grupo controle e os grupos testes: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  (teste t de Student).

	Jovem	Controle	ARF	AEF
Eritrócitos (milhões/mm <sup>3</sup> )	8,82 ± 0,34	8,62 ± 0,48	8,90 ± 0,68	8,75 ± 0,38
Hemoglobina (g/dL)	17,3 ± 0,9 (**)	15,8 ± 0,5	16,5 ± 0,6	16,2 ± 0,8
Hematócrito (%)	51,6 ± 3,2 (***)	45,1 ± 1,0	47,4 ± 1,7 (*)	46,7 ± 1,2 (*)
Ferro Sérico (µg/dL)	242 ± 106	226 ± 34	164 ± 99	346 ± 78 (**)
Saturação de Transferrina (%)	58,9 ± 22,3	63,7 ± 19,8	39,6 ± 23,6	75,2 ± 13,2
Transferrina (mg/dL)	282 ± 22	283 ± 49	294 ± 25	320 ± 32
Proteína C Reativa (mg/dL)	0,33 ± 0,11 (*)	0,48 ± 0,06	0,56 ± 0,12	0,38 ± 0,11 (*)
Gamma glutamil transferase (U/L)	3 ± 2	1 ± 0	1 ± 0	7 ± 5 (*)

Para complementar os parâmetros do estado corporal de ferro, a concentração de ferro tecidual foi determinada no fígado, baço, coração, rim, intestino e músculo esquelético dos ratos jovens e adultos e os resultados expressos em µg de ferro por g de tecido estão como apresentados na Figura 10. Os ratos jovens mostraram uma menor concentração de ferro no fígado, baço, rim e no músculo esquelético ( $p = 0,001$ ;  $p = 0,002$ ;  $p < 0,001$  e  $p < 0,001$ , respectivamente) em relação ao grupo adulto controle. Entre os ratos adultos, o grupo com restrição de ferro apenas mostrou redução na concentração de ferro no músculo esquelético ( $p = 0,001$ ) comparado ao controle e não sendo observada diferença significativa para os demais tecidos. O fígado, baço e intestino ( $p = 0,005$ ;  $p = 0,008$  e  $p = 0,042$ , respectivamente) dos ratos adultos do grupo enriquecido com ferro apresentaram maior concentração de ferro em relação ao grupo controle, enquanto que no músculo esquelético este valor foi menor relativo ao controle ( $p < 0,001$ ) (Figura 10).

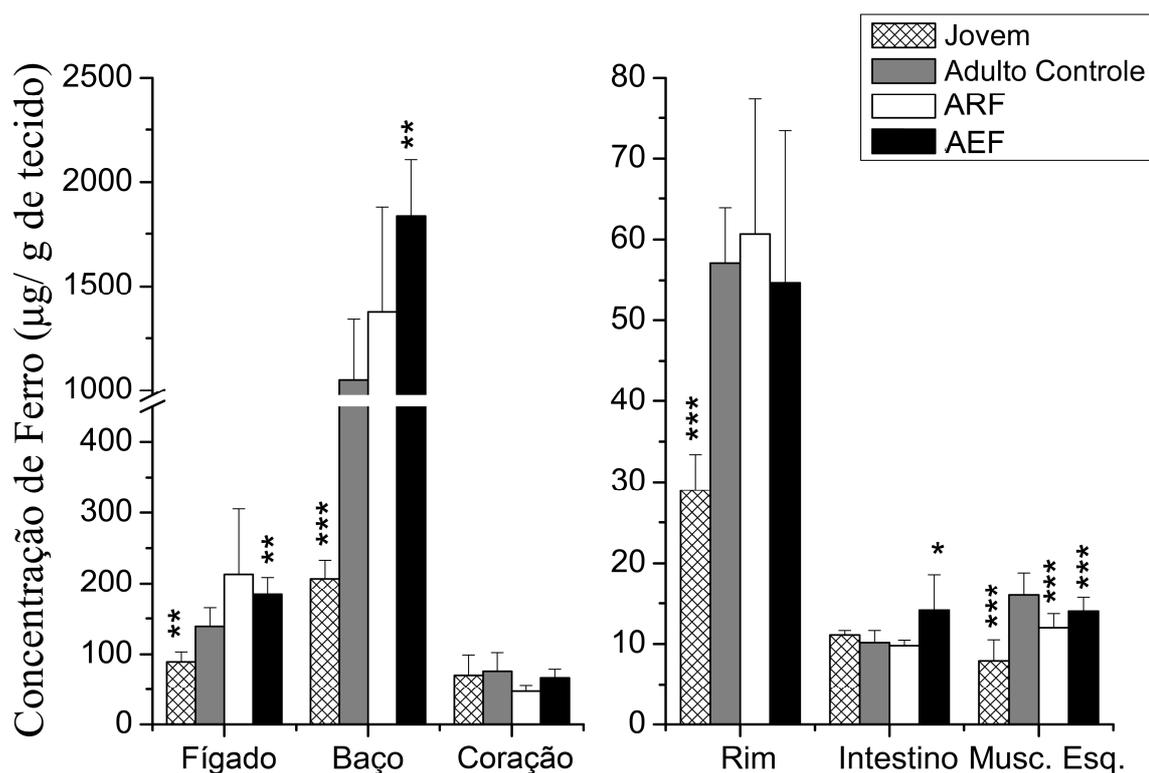


Figura 10: Concentração de ferro nos tecidos dos ratos jovens ( $n = 6$ ) e adultos tratados com dieta controle (CT;  $n = 7$ ), dieta com restrição de ferro (ARF;  $n = 5$ ) e enriquecida com ferro (AEF;  $n = 8$ ) ( $\mu\text{g}$  de Ferro / g de tecido). Média e desvio padrão. Diferença entre o grupo controle e os grupos testes: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  (teste t de Student).

Como marcadores de envelhecimento, estado corporal de ferro, processos inflamatórios e de estado redox dos ratos, o RNA total dos tecidos dos ratos jovens e adultos tratados foi extraído para a análise dos genes envolvidos nos respectivos processos. A Figura 11 apresenta os níveis relativos de transcritos hepáticos da proteína 30 marcadora de envelhecimento (SMP30), ferritina de cadeia leve (Ftl), hepcidina (Hamp), fator de transcrição CREBh (Creb3l3), fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nfe2l2) e interleucina-1 $\beta$  (Il1b) dos ratos normalizados para os valores obtidos para  $\beta$ -actina. Os ratos jovens apresentaram maior nível hepático de mRNA da ferritina de cadeia leve (Ftl) ( $p = 0,007$ ) e níveis reduzidos de hepcidina (Hamp) e interleucina 1 $\beta$  (Il1b) ( $p = 0,008$  e  $p = 0,004$ , respectivamente) em relação aos ratos adultos do grupo controle. Não houve diferença no nível de transcritos de SMP30 e Creb3l3 hepáticos entre o grupo jovem e o grupo adulto controle. Elevados níveis de transcritos hepáticos de Nfe2l2 e Il1b foram obtidos no grupo enriquecido

com ferro relativo aos níveis encontrados no controle ( $p = 0,009$  e  $p = 0,001$ , respectivamente).

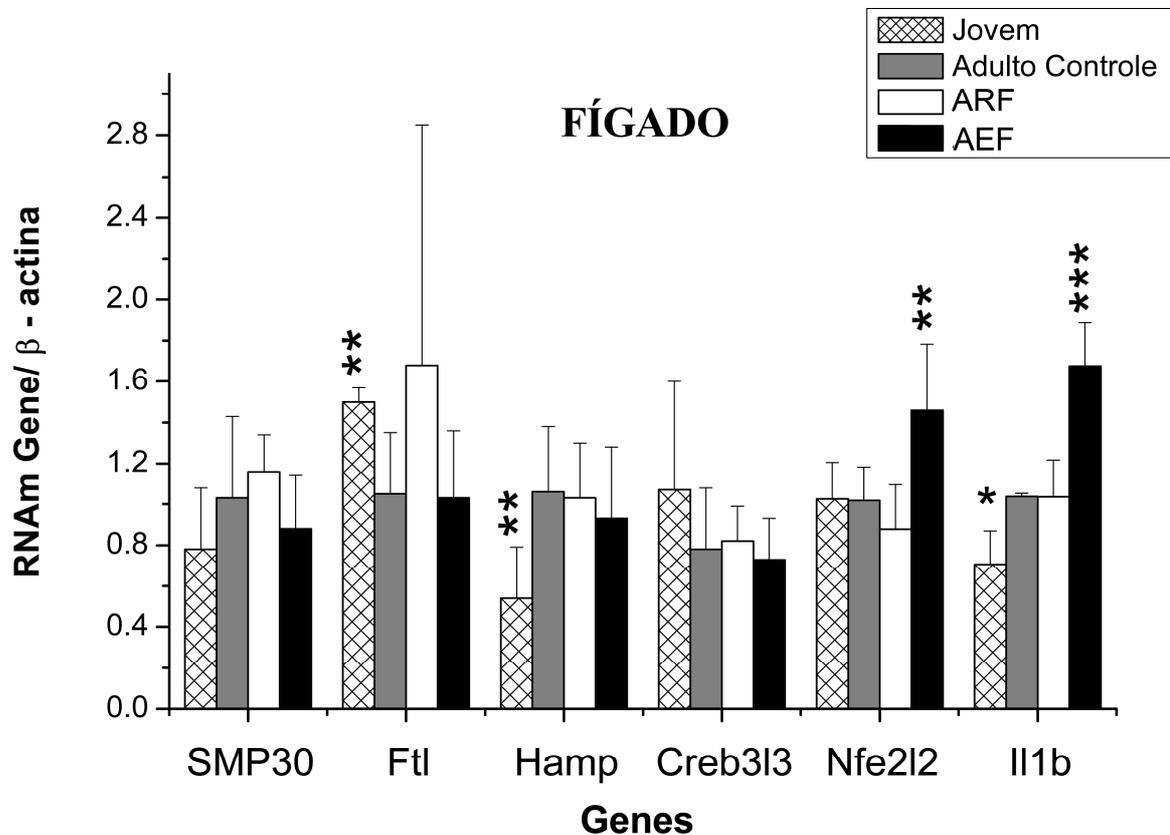


Figura 11: Quantificação do mRNA hepático da proteína 30 marcadora de envelhecimento (SMP30), Ferritina de cadeia leve (Ftl), Hecpidina (Hamp), CREBh (Creb3l3), fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 e da interleucina 1 $\beta$  (Il1b) dos ratos jovens ( $n = 6$ ) e dos ratos adultos tratados com a dieta controle (CT;  $n = 7$ ), dieta com restrição de ferro (ARF;  $n = 5$ ) e enriquecida com ferro (AEF;  $n = 8$ ) (razão mRNA Gene /  $\beta$ -actina - *Fold change*). Média e desvio padrão. Diferença entre o grupo controle e os grupos testes: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  (teste t de Student). As análises de qPCR foram normalizados contra a expressão de mRNA do gene constitutivo (gene  $\beta$ -actina) da mesma amostra de tecido e, em seguida, expresso como razão "teste / controle".

Para complementar as análises dos níveis de transcritos hepáticos, os genes que também possuíam expressão no coração, como a Ftl, no tecido renal, a SMP30 e no intestino, o Dmt1, foram processados a partir da extração do RNA total desses tecidos. Os níveis de mRNA de Ftl e SMP30 foram também analisados no coração e nos rins, respectivamente, e no intestino dos ratos jovens e adultos tratados foram analisados os níveis do mRNA do Dmt1 (Slc11a2) e os valores relativos estão

apresentados na Figura 12. Os grupos com restrição de ferro e jovem apresentaram no coração os níveis de mRNA de Ftl mais elevados que o grupo controle ( $p < 0,001$  e  $0,022$ , respectivamente). Os níveis de mRNA de SMP30 nos rins foram maiores no grupo jovem e marginalmente menor no grupo com restrição de ferro em relação ao grupo controle ( $p = 0,033$  e  $p = 0,060$ , respectivamente). Os ratos tratados com dieta enriquecida com ferro mostraram no intestino elevados níveis de transcritos de Slc11a2 comparados com o controle ( $p < 0,001$ ), no entanto não apresentaram diferença nos níveis de transcritos de Ftl no coração e SMP30 nos rins em relação ao controle (Figura 12).

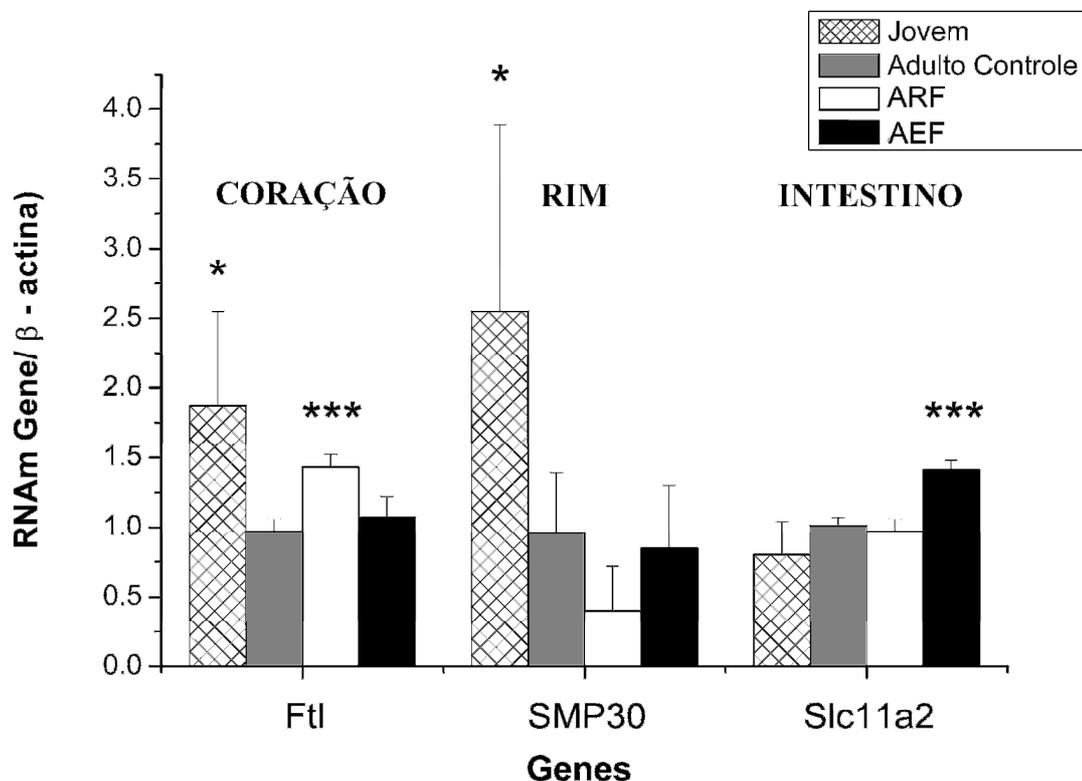


Figura 12: Quantificação do mRNA de Ferritina (Ftl) do tecido cardíaco, SMP30 do tecido renal e Slc11a2 no intestino dos ratos jovens ( $n = 6$ ) e dos ratos adultos tratados com a dieta controle (CT;  $n = 7$ ), dieta com restrição de ferro (ARF;  $n = 5$ ) e enriquecida com ferro (AEF;  $n = 8$ ) (razão mRNA Gene /  $\beta$ -actina - (*Fold change*)). Média e desvio padrão. Diferença entre o grupo controle e os grupos testes: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  (teste t de Student). As análises de qPCR foram normalizados contra a expressão de mRNA do gene constitutivo (gene  $\beta$ -actina) da mesma amostra de tecido e, em seguida, expresso como razão "teste / controle".

Com a finalidade de verificar os níveis da proteína foi realizada análise da ferritina de cadeia leve nos fígados dos ratos jovens e dos ratos adultos pela técnica de *Western blotting*. A Figura 13 apresenta os dados quantificados e a membrana após a transferência da proteína. Em relação aos ratos adultos do grupo controle, a quantidade de ferritina de cadeia leve foi menor no grupo jovem ( $p = 0,046$ ).

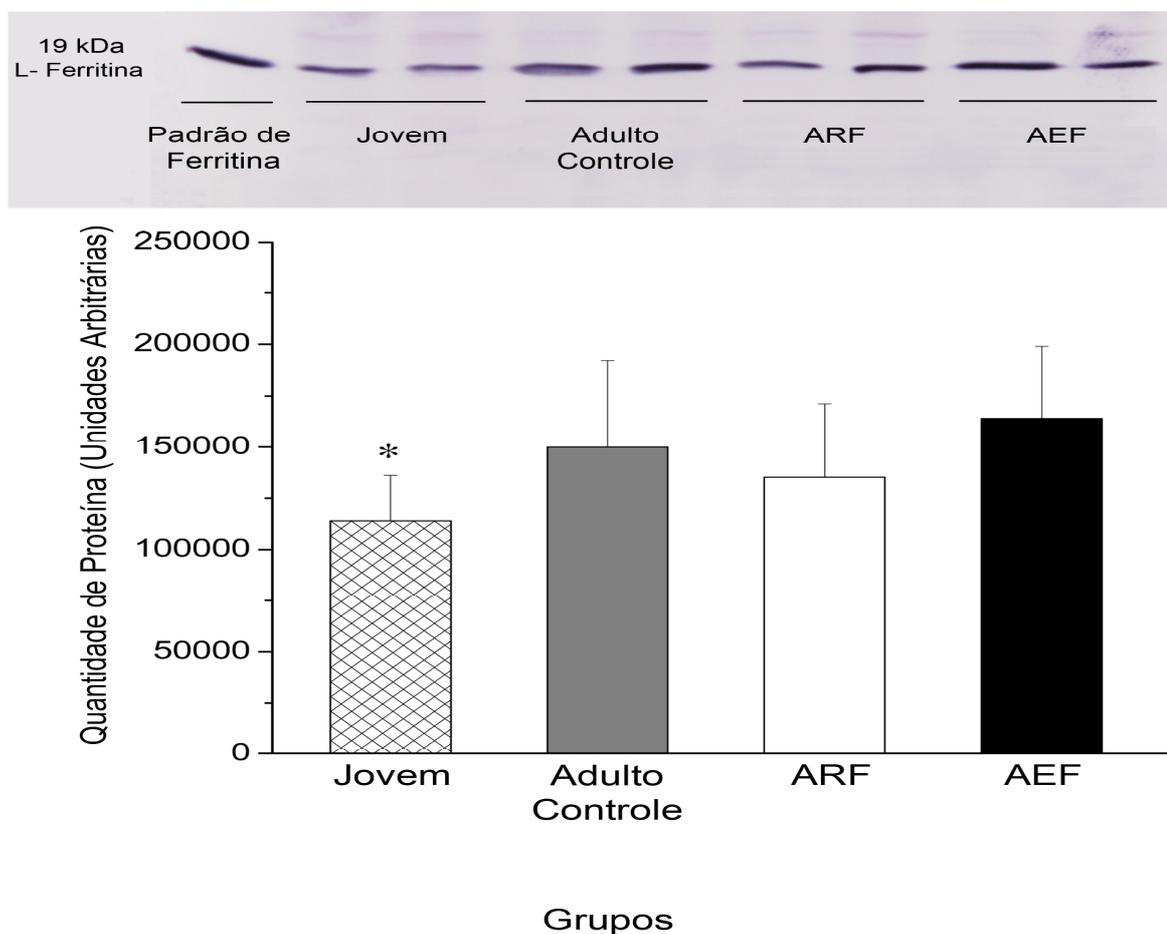


Figura 13: Níveis da proteína ferritina de cadeia leve hepática pela técnica de *Western Blotting* dos ratos jovens ( $n = 6$ ) e dos ratos adultos tratados com dieta controle (CT;  $n = 7$ ), dieta com restrição de ferro (ARF;  $n = 5$ ) e enriquecida com ferro (AEF;  $n = 8$ ). Média e desvio padrão. Diferença entre o grupo controle e os grupos testes: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  (teste t de Student).

## 6. DISCUSSÃO

O estresse oxidativo e o envelhecimento estão relacionados com o declínio nos mecanismos de reparo de dano oxidativo molecular, que pode causar disfunção celular, comprometendo a função do órgão e, conseqüentemente, a expectativa de vida do organismo (13). O ferro livre no corpo gera estresse oxidativo e, por isso, um excesso de ferro no organismo pode acelerar o processo de envelhecimento (13, 39). Para testar esta hipótese, no presente estudo, ratos *Wistar* adultos (15 meses de idade) foram tratados com dietas contendo níveis adequados de ferro (grupo controle adulto), níveis com restrição de ferro (grupo ARF) e enriquecidas com ferro (grupo AEF) para verificar os efeitos do teor de ferro da dieta sobre o *status* de ferro, estresse oxidativo e em genes marcadores de envelhecimento em tecidos de ratos. Ratos *Wistar* de dois meses constituíram um grupo jovem para comparação com os dados obtidos a partir de ratos adultos.

O acúmulo de ferro nos tecido de animais e seres humanos senescentes pode ser resultado de um aumento nos processos inflamatórios, durante o envelhecimento (12, 17-18, 42, 84). Efetivamente, as citocinas IL1 $\beta$  e IL6 induzem a síntese hepática de hepcidina (10), um hormônio antimicrobiano, o qual, uma vez secretado na corrente sanguínea (55, 61), reduz a absorção intestinal de ferro e impede a exportação de ferro a partir de macrófagos do baço para a corrente sanguínea (8, 10). Assim, níveis elevados de hepcidina diminuem a mobilização de ferro no corpo, levando ao acúmulo de ferro nos tecidos, tais como o baço e fígado (62, 75). A identificação de uma sobrecarga de ferro nos tecidos de pacientes com doenças crônicas, tais como a insuficiência renal, ou as doenças relacionadas à idade, tais como Parkinson e Alzheimer (36), suporta a hipótese de que o excesso de ferro no organismo possa estar envolvido na etiologia de patologia do processo de envelhecimento. Além disso, a reduzida mobilização de ferro, imposta pelos altos níveis do hormônio hepcidina, prejudica vários processos fisiológicos que são dependentes de ferro, tais como a eritropoiese (61), o que deve levar a anemia, observada nos indivíduos idosos.

No presente estudo, ratos com 15 meses de idade foram considerados ratos adultos, enquanto que os ratos de 2 meses de idade foram considerados jovens. No entanto, a perda de peso observada durante os 78 dias de tratamento, bem como as reduções nos valores das concentrações de hemoglobina e de hematócrito

encontrados nos animais adultos (15 meses) do grupo controle em comparação com ratos jovens, são características da fase senil do primeiro grupo (Tabela 4 e 5) de acordo com os resultados relatados por Arvapalli *et al.* (2010) (17).

Os ratos adultos do grupo controle apresentaram valores mais elevados de proteína C reativa sérica (PCR) (Tabela 5) e níveis mais elevados de transcritos de hepcidina (Figura 11) associados com o aumento de ferro no fígado, baço, rim e no músculo esquelético (Figura 10). Em relação aos ratos jovens, os ratos controle adulto, também, apresentaram uma diminuição dos níveis de hemoglobina e hematócrito (Tabela 5). Além disso, os ratos adultos apresentaram maiores níveis de interleucina 1- $\beta$  (Il1b) (Figura 11), uma citocina pró-inflamatória que também regula a síntese da hepcidina hepática (97). Uma ativação do sistema imune inato e a presença de baixo grau de inflamação é uma característica comum do processo de envelhecimento (85). Vistos em conjunto, estes resultados corroboram com a hipótese de que a indução da transcrição de hepcidina possa ser responsável pela redução da mobilização do ferro em ratos adultos, o que resulta na acumulação de ferro nos tecidos de armazenamento, por conseguinte, uma redução da eritropoiese.

De acordo com a hipótese de que o estresse oxidativo está associado com o processo de envelhecimento (37), no presente estudo os ratos jovens apresentaram níveis reduzidos de dano oxidativos aos lipídios no fígado, baço e coração em comparação com os ratos adultos do grupo controle (98-99). Os níveis mais elevados de danos oxidativos a proteínas encontrados no coração e a lipídios no músculo esquelético dos ratos jovens (Figura A1 (Anexo); (98-99)), aparentemente, contrários à hipótese de Harman, podem ser explicados pelas elevadas atividades metabólicas e físicas dos ratos jovens em comparação com os ratos adultos.

A redução nas atividades específicas das enzimas antioxidantes CAT, GR e GPx e da enzima Nox observada em alguns tecidos dos ratos jovens em comparação com ratos adultos controle (Figura A2 (Anexo); (98-99)) reforçam a hipótese de Harman e está de acordo com os achados na literatura. Pesquisadores observaram um aumento na atividade da GPx no fígado de camundongos machos idosos (100). Alguns autores demonstraram um aumento da atividade da CAT e da GPx durante os primeiros 18 meses de vida em ratos e camundongos, mas esses valores diminuíram significativamente aos 24 meses de idade (100-101). A Figura A2 apresenta resultados similares aos já relatados na literatura relativos aos níveis

reduzidos de Nox em baços de ratos jovens. De maneira geral, estes resultados sugerem que os níveis das atividades específicas de enzimas antioxidantes tendem a aumentar com a idade (102-104).

O papel do ferro dietético no processo de envelhecimento não está totalmente explorado. Os efeitos deletérios do ferro dietético não parecem ser devido à ingestão de ferro elevada, mas sim pelo armazenamento, mobilização ou metabolismo celular anormal de ferro (60). Surpreendentemente, os ratos adultos submetidos a dieta com restrição de ferro (ARF), após 12 semanas de tratamento mostraram uma redução significativa na concentração de ferro apenas no músculo esquelético em comparação com o grupo de controle. Este resultado sugere que o ferro que se acumula nos tecidos com a idade pode ser encontrado predominantemente no complexo hemossiderina em uma forma inativa ferro-redox (13), o que protege os tecidos contra o estresse oxidativo induzido por ferro (105). No entanto, esta forma de ferro não é biodisponível para as funções fisiológicas. Se assim for, espera-se que uma redução crônica de ferro dietético induza anemia em ratos. Os ratos ARF não apresentaram anemia, pelo contrário, em vez disso, apresentaram maiores níveis de hematócrito comparados ao grupo controle. Estes resultados podem ser devido ao efeito de hemoconcentração, pois estes animais perderam mais peso em comparação com os ratos controle.

Embora a redução na concentração de ferro tenha sido observada apenas no músculo esquelético, o consumo de uma dieta restrita em ferro contribuiu para a redução significativa de danos oxidativos a lipídios (MDA) no fígado, rim, coração e intestino, e uma redução nos níveis de carbonil nos fígados de ratos ARF (Figura A1 (Anexo); (98-99)). Um resultado similar foi obtido em um estudo recente realizado em ratos jovens, em que foi observado que a restrição dietética de ferro reduziu a produção de superóxido e de peróxido de lipídios no fígado, pâncreas e plasma (106). Assim, exceto para o aumento do dano oxidativo a lipídios e a proteínas observado no baço e músculo, respectivamente, os dados obtidos a partir de outros órgãos dos ratos tratados com a dieta com restrição de ferro se correlaciona com as evidências da literatura e corroboram com a tese de que a privação de ferro ou a terapia com quelantes de ferro na dieta possam ser eficazes no tratamento ou na prevenção do estresse oxidativo e, assim, retardar o processo de envelhecimento (18). No entanto, deve-se considerar que o ferro acumulado nos tecidos dos idosos pode ser predominantemente armazenado em complexos de hemossiderina e,

portanto, indisponíveis para atender às demandas fisiológicas. Uma redução marginal foi observada nos valores de saturação de transferrina dos ratos ARF em relação aos ratos controle ( $p = 0,084$ ), sugerindo uma redução da mobilização de ferro nestes ratos. Assim, tanto a restrição de ferro e o uso de agentes quelantes podem reduzir a quantidade de ferro biodisponível, o que poderia prejudicar a vários processos celulares e as funções dos tecidos. Os reduzidos níveis de ferro associados com maior perda de peso corporal (Figura 10, Tabela 4) e o aumento do dano oxidativo as proteínas (Figuras 10 e A1 e Tabela 4) observados no músculo esquelético de ratos ARF sugerem uma perda mais pronunciada de músculo, a maioria, provavelmente, devido à depleção de ferro biodisponível nesses animais.

Em contrapartida, os valores elevados de hematócrito, ferro sérico e a concentração de ferro no fígado, baço e intestino (Tabela 5 e Figura 10) encontrado no grupo adulto enriquecido com ferro, indicam um aumento da absorção de ferro dietético não-heme nestes ratos. Apesar do fino mecanismo molecular de regulação da absorção de ferro do intestino, que é sincronizado com as demandas fisiológicas (8), esses resultados, em associação com o aumento do estresse oxidativo (Figura A1 (Anexo); (98-99)), tal como evidenciado pelo aumento dos níveis séricos de gama-glutamil transferase (Tabela 5), de MDA no baço e intestino (Figura A1 (Anexo); (98-99)) e carbonil no coração, fígado e do músculo esquelético (Figura A1) sugerem que a suplementação de ferro na dieta leva à sobrecarga de ferro nos tecidos e também aumenta o estresse oxidativo nos tecidos (8). Os níveis de ferritina nos tecidos de fato aumentam durante o processo de envelhecimento (68, 105). Este dado é coerente como papel da ferritina no organismo. Nos mamíferos, a maior parte do ferro não- heme está ligada a ferritina, cuja função, já mencionada neste manuscrito, é a de reduzir o *pool* de ferro intracelular lábil, deve minimizar a produção de EROS (21) e, por conseguinte, proteger os componentes celulares contra danos oxidativos com a idade (11, 47, 68, 105).

Tal como esperado, os resultados de *Western blot* mostraram que os ratos jovens tinham menores níveis hepáticos de proteína L-ferritina (Figura 13). Porém, contrariando as expectativas, os níveis de mRNA de L-ferritina (Ftl) no fígado e coração dos ratos jovens foram significativamente mais elevados em comparação com os ratos adultos do grupo controle (Figura 11 e 12). Um resultado semelhante foi observado nos fígados dos ratos jovens (2 meses) em comparação com ratos

idosos (24 meses) em um estudo de Bulvik et al. (2012) (105). Estes resultados sugerem que, além do papel fundamental da ferritina na redução de ferro lábil intracelular, a molécula de mRNA de L-ferritina é também estabilizada pelo sistema IRP / IRE em baixas concentrações de ferro intracelulares. Especificamente, embora as células com baixo teor de ferro não sintetizem a proteína L-ferritina, devido à ligação da IRP aos IREs 5', as moléculas de mRNA de L-ferritina devem ser mantidas intracelularmente para permitir a tradução imediata da ferritina quando necessário. Esta estratégia poderia rapidamente prevenir aumentos do estresse oxidativo celular quando as células fossem expostas a elevadas concentrações de ferro. O aumento dos níveis de mRNA da Ftl no coração dos ratos adultos com restrição de ferro (Figura 12) corroboram com essa tese.

Em animais superiores, com a idade, os níveis hepáticos da proteína SMP30 reduzem (21, 78, 80, 82). Devido a este fato, a SMP30, proteína predominantemente sintetizada pelo fígado e rins, que apresenta uma sequência de aminoácidos altamente conservada entre as diferentes espécies de animais, incluindo seres humanos, tem sido considerada marcadora de envelhecimento (82). Em acordo com a literatura, os ratos jovens mostraram níveis mais elevados de transcritos de SMP30 no rim em comparação com ratos adultos controle. É interessante notar o resultado que foi observado nos rins de ratos tratados com a dieta restrita de ferro, que, apesar da redução nos danos oxidativos em lipídios, mostrou uma redução marginal ( $p = 0,060$ ) nos níveis de SMP30 em comparação ratos controle.

O estresse oxidativo é regulado pelo fator de transcrição nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nfe2l2) em vários tipos de células e tecidos, incluindo o fígado (24-25). No presente estudo, embora não tenha sido verificadas alterações nos níveis de mRNAs de Creb3l3 hepático e Nfe2l2, os ratos jovens apresentaram menor estresse oxidativo hepático e também menor PCR no soro e níveis hepáticos de mRNAs de Hamp em comparação com ratos adultos.

Com relação aos ratos adultos, o aumento obtido em relação ao fator de transcrição nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nfe2l2) no fígado de ratos enriquecidos com ferro associado com os altos níveis de ferro hepático reforça as conclusões anteriores de que elevados níveis de ferro hepático induzem o estresse oxidativo (25) uma vez que estes animais apresentaram níveis elevados de

transcritos de Nfe2l2 e de concentração de ferro maior em relação ao grupo controle (Figura 11). Em contrapartida, os elevados níveis hepáticos de mRNA de Il1b, utilizado neste estudo como marcador de processo inflamatório, também encontrado nos ratos tratados com dieta enriquecida com ferro sugerem uma intensificação do processo inflamatório. Estes resultados suportam o papel do estresse oxidativo hepático na resposta imune de fase aguda e no metabolismo de ferro, e também indicam uma ligação entre o envelhecimento, estresse oxidativo e os processos inflamatórios. O resultado aparentemente contraditório encontrado nos ratos tratados com dieta enriquecida com ferro, que mostraram redução nos níveis de PCR em relação aos ratos controle ( $p = 0,047$ ), pode, na verdade, refletir uma disfunção do fígado, em consequência do aumento do estresse oxidativo, tal como evidenciado pelo aumento de proteína carbonilada no fígado destes ratos (Figura A1B).

No que diz respeito à regulação sistêmica de ferro, como esperado os ratos jovens apresentaram menores níveis de mRNA de Hamp em relação ao grupo controle, porém não houve diferença significativa entre os três grupos de adultos. Esta descoberta deve estar relacionada à resposta fisiológica saturável da hepcidina, recentemente postulado por Daba et al. (2013) (107). A elevada concentração de ferro encontrada nos ratos adultos pode ser maior do que a resposta de saturação da hepcidina. Assim, a hepcidina não mais responde às variações da concentração de ferro sérico e hepático, o que resulta na perda da manutenção da homeostase do ferro sistêmica. A resposta saturável da hepcidina pode explicar as alterações no ferro tecidual e no estado oxidativo dos ratos adultos, proporcional à quantidade de ferro nas dietas. Considerando pesquisas recentes, onde a hepcidina inibe a expressão de Dmt1 (108), os níveis de transcritos deste (Dmt1/Slc11a2) foram também analisados no intestino dos ratos (Figura 12). Surpreendentemente, embora o nível de mRNA de hepcidina não tenha alterado entre os grupos dos ratos adultos, os ratos com dieta enriquecida com ferro apresentaram maiores níveis de transcritos de Slc11a2 (Dmt1) em relação ao grupo controle. Este resultado sugere outro mecanismo regulatório sistêmico da absorção de ferro hepcidina-independente. Um estudo recente mostrou que a citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  induziu a expressão do transportador de metal divalente-1 (Dmt1) (71). No presente estudo, os ratos suplementados também apresentaram níveis

elevados de mRNA de Il1b. Considerando esses resultados, é possível que os níveis elevados de Slc11a2 (Dmt1) estejam relacionados ao processo inflamatório.

Em conclusão, argumenta-se que qualquer processo metabólico que pode contribuir para a acumulação de modificações deletérias dos componentes celulares ao longo do tempo pode, eventualmente, limitar a vida. No entanto, radicais livres gerados pelo metabolismo normal do oxigênio em combinação com a presença de níveis aumentados de ferro lábil representam os principais contribuidores para a formação de materiais oxidados no interior das células. Esta acumulação, em última análise leva à desorganização estrutural e declínio funcional da célula quando característico do processo de envelhecimento.

O envelhecimento é um processo multifatorial, mas há indícios que implicam a geração de EROs e a resposta ao estresse oxidativo como fatores chave na determinação da longevidade. A identificação que a longevidade pode ser influenciada por genes fortalece a ligação mecânica entre oxidantes, estresse e envelhecimento. Muitas questões permanecem, incluindo a forma como esses vários genes associados à longevidade funcionam e influenciam na resistência ao estresse e envelhecimento.

O aumento da expectativa de vida é um indicador positivo de saúde pública e reflete uma melhoria do sistema de saúde tanto nacional quanto global. No entanto o desafio é paradoxal, pois a carga econômico-social gerada pela melhoria da expectativa de vida é uma questão crítica. As pessoas mais velhas deixam de contribuir para a produtividade nacional e passam a ter direito ao financiamento estatal de apoio e saúde.

O sucesso no aumento da longevidade deve-se principalmente aos avanços técnico-científico ocorrido na medicina moderna capaz de curar doenças infecciosas que historicamente causavam mortes prematuras. Há alteração no perfil das doenças que agora se concentra nas crônicas, degenerativas e não transmissíveis tais como: hipertensão, artrite, câncer, Alzheimer, doenças coronárias e vasculares.

Os governos, bem como organizações que objetivam oferecer qualidade de vida aos idosos devem trabalhar juntos em parcerias planejadas que garantam aumento do perfil da política de saúde para o envelhecimento.

## 7. CONCLUSÃO

Apesar dos mecanismos moleculares para a regulação da absorção de ferro, o consumo crônico de uma dieta com alto teor de ferro resultou no aumento da concentração de ferro no fígado, baço e intestino, e também no aumento do estresse oxidativo na maioria dos tecidos estudados, além da redução na atividade de algumas enzimas antioxidantes.

A restrição dietética de ferro protegeu o fígado, o coração, rim e o intestino dos danos oxidativos a lipídios e proteínas e ainda, resultou no aumento da atividade da GPx no baço.

A restrição de ferro também causou maior perda de peso, aumento do estresse oxidativo no músculo e no baço e resultou em alta atividade de Nox no fígado de ratos adultos.

A restrição de ferro parece retardar o envelhecimento, ao reduzir os danos oxidativos aos tecidos. No entanto, a restrição de ferro parece também prejudicar processos fisiológicos e vitais.

Considerando as limitações do modelo animal utilizado neste estudo, o tratamento de pacientes idosos com quelantes de ferro pode reduzir o estresse oxidativo em alguns tecidos. Porém, devem-se considerar possíveis disfunções celulares, devido à depleção de ferro biodisponível.

A suplementação com ferro pode acelerar os processos de envelhecimento, devido ao aumento dos danos oxidativos a tecidos, provavelmente, decorrente do aumento de ferro livre.

O organismo adulto parece ser mais vulnerável a alterações nas concentrações de ferro da dieta alimentar que os jovens, posto que perdem a sua capacidade para controlar a absorção de ferro pela modulação dos níveis de hepcidina.

Finalizando, as políticas públicas que adotaram a fortificação mandatória com ferro em alimentos amplamente consumidos pela população, associadas à

suplementação generalizada dos alimentos comercializados nos países, podem resultar na sobrecarga de ferro no organismo e no aumento do estresse oxidativo e, conseqüentemente, no aumento dos danos oxidativos celulares, o que poderá comprometer a qualidade e a esperança de vida, principalmente das populações idosas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000 Nov 9;408(6809):239-47.
2. Galaris D, Mantzaris M, Amorgianiotis C. Oxidative stress and aging: the potential role of iron. *Hormones (Athens)*. 2008 Apr-Jun;7(2):114-22.
3. Oliveira BF, Nogueira-Machado JA, Chaves MM. The role of oxidative stress in the aging process. *ScientificWorldJournal*. 2010;10:1121-8.
4. Beard JL, Dawson H, Pinero DJ. Iron metabolism: a comprehensive review. *Nutr Rev*. 1996 Oct;54(10):295-317.
5. Munoz M, Garcia-Erce JA, Remacha AF. Disorders of iron metabolism. Part 1: molecular basis of iron homeostasis. *J Clin Pathol*. 2011 Apr;64(4):281-6.
6. Bou-Abdallah F. The iron redox and hydrolysis chemistry of the ferritins. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Aug;1800(8):719-31.
7. Xu J, Hwang JC, Lees HA, Wohlgemuth SE, Knutson MD, Judge AR, et al. Long-term perturbation of muscle iron homeostasis following hindlimb suspension in old rats is associated with high levels of oxidative stress and impaired recovery from atrophy. *Exp Gerontol*. 2012 Jan;47(1):100-8.
8. Anderson GJ, Frazer DM, McLaren GD. Iron absorption and metabolism. *Curr Opin Gastroenterol*. 2009 Mar;25(2):129-35.
9. Dunn LL, Suryo Rahmanto Y, Richardson DR. Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends Cell Biol*. 2007 Feb;17(2):93-100.
10. Evstatiev R, Gasche C. Iron sensing and signalling. *Gut*. 2012 Jun;61(6):933-52.
11. Wang J, Pantopoulos K. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem J*. 2011 Mar 15;434(3):365-81.
12. Chen H, Attieh ZK, Gao H, Huang G, Su T, Ke W, et al. Age-related changes in iron homeostasis in mouse ferroxidase mutants. *Biomaterials*. 2009 Oct;22(5):827-34.
13. Killilea DW, Atamna H, Liao C, Ames BN. Iron accumulation during cellular senescence in human fibroblasts in vitro. *Antioxid Redox Signal*. 2003 Oct;5(5):507-16.
14. Droge W, Schipper HM. Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. *Aging Cell*. 2007 Jun;6(3):361-70.
15. Hofer T, Marzetti E, Xu J, Seo AY, Gulec S, Knutson MD, et al. Increased iron content and RNA oxidative damage in skeletal muscle with aging and disuse atrophy. *Exp Gerontol*. 2008 Jun;43(6):563-70.
16. Xu J, Marzetti E, Seo AY, Kim JS, Prolla TA, Leeuwenburgh C. The emerging role of iron dyshomeostasis in the mitochondrial decay of aging. *Mech Ageing Dev*. 2010 Jul-Aug;131(7-8):487-93.
17. Arvapalli RK, Paturi S, Laurino JP, Katta A, Kakarla SK, Gadde MK, et al. Deferasirox decreases age-associated iron accumulation in the aging F344XBN rat heart and liver. *Cardiovasc Toxicol*. 2010 Jun;10(2):108-16.
18. Polla AS, Polla LL, Polla BS. Iron as the malignant spirit in successful ageing. *Ageing Res Rev*. 2003 Jan;2(1):25-37.
19. Siqueira EMM, S.G.; Arruda, S.F. Papel Adverso do Ferro no Organismo. *Comun Ciênc Saúde*. 2006;17(3):229-36.
20. Bulvik B, Grinberg L, Eliashar R, Berenshtein E, Chevion MM. Iron, ferritin and proteins of the methionine-centered redox cycle in young and old rat hearts. *Mech Ageing Dev*. 2009 Mar;130(3):139-44.
21. Jung KJ, Ishigami A, Maruyama N, Takahashi R, Goto S, Yu BP, et al. Modulation of gene expression of SMP-30 by LPS and calorie restriction during aging process. *Exp Gerontol*. 2004 Aug;39(8):1169-77.

22. Gentile CL, Wang D, Pfaffenbach KT, Cox R, Wei Y, Pagliassotti MJ. Fatty acids regulate CREBh via transcriptional mechanisms that are dependent on proteasome activity and insulin. *Mol Cell Biochem.* 2010 Nov;344(1-2):99-107.
23. Gounder SS, Kannan S, Devadoss D, Miller CJ, Whitehead KS, Odelberg SJ, et al. Impaired transcriptional activity of Nrf2 in age-related myocardial oxidative stress is reversible by moderate exercise training. *PLoS One.* 2012;7(9):e45697.
24. Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2013 Jan 6;53:401-26.
25. Moon MS, McDevitt EI, Zhu J, Stanley B, Krzeminski J, Amin S, et al. Elevated hepatic iron activates NF-E2-related factor 2-regulated pathway in a dietary iron overload mouse model. *Toxicol Sci.* 2012 Sep;129(1):74-85.
26. Vecchi C, Montosi G, Zhang K, Lamberti I, Duncan SA, Kaufman RJ, et al. ER stress controls iron metabolism through induction of hepcidin. *Science.* 2009 Aug 14;325(5942):877-80.
27. Garrick MD, Zhao L, Roth JA, Jiang H, Feng J, Foot NJ, et al. Isoform specific regulation of divalent metal (ion) transporter (DMT1) by proteasomal degradation. *Biometals.* 2012 Aug;25(4):787-93.
28. Peinnequin A, Mouret C, Birot O, Alonso A, Mathieu J, Clarencon D, et al. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunol.* 2004 Feb 5;5:3.
29. Felix JS. *Economia da Longevidade: uma revisão da bibliografia brasileira sobre o envelhecimento populacional.* PUC-SP. 2007.
30. Berquó E. Algumas considerações demográficas sobre o envelhecimento da população do Brasil. . *Anais do I Seminário Internacional Envelhecimento Populacional: uma agenda para o final do século; Brasília: Ministério da Previdência e Assistência Social - MPAS; 1996. p. 16-34.*
31. Rasmussen LJ, Sander M, Wewer UM, Bohr VA. Aging, longevity and health. *Mech Ageing Dev.* 2011 Oct;132(10):522-32.
32. Wong LLRC, J. A. The rapid process of aging in Brazil: serious challenges for public policies *Rev Bras Estud Popul.* 2006;23(1):5 - 26.
33. International FdPdNUeH. *Envelhecimento no século XXI: Celebração e Desafio.* Nova York2012. p. 1 - 7.
34. Salomon JA, Wang H, Freeman MK, Vos T, Flaxman AD, Lopez AD, et al. Healthy life expectancy for 187 countries, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden Disease Study 2010. *Lancet.* 2012 Dec 15;380(9859):2144-62.
35. Gemma C, Vila J, Bachstetter A, Bickford PC. *Oxidative Stress and the Aging Brain: From Theory to Prevention.* 2007.
36. Xu J, Knutson MD, Carter CS, Leeuwenburgh C. Iron accumulation with age, oxidative stress and functional decline. *PLoS One.* 2008;3(8):e2865.
37. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956 Jul;11(3):298-300.
38. Kumar H, Lim HW, More SV, Kim BW, Koppula S, Kim IS, et al. The role of free radicals in the aging brain and Parkinson's disease: convergence and parallelism. *Int J Mol Sci.* 2012;13(8):10478-504.
39. Bokov A, Chaudhuri A, Richardson A. The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech Ageing Dev.* 2004 Oct-Nov;125(10-11):811-26.
40. Ramos GR, Alves, A.L.H., Hermes-Lima M. *Radicais Livres, antioxidantes e a adaptabilidade animal.* Rio de Janeiro: Relume Dumará; 2000.
41. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science.* 1996 Jul 5;273(5271):59-63.
42. Hahn P, Song Y, Ying GS, He X, Beard J, Dunaief JL. Age-dependent and gender-specific changes in mouse tissue iron by strain. *Exp Gerontol.* 2009 Sep;44(9):594-600.
43. Polla BS. Therapy by taking away: the case of iron. *Biochem Pharmacol.* 1999 Jun 15;57(12):1345-9.

44. Labunskyy VM, Gladyshev VN. Role of Reactive Oxygen Species-Mediated Signaling in Aging. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Sep 20.
45. Jacob KD, Hooten NN, Trzeciak AR, Evans MK. Markers of Oxidant Stress that are Clinically Relevant in Aging and Age-related Disease. *Mech Ageing Dev*. 2013 Feb 18.
46. Vina J, Gambini J, Lopez-Grueso R, Abdelaziz KM, Jove M, Borras C. Females live longer than males: role of oxidative stress. *Curr Pharm Des*. 2011 Dec 1;17(36):3959-65.
47. Kurz T, Eaton JW, Brunk UT. The role of lysosomes in iron metabolism and recycling. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011 Dec;43(12):1686-97.
48. Ganz T, Nemeth E. Heparin and disorders of iron metabolism. *Annu Rev Med*. 2011;62:347-60.
49. Dornelles AS, Garcia VA, de Lima MN, Vedana G, Alcalde LA, Bogo MR, et al. mRNA expression of proteins involved in iron homeostasis in brain regions is altered by age and by iron overloading in the neonatal period. *Neurochem Res*. 2010 Apr;35(4):564-71.
50. Reardon TF, Allen DG. Iron injections in mice increase skeletal muscle iron content, induce oxidative stress and reduce exercise performance. *Exp Physiol*. 2009 Jun;94(6):720-30.
51. Nemeth E, Ganz T. Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annu Rev Nutr*. 2006;26:323-42.
52. Grotto HZW. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase Iron metabolism: an overview on the main mechanisms involved in its homeostasis. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2008;30(5):390-7.
53. Johnstone D, Milward EA. Genome-wide microarray analysis of brain gene expression in mice on a short-term high iron diet. *Neurochem Int*. 2010 May-Jun;56(6-7):856-63.
54. Pantopoulos K, Porwal SK, Tartakoff A, Devireddy L. Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry*. 2012 Jul 24;51(29):5705-24.
55. Pietrangelo A. Heparin in human iron disorders: therapeutic implications. *J Hepatol*. 2011 Jan;54(1):173-81.
56. Ganz T, Nemeth E. Heparin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Sep;1823(9):1434-43.
57. Munoz M, Villar I, Garcia-Erce JA. An update on iron physiology. *World J Gastroenterol*. 2009 Oct 7;15(37):4617-26.
58. Brissot P, Ropert M, Le Lan C, Loreal O. Non-transferrin bound iron: a key role in iron overload and iron toxicity. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Mar;1820(3):403-10.
59. Jomova K, Valko M. Importance of Iron Chelation in Free Radical-Induced Oxidative Stress and Human Disease. *Curr Pharm Des*. 2011 Sep 9.
60. Levenson CW, Tassabehji NM. Iron and ageing: an introduction to iron regulatory mechanisms. *Ageing Res Rev*. 2004 Jul;3(3):251-63.
61. Collins JF, Wessling-Resnick M, Knutson MD. Heparin regulation of iron transport. *J Nutr*. 2008 Nov;138(11):2284-8.
62. Christiansen H, Sheikh N, Saile B, Reuter F, Rave-Frank M, Hermann RM, et al. x-Irradiation in rat liver: consequent upregulation of hepcidin and downregulation of hemojuvelin and ferroportin-1 gene expression. *Radiology*. 2007 Jan;242(1):189-97.
63. Gkouvatsos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Mar;1820(3):188-202.
64. Daba A, Gkouvatsos K, Sebastiani G, Pantopoulos K. Differences in activation of mouse hepcidin by dietary iron and parenterally administered iron dextran: compartmentalization is critical for iron sensing. *J Mol Med (Berl)*. 2012 Jul 31.
65. Bulvik BE, Berenshtein E, Konijn AM, Grinberg L, Vinokur V, Eliashar R, et al. Aging is an organ-specific process: changes in homeostasis of iron and redox proteins in the rat. *Age (Dordr)*. 2011 Jun 4.
66. Watt RK. The many faces of the octahedral ferritin protein. *Biometals*. 2011 Jun;24(3):489-500.

67. MacKenzie EL, Iwasaki K, Tsuji Y. Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Jun;10(6):997-1030.
68. Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P. Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jul;1790(7):589-99.
69. Grotto HZW. Iron physiology and metabolism. *Rev Bras Hematol Hemoter*. [Review]. 2010;32(Supl. 2):8- 17.
70. Weiss G. Modification of iron regulation by the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2005 Jun;18(2):183-201.
71. Hansen JB, Tonnesen MF, Madsen AN, Hagedorn PH, Friberg J, Grunnet LG, et al. Divalent metal transporter 1 regulates iron-mediated ROS and pancreatic beta cell fate in response to cytokines. *Cell Metab*. 2012 Oct 3;16(4):449-61.
72. Chin KT, Zhou HJ, Wong CM, Lee JM, Chan CP, Qiang BQ, et al. The liver-enriched transcription factor CREB-H is a growth suppressor protein underexpressed in hepatocellular carcinoma. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(6):1859-73.
73. Omori Y, Imai J, Watanabe M, Komatsu T, Suzuki Y, Kataoka K, et al. CREB-H: a novel mammalian transcription factor belonging to the CREB/ATF family and functioning via the box-B element with a liver-specific expression. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 15;29(10):2154-62.
74. Zhang K, Shen X, Wu J, Sakaki K, Saunders T, Rutkowski DT, et al. Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell*. 2006 Feb 10;124(3):587-99.
75. De Domenico I, Kaplan J. A new wrinkle in the fold: hepcidin links inflammation to the unfolded protein response. *Cell Metab*. 2009 Oct;10(4):245-6.
76. Wessling-Resnick M. Iron homeostasis and the inflammatory response. *Annu Rev Nutr*. 2010 Aug 21;30:105-22.
77. Fujita T, Uchida K, Maruyama N. Purification of senescence marker protein-30 (SMP30) and its androgen-independent decrease with age in the rat liver. *Biochim Biophys Acta*. 1992 Apr 22;1116(2):122-8.
78. Fujita T, Shirasawa T, Maruyama N. Expression and structure of senescence marker protein-30 (SMP30) and its biological significance. *Mech Ageing Dev*. 1999 Mar 15;107(3):271-80.
79. Kondo Y, Inai Y, Sato Y, Handa S, Kubo S, Shimokado K, et al. Senescence marker protein 30 functions as gluconolactonase in L-ascorbic acid biosynthesis, and its knockout mice are prone to scurvy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Apr 11;103(15):5723-8.
80. Son TG, Zou Y, Jung KJ, Yu BP, Ishigami A, Maruyama N, et al. SMP30 deficiency causes increased oxidative stress in brain. *Mech Ageing Dev*. 2006 May;127(5):451-7.
81. Maruyama N, Ishigami A, Kondo Y. Pathophysiological significance of senescence marker protein-30. *Geriatr Gerontol Int*. 2010 Jul;10 Suppl 1:S88-98.
82. Hasegawa G, Yamasaki M, Kadono M, Tanaka M, Asano M, Senmaru T, et al. Senescence marker protein-30/gluconolactonase deletion worsens glucose tolerance through impairment of acute insulin secretion. *Endocrinology*. 2010 Feb;151(2):529-36.
83. Handa S, Maruyama N, Ishigami A. Over-expression of Senescence Marker Protein-30 decreases reactive oxygen species in human hepatic carcinoma Hep G2 cells. *Biol Pharm Bull*. 2009 Oct;32(10):1645-8.
84. Umur EE, Oktenli C, Celik S, Tangi F, Sayan O, Sanisoglu YS, et al. Increased iron and oxidative stress are separately related to cognitive decline in elderly. *Geriatr Gerontol Int*. 2011 Oct;11(4):504-9.
85. Salminen A, Ojala J, Kaarniranta K, Kauppinen A. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress activate inflammasomes: impact on the aging process and age-related diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2012 Sep;69(18):2999-3013.
86. Banerjee M, Saxena M. Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: role in type 2 diabetes. *Clin Chim Acta*. 2012 Aug 16;413(15-16):1163-70.

87. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993 Nov;123(11):1939-51.
88. Baranowska I, Czernicki K, Aleksandrowicz R. The analysis of lead, cadmium, zinc, copper and nickel content in human bones from the upper Silesian industrial district. *Sci Total Environ.* 1995 Jan 10;159(2-3):155-62.
89. Azevedo MdOF, Maria Sueli Soares; Brígido, Marcelo de Macedo; Maranhão, Andréa Queiroz; De-Souza, Marlene Teixeira. *Técnicas Básicas em Biologia Molecular.* Brasília: Editora Universidade de Brasília; 2003.
90. Huang Q, Dunn RT, 2nd, Jayadev S, DiSorbo O, Pack FD, Farr SB, et al. Assessment of cisplatin-induced nephrotoxicity by microarray technology. *Toxicol Sci.* 2001 Oct;63(2):196-207.
91. Palsamy P, Subramanian S. Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2-Keap1 signaling. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Jul;1812(7):719-31.
92. Wang Q, Du F, Qian ZM, Ge XH, Zhu L, Yung WH, et al. Lipopolysaccharide induces a significant increase in expression of iron regulatory hormone hepcidin in the cortex and substantia nigra in rat brain. *Endocrinology.* 2008 Aug;149(8):3920-5.
93. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.
94. Fan Y, Yamada T, Shimizu T, Nanashima N, Akita M, Suto K, et al. Ferritin expression in rat hepatocytes and Kupffer cells after lead nitrate treatment. *Toxicol Pathol.* 2009 Feb;37(2):209-17.
95. Cham BE, Roeser HP, Nikles A, Ridgway K. A procedure for the purification of ferritin from human liver by heating a methanol-treated homogenate. *Anal Biochem.* 1985 Dec;151(2):561-5.
96. Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem.* 1972 Aug;48(2):422-7.
97. Inamura J, Ikuta K, Jimbo J, Shindo M, Sato K, Torimoto Y, et al. Upregulation of hepcidin by interleukin-1beta in human hepatoma cell lines. *Hepatol Res.* 2005 Nov;33(3):198-205.
98. Arruda LF, Arruda SF, Campos NA, de Valencia FF, Siqueira EM. Dietary iron concentration may influence aging process by altering oxidative stress in tissues of adult rats. *PLoS One.* 2013;8(4):e61058.
99. Campos NA. *O excesso e a deficiência dietética de ferro em ratos senis aumentam o estresse oxidativo.* Brasília: Universidade de Brasília; 2011.
100. Sobocanec S, Balog T, Kusic B, Sverko V, Saric A, Marotti T. Differential response to lipid peroxidation in male and female mice with age: correlation of antioxidant enzymes matters. *Biogerontology.* 2008 Oct;9(5):335-43.
101. Tian L, Cai Q, Wei H. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging. *Free Radic Biol Med.* 1998 Jun;24(9):1477-84.
102. Ago T, Matsushima S, Kuroda J, Zablocki D, Kitazono T, Sadoshima J. The NADPH oxidase Nox4 and aging in the heart. *Aging (Albany NY).* 2010 Dec;2(12):1012-6.
103. Durrant JR, Seals DR, Connell ML, Russell MJ, Lawson BR, Folian BJ, 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. *J Physiol.* 2009 Jul 1;587(Pt 13):3271-85.
104. Villar-Cheda B, Valenzuela R, Rodriguez-Perez AI, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. Aging-related changes in the nigral angiotensin system enhances proinflammatory and pro-oxidative markers and 6-OHDA-induced dopaminergic degeneration. *Neurobiol Aging.* 2012 Jan;33(1):204 e1-11.
105. Bulvik BE, Berenshtein E, Konijn AM, Grinberg L, Vinokur V, Eliashar R, et al. Aging is an organ-specific process: changes in homeostasis of iron and redox proteins in the rat. *Age (Dordr).* 2012 Jun;34(3):693-704.

106. Minamiyama Y, Takemura S, Kodai S, Shinkawa H, Tsukioka T, Ichikawa H, et al. Iron restriction improves type 2 diabetes mellitus in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010 Jun;298(6):E1140-9.
107. Daba A, Gkouvatsos K, Sebastiani G, Pantopoulos K. Differences in activation of mouse hepcidin by dietary iron and parenterally administered iron dextran: compartmentalization is critical for iron sensing. *J Mol Med (Berl)*. 2013 Jan;91(1):95-102.
108. Du F, Qian ZM, Gong Q, Zhu ZJ, Lu L, Ke Y. The iron regulatory hormone hepcidin inhibits expression of iron release as well as iron uptake proteins in J774 cells. *J Nutr Biochem*. 2012 Dec;23(12):1694-700.
109. 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*. 2008 Jul;29(4):708-13.
110. Richert S, Wehr NB, Stadtman ER, Levine RL. Assessment of skin carbonyl content as a noninvasive measure of biological age. *Arch Biochem Biophys*. 2002 Jan 15;397(2):430-2.
111. Joannis DR, Storey KB. Oxidative damage and antioxidants in *Rana sylvatica*, the freeze-tolerant wood frog. *Am J Physiol*. 1996 Sep;271(3 Pt 2):R545-53.
112. Souza HP, Liu X, Samouilov A, Kuppusamy P, Laurindo FR, Zweier JL. Quantitation of superoxide generation and substrate utilization by vascular NAD(P)H oxidase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Feb;282(2):H466-74.

## APÊNDICE – Metodologia Suplementar

### METODOLOGIA SUPLEMENTAR

Realizados por Natália Aboudib Campos como parte da Dissertação de mestrado intitulada “O excesso e a deficiência dietética de ferro em ratos senis aumentam o estresse oxidativo” defendida em Agosto de 2011 no PPGNH sob a orientação da Profa Dra Egle Machado de A. Siqueira pela Universidade de Brasília e, ainda, fazem parte do artigo publicado na Plos One (2013). Vol. 8, issue 4 (Dietary Iron Concentration May Influence Aging Process by Altering Oxidative Stress in Tissues of Adult Rats - Lorena Fernandes Arruda, Sandra Fernandes Arruda, Natália Aboudib Campos, Fernando Fortes de Valencia, Egle Machado de Almeida Siqueira) (98-99).

**Peroxidação lipídica:** as concentrações de malondialdeído (MDA) nos homogeneizados de fígado, baço, coração, músculo esquelético, intestino e rins foram aferidas por cromatografia líquida de alta eficiência (para o coração e rim: coluna Shim-park C18 CLC-ODS(M) 25 cm Shimadzu, Kyoto, Japão – e para o fígado, baço, intestino, músculo esquelético: coluna Shim-park C18 CLC-ODS(M) 15 cm Shimadzu, Kyoto, Japão) (109). Os comprimentos de onda do detector espectrofluorimétrico foram fixados a 532 nm (excitação) e 553 nm (emissão). Uma curva padrão de quatro pontos (0,81-16,16 nmol / mL) foi realizada com tetraethoxypropano (TEP) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) dissolvida em 1% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, como a hidrólise ácida do rendimento do TEP das quantidades estequiométricas de MDA (coluna de 15 centímetros:  $y = 7.10^{-7} x - 0,132$ ;  $r^2 = 0,9903$  e a coluna 25 centímetros:  $y = 7.10^{-6} x + 0,0473$ ;  $r^2 = 0,9974$ ). A concentração de proteína total do homogeneizado foi determinada pelo método de Hartree et al. (1972) (96). Os resultados foram expressos em nmol MDA / mg de proteína total (96).

**Oxidação de proteínas:** a oxidação de proteínas dos homogeneizados de fígado, baço, rins, coração, intestino e de músculo esquelético foi aferida pelo teor de carbonil de acordo com o método de Richert et al. (2002) (110). A absorvância foi medida a 376 nm (Espectrofotômetro Shimadzu - TCC 240A) e o teor de carbonil foi

expresso como nmol de grupos carbonil por miligrama de proteína total, utilizando o coeficiente de extinção de  $22 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . A concentração de proteína total dos homogeneizados foi determinada pelo método de Hartree et al. (1972) (96).

**Preparação de homogeneizados de tecidos para os ensaios de enzimas:** fígado, baço, coração, intestino, rins e músculo esquelético foram homogeneizados em 1:20 (w / v) com um homogeneizador Ultraturrax usando 0,5 mol / L de tampão fosfato de potássio, pH 7,2, contendo 50 mmol / L de ácido tetraacético etilenodiamino e 1 mmol / L de fluoreto de fenilmetilsulfonil (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 4 °C e centrifugado a 15 000 x g durante 20 min.

**Ensaio de Catalase:** Este ensaio foi realizado avaliando o consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela catalase por espectrofotometria (espectrofotômetro Shimadzu – TCC 240A) (A240nm) em 15 segundos, conforme Joannis e Storey (1996) (111). Para tanto foi utilizado um sistema contendo 10  $\mu\text{L}$  de homogeneizado dos tecidos (baço, fígado e rim), 50  $\mu\text{L}$  (coração), 125  $\mu\text{L}$  (intestino) ou 200  $\mu\text{L}$  (músculo esquelético), tampão fosfato de potássio 50 mmol/L, pH 7,2 (Sigma Aldrich®, Alemanha) com EDTA 0,5 mmol/L (Reagen®, Brasil) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mmol/L (Merck®, Alemanha), concentrações finais. A atividade enzimática foi calculada a por meio do coeficiente de extinção do  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 240nm que é de  $0,0394 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Uma unidade de catalase foi definida como a quantidade de enzima necessária para decompor 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  / min.

**Ensaio de Glutathione peroxidase (GPx):** A atividade de glutathione peroxidase foi determinada por espectrofotometria (espectrofotômetro Shimadzu – TCC 240A) (A340nm) de forma indireta, já que foi monitorada a oxidação do NADPH, reação catalisada pela glutathione redutase (GR) conforme Joannis e Storey (1996) (111). 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),  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,2 mmol/L (Merck®, Alemanha) e 50  $\mu\text{L}$  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  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). 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  $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Uma unidade (U) de glutationala peroxidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 nmol NADPH / min.

**Ensaio de Glutationala Redutase (GR):** O ensaio foi feito por espectrofotometria (espectrofotômetro Shimadzu – TCC 240A) (A340nm), segundo Joannis e Storey (1996) (111), 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  $\mu\text{L}$  (fígado, baço e rim), 150  $\mu\text{L}$  (intestino) ou 250  $\mu\text{L}$  (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  $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a 340nm. Uma unidade (U) de glutationala redutase foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 nmol NADPH / min.

**Ensaio de Glutationala-S-transferase (GST):** A atividade de GST foi avaliada segundo Joannis e Storey (1996) (111), por espectrofotometria (espectrofotômetro Shimadzu – TCC 240A) (A340nm), onde se fez a leitura do conjugado de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a GSH (S-2,4-dinitrofenil-glutationala). 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), CDBN 1 mmol/L (Sigma Aldrich®, Alemanha), GSH 1 mmol/L (Sigma Aldrich®, Alemanha) e 50  $\mu\text{L}$  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 CDBN). A atividade enzimática foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar do S-2,4-dinitrofenil-glutationala de  $9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a 340nm. Uma unidade (U) de

glutathiona-S-transferase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 nmol de conjugado / min.

**Ensaio de NADPH oxidase:** A atividade da Nox foi medida através do decaimento do consumo de NADPH por espectrofotometria a 340nm (espectrofotômetro Shimadzu – TCC 240A), segundo Souza et al. (2002) com modificações (112). O ensaio durou 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 µL para fígado, baço, rim e intestino; 200 µL para músculo esquelético e 250 µL 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 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> a 340nm. Uma unidade (U) de NADPH oxidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 nmol NADPH / min.

## RESULTADOS SUPLEMENTARES

Os resultados a seguir correspondem a alguns dos dados que fazem parte da Dissertação de mestrado intitulada “O excesso e a deficiência dietética de ferro em ratos senis aumentam o estresse oxidativo” defendida em Agosto de 2011, no PPGNH, sob a orientação da Profa Dra Egle Machado de A. Siqueira pela Universidade de Brasília realizados por Natália Aboudib Campos e, ainda, fazem parte do artigo publicado na Plos One (2013). Vol. 8, issue 4 (Dietary Iron Concentration May Influence Aging Process by Altering Oxidative Stress in Tissues of Adult Rats - Lorena Fernandes Arruda, Sandra Fernandes Arruda, Natália Aboudib Campos, Fernando Fortes de Valencia, Egle Machado de Almeida Siqueira) (98-99). Estes dados estão apresentados nas Figuras A1 e A2.

A Figura A1 mostra o estado oxidativo dos ratos, avaliado pelos níveis de carbonil como dano oxidativo a proteínas e o malondialdeído (MDA), como dano oxidativo aos lipídeos, nos tecidos dos ratos. O grupo jovem mostrou níveis de MDA significativamente menores no baço, fígado e coração e os níveis aumentados no músculo esquelético em relação ao grupo adulto controle. Os ratos jovens também apresentaram níveis reduzidos de carbonil no intestino, e curiosamente, foram encontrados níveis mais elevados de carbonil no coração. Os ratos com restrição de ferro na dieta mostraram uma redução significativa nos níveis de MDA no fígado, rim, coração e intestino, e um aumento significativo nos níveis de MDA no baço relativos aos ratos controle. Os níveis de carbonil também foram significativamente menores nos fígados dos ratos ARF comparados ao grupo controle, entretanto, no músculo esquelético foram observados níveis elevados de carbonil. Os ratos tratados com dieta enriquecida com ferro (AEF) mostraram um aumento significativo nos níveis de MDA no baço e no intestino e uma redução significativa no coração. O fígado, coração e músculo esquelético dos ratos AEF apresentaram maiores níveis de carbonil em relação aos ratos controle (Figura A1).

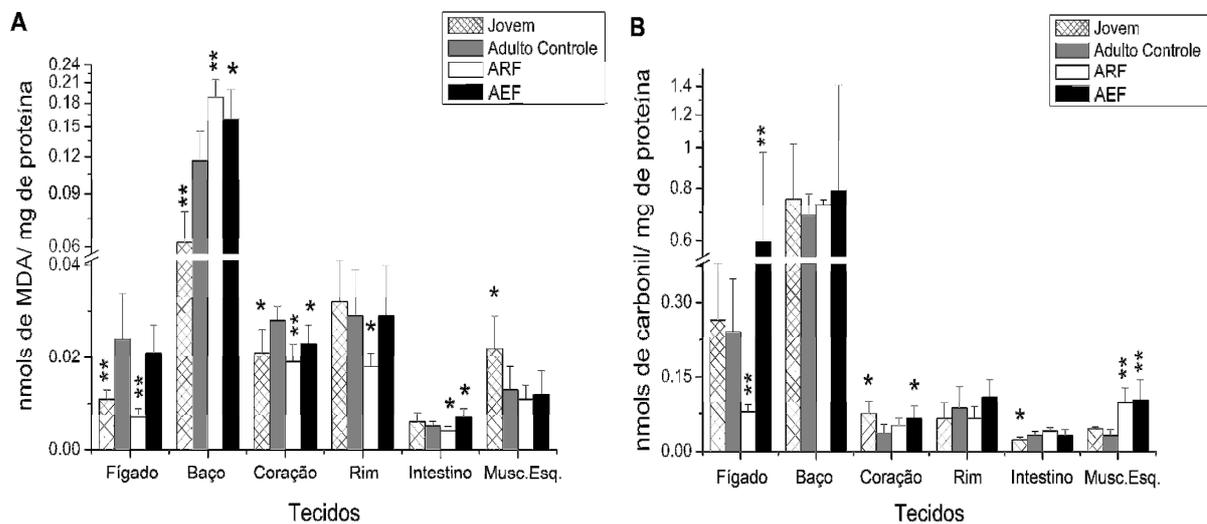
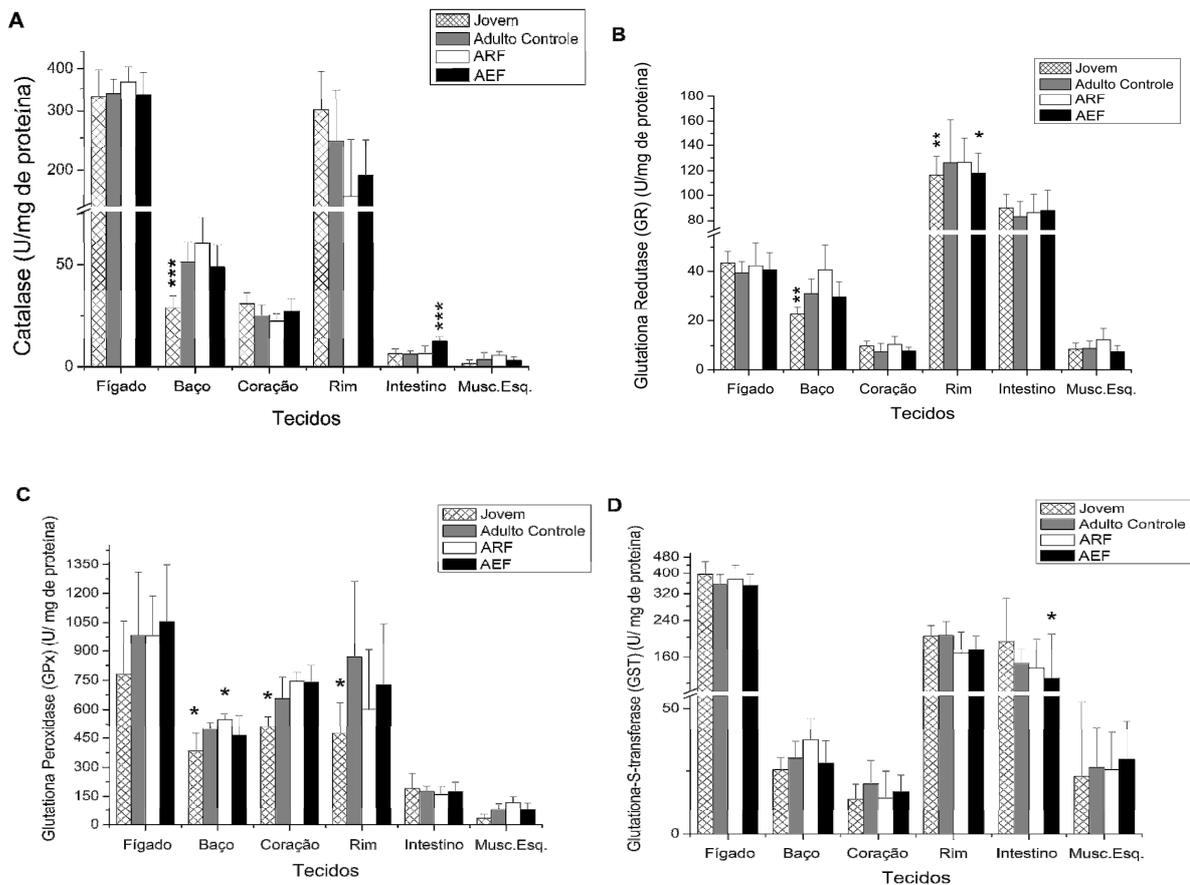


Figura A1: Concentração de malondialdeído (MDA) (A) e de proteína carbonilada (B) em homogeneizados de fígado, baço, coração, rim, intestino e músculo esquelético de ratos jovens (n = 6) e ratos adultos tratados com dieta controle (CT; n = 7), dieta com restrição de ferro (ARF; n = 5) e dieta enriquecida com ferro (AEF; n = 8) (nmols de MDA / mg de proteína e de nmols de carbonil / mg de proteína). Média e desvio padrão. Diferença entre o grupo controle e os grupos teste: \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01; \*\*\* p ≤ 0,001 (teste t de Student).

O estado oxidativo dos ratos jovens e adultos tratados foi também avaliado por meio da análise das atividades específicas enzimáticas da catalase (CAT), glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPx), glutatona S-transferase (GST) e NADPH-oxidase (Nox) e os resultados são mostrados na Figura A2. Houve alterações em determinadas atividades enzimáticas em alguns tecidos. Os ratos jovens mostraram níveis significativamente reduzidos da atividade de CAT no baço, enquanto que a atividade da GR foi inferior no baço e rins, a atividade da GPx foi menor no baço, coração e rins e a atividade da Nox foi inferior no baço em relação aos ratos controle. Os ratos ARF apresentaram diferenças significativas com maiores níveis que os ratos controle na atividade das duas enzimas antioxidantes: GPx no baço e Nox no fígado. Os ratos AEF apresentaram níveis elevados da atividade de CAT no intestino e houve redução da atividade de GR no rim, de GST no intestino e Nox no baço e intestino comparados com os ratos controle (Figura A2).



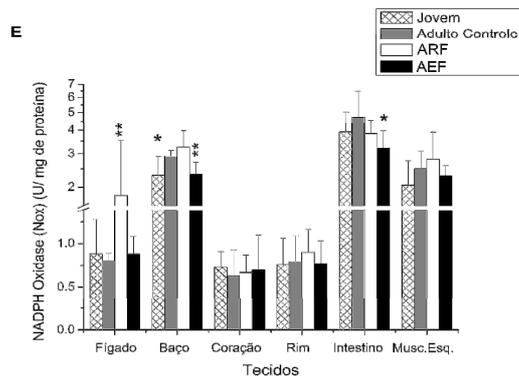


Figura A2: Atividade específica de catalase (A), GR

(B), GPX (C), GST (D) e Nox (E) dos homogeneizados dos tecidos dos ratos jovens ( $n = 6$ ) e dos ratos adultos tratados com dieta controle (CT;  $n = 7$ ), dieta com restrição de ferro (ARF;  $n = 5$ ) e dieta enriquecida com ferro (AEF;  $n = 8$ ) (U/mg de proteína). Média e desvio padrão. Diferença entre o grupo controle e os grupos teste: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  (teste t de Student). GR, glutathiona redutase; GPX, glutathiona peroxidase; GST, glutathiona S- transferase; Nox, Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase oxidase.



**Universidade de Brasília**

Instituto de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 28 de junho de 2010

### **DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado “**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM FERRO NOS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO, ENVELHECIMENTO E ESTADO CORPORAL DE FERRO EM RATOS JOVENS E SENESCENTES**”, UnBDOC nº 100.199/2009, sob responsabilidade do Profa. Dra. Egle Machado de Almeida e Siqueira, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Prof. Antonio Sebben  
Coordenador do CEUA



