UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

VINÍCIUS BERMOND MARQUES

EFEITOS DA SOBRECARGA CRÔNICA DE FERRO SOBRE A ESTRUTURA/FUNÇÃO VASCULAR DE CAMUNDONGOS ATEROSCLERÓTICOS

VITÓRIA 2019

VINÍCIUS BERMOND MARQUES

EFEITOS DA SOBRECARGA CRÔNICA DE FERRO SOBRE A ESTRUTURA/FUNÇÃO VASCULAR DE CAMUNDONGOS ATEROSCLERÓTICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito final para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas, na área de concentração Fisiologia Cardiovascular.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo dos Santos

VITÓRIA 2019



REGISTRO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE TESE DO CANDIDATO AO TÍTULO DE DOUTOR PELO PPGCF/CCS/UFES

N°. Matrícula do^(a) Candidato^(a): 2015241147

A Comissão Julgadora examinou a Tese de Doutorado intitulada"Efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre a estrutura/função vascular de camundongos ateroscleróticos", apresentada e defendida publicamente pelo alunoVinícius Bermond Marques no dia 24 de outubro de 2019 às 14h, e decidiu, por unanimidade, aprovar a referida tese de Doutorado e, portanto, declara que o aluno faz jus à obtenção do Título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Vitória – ES, 24 de outubro de 2019.

Prof. Dr. Leonardo dos Santos (Orientador)

Prof.Dr. Elisardo Corral Vasquez (Membro Interno)

Prof. Dr. José Geraldo Mill (Membro Interno)

Prof^a.Dr^a. Luciana Venturini Rossoni (Membro Externo)

Prof. Dr. Helder Mauad (Membro Externo)

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

Marques, Vinícius Bermond, 1991-

M357e Efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre a estrutura/função vascular de camundongos ateroscleróticos / Vinícius Bermond Marques. - 2019. 107 f. : il.

> Orientador: Leonardo dos Santos. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

> 1. Ferro. 2. Aorta. 3. Aterosclerose. 4. Endotélio. 5. Óxido nítrico. I. dos Santos, Leonardo. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

> > CDU: 612

À minha querida família por todo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde, força, motivação, pelas oportunidades e por sempre conduzir e iluminar o meu caminho.

A minha família pelo incentivo e apoio incondicional. Agradeço aos meus pais pelo exemplo de vida, pelo apoio e por sempre acreditarem em mim. Mãe, obrigado por ser minha primeira professora e por me ensinar a ler e escrever, se não fossem seus ensinamentos, talvez hoje não estivesse chegado até aqui. Samantha, agradeço o apoio incondicional, a ajuda, a parceria, a compreensão nos meus momentos de ausência e a paciência, obrigado por tornar os meus dias mais felizes!

Ao meu orientador Prof. Dr. Leonardo por me aceitar como seu aluno e me conduzir no caminho da ciência, pelas riquíssimas discussões cientificas que tanto me agregaram e motivaram durante a vida acadêmica. Obrigado por estar sempre tão presente e disponível. É uma honra ser seu aluno, e sem dúvidas levarei seus ensinamentos por toda a minha vida. Muito obrigado por me orientar.

Aos professores do PPGCF, em especial os do nosso laboratório: Prof.^a Dr^a. Ivanita, Prof.^a Dr^a. Alessandra e Prof. Dr. Dalton. Obrigado pelo apoio, pelo empenho e dedicação em manter o laboratório funcionando e pela contribuição científica com ideias e sugestões realizadas durante nossos seminários.

À Maylla por aceitar nossa empreitada, pela disponibilidade e contribuição para os estudos de reatividade vascular e biologia molecular. Muito obrigado por toda ajuda, seu apoio foi muito importante desde o início até a conclusão do nosso projeto.

Ao Rodrigo, Isabela, Jandinay e Helbert por todas as contribuições que possibilitaram a realização do nosso estudo. Nossas colaborações deram muito certo!

À Tatiane e ao Bruno pela amizade e parceria de sempre.

Agradeço a todos meus amigos do LEMC, pelo companheirismo, pela força, contribuição com ideias e sugestões e por tornarem os dias mais agradáveis.

Aos colegas dos outros laboratórios, pela amizade, ajuda e momentos que passamos juntos durantes os experimentos e disciplinas.

Ao grupo de pesquisa do Prof. Dr. Vasquez e Prof.^a Dr^a. Silvana pela colaboração e a toda a equipe do Laboratório do Fisiologia Translacional pelo fornecimento de animais, em especial ao Marquinhos pela amizade e parceria para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Dr. Mill e Prof. Dr. Vasquez pelas contribuições durante a etapa de qualificação deste projeto.

Ao Prof. Breno pela contribuição com ideias e análises morfológicas.

Ao Tadeu e Flávio pelos ensinamentos e apoio para realização da MEV.

Ao LUCCAR, LABIFE e LHMI pelo suporte técnico na preparação e análise de amostras para os estudos morfológicos.

A todos os funcionários do PPGCF-UFES, pelos serviços prestados. Em especial ao Dr. Anderson, por todo o auxílio nas atividades de rotina do laboratório.

Aos professores da banca examinadora, obrigado pelas correções, contribuições e disponibilidade.

Agradeço a todos os professores que já tive, que contribuíram para meu processo de formação. Em especial, à Prof.^a MSc. Wanize por acreditar em mim e me levar ao LEMC, e ao Prof. Dr. Dalton por me acolher e aceitar no Laboratório.

Aos órgãos de fomento FAPES, CAPES e CNPq, por tornarem possível a realização de nossas pesquisas.

"Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino" (Leonardo da Vinci)

RESUMO

O ferro é um metal essencial para homeostase celular, porém quando em sobrecarga tem sido associado a danos em diversos órgãos, inclusive no sistema cardiovascular. Foi recentemente demonstrado que a sobrecarga de ferro induz disfunção endotelial e estresse oxidativo, o que poderia aumentar o risco de aterosclerose. No entanto, a nocividade relacionada ao ferro em uma condição de predisposição genética para a aterosclerose ainda não está clara. Neste estudo, testamos a hipótese de que a sobrecarga crônica de ferro intensifica o processo aterosclerótico associado a disfunção endotelial em camundongos nocautes para apolipoproteína E (apoE(-/-)). Foram analisados soro e aortas de camundongos selvagens C57BL/6 (C57) e apoE(-/-) injetados com soro fisiológico ou ferro-dextrano i.p. (Fe, 10 mg/camundongo/dia) 5 vezes por semana durante 4 semanas. A sobrecarga de ferro aumentou os níveis séricos de ferro e de biomarcadores de lesão hepática e estresse oxidativo, assim como a deposição de ferro na aorta em ambas as linhagens, mas apenas nos camundongos apoE(-/-) Fe tinham intensificados a hipercolesterolemia (1,7 vezes), o tamanho da placa aterosclerótica (19% da luz da aorta) e o infiltrado celular nestas lesões. Por microscopia eletrônica de varredura, o pequeno dano endotelial estrutural causado pela sobrecarga de ferro no C57 Fe foi piorado no grupo apoE(-/-) Fe. Entretanto, a disfunção endotelial foi encontrada apenas no grupo apoE(-/-) Fe, com relaxamento diminuído à acetilcolina e hiper-reatividade à fenilefrina associada à redução da modulação pelo óxido nítrico. Além disso, o tiron e a indometacina atenuaram a reatividade à fenilefrina em maior magnitude nas aortas do grupo apoE(-/-) Fe. Confirmando, houve redução na atividade de enzimas antioxidante (superóxido dismutase e catalase) e aumento da expressão de ciclooxigenase-2 em aorta, e níveis elevados de metabólitos do tromboxano A2 e da prostaciclina na urina do grupo apoE(-/-) Fe. Nossos resultados demonstram que a sobrecarga crônica de ferro intensifica o processo aterosclerótico e induz disfunção endotelial em camundongos ateroscleróticos, provavelmente devido ao estresse oxidativo e o desequilíbrio entre os fatores relaxantes e contráteis sintetizados pelo endotélio danificado.

Palavras-chave: sobrecarga de ferro; aterosclerose; disfunção endotelial; estresse oxidativo; prostanóides.

ABSTRACT

Iron is an essential metal for cellular homeostasis, but when overloaded it has been associated with damage to various organs, including the cardiovascular system. We previously demonstrated in rats that iron overload induces endothelial dysfunction and oxidative stress, which could increase the risk of atherosclerosis. However, the ironrelated harmfulness under a genetic predisposition to atherosclerosis is still unclear. In this study we have tested the hypothesis that chronic iron overload intensifies the atherosclerotic process associated with endothelial dysfunction in apolipoprotein E knockout mice (apoE(-/-)). Serum and aortas of wild-type C57BL/6 (C57) and apoE(-/-) mice injected with saline or ferro-dextran i.p. (Fe, 10 mg/mouse/day) 5 times a week for 4 weeks were used. Iron overload increased serum iron levels and biomarkers of liver injury and oxidative stress, as well as aortic iron deposition in both lines, but only apoE(-/-) Fe mice had intensified hypercholesterolemia (1.7 times), the size of the atherosclerotic plaque (19% of the aortic lumen) and the cellular infiltrate in these lesions. By scanning electron microscopy, the small endothelial structural damage caused by iron in C57 was worsened in the apoE(-/-) Fe group. However, endothelial dysfunction was found only in the apoE(-/-) Fe group, identified by impaired relaxation to acetylcholine and hyperreactivity to phenylephrine associated with reduced nitric oxide modulation. Moreover, tiron and indomethacin attenuated reactivity to phenylephrine with greater magnitude in aortas of the apoE(-/-) Fe group. Confirming, there were reduces in the antioxidant (superoxide dismutase and catalase) activity, increased expression of cyclooxygenase-2 in the aorta and elevated levels of thromboxane A2 and prostacyclin metabolites in the urine of apoE(-/-) Fe group. Our results showed that chronic iron overload intensifies the atherosclerotic process and induces endothelial dysfunction in atherosclerotic mice, probably due to the oxidative stress and the imbalance between the relaxing and contractile factors synthesized by the damaged endothelium.

Key words: iron overload; atherosclerosis; endothelial dysfunction; oxidative stress; prostanoids.

LISTA DE TABELAS

 Tabela 1. Parâmetros ponderais e biométricos de camundongos injetados com

 ferro.
 .55

 Tabela suplementar 1. Efeito da sobrecarga de ferro na resposta vasodilatadora

 (R_{máx} e pD₂) à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio em aortas das linhagens C57

 e apoE^{-/-}.

Tabela suplementar 2. Efeito do L-NAME, indometacina e tiron na resposta vasoconstritora à fenilefrina ($R_{máx} e pD_2$) em aortas das linhagens C57 e apoE^{-/-}......95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Controle dos níveis circulantes de ferro19
Figura 2. Homeostase do ferro sistêmico21
Figura 3. Vias bioquímicas da geração e metabolismo de espécies reativas de oxigênio
Figura 4. Desenvolvimento de uma lesão aterosclerótica
Figura 5. Esquema representativo da preparação experimental dos anéis de artéria aorta para a realização de estudos de reatividade vascular <i>in vitro</i> 47
Figura 6. Registro com curva do teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCI (cloreto de potássio)
Figura 7. Esquema representativo dos protocolos das curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh), fenilefrina (PE) e ao nitroprussiato de sódio (NPS)49
Figura 8. Parâmetros séricos de camundongos injetados com ferro56
Figura 9. Aumento da placa aterosclerótica e depósitos de ferro no arco aórtico de camundongos apoE ^{-/-} após sobrecarga de ferro
Figura 10. Efeitos da sobrecarga crônica de ferro no infiltrado celular dentro da placa aterosclerótica de camundongos apoE ^{-/-}
Figura 11. Efeitos da sobrecarga crônica de ferro na arquitetura da superfície endotelial
Figura 12. Efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre o relaxamento vascular em aorta
Figura 13. Efeitos da sobrecarga crônica de ferro na reatividade vascular à fenilefrina
Figura 14. Efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre a modulação nitrérgica na reatividade vascular à fenilefrina

LISTA DE SIGLAS E ABREVIAÇÕES

- HO Radical hidroxila
- ACh Acetilcolina
- AMPc Monofosfato cíclico de adenosina
- Angio II Angiotensina II
- AOPP Produtos proteicos de oxidação avançada
- apoE^{-/-} Camundongo nocaute para apolipoproteína E
- CAT Catalase
- CEUA-UFES Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do
- Espírito Santo
- CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- COX Ciclooxigenase
- COX-1 Isoforma da ciclooxigenase tipo 1
- COX-2 Isoforma da ciclooxigenase tipo 2
- Ct Controle
- DAF-2 4,5-diaminufluoresceína
- DAG Diacilglicerol
- dASC Diferenças na área sob as curvas
- DHE Dihidroetídio
- DMT-1 Transportador de metal divalente 1
- EC₅₀ Concentração de agonista que produziu metade da resposta máxima
- ECA Enzima conversora de angiotensina
- EDHR Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
- EDRF Fator relaxante derivado do endotélio
- EPM Erro padrão da média
- EROs Espécies reativas derivados do oxigênio
- FAPES Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo
- FC Frequência cardíaca
- Fpn Ferroportina
- GCs Guanilato ciclase solúvel
- GMPc Monofosfato cíclico de guanosina
- Gpx Glutationa peroxidase
- GSH Glutationa reduzida

GSSG - Glutationa oxidada

- GTP Guanosina trifosfato
- H₂O₂ Peróxido de hidrogênio
- HCP1 Proteína transportadora do heme-1
- HH Hemocromatose hereditária

i.p - Intraperitoneal

- IP3 1,4,5 inositol trifosfato
- JNK c-Jun NH2-termina kinase
- JNK Janus kinase
- L-NAME- NG-nitro-L-arginina metil éster
- MAPKs Mitogen-activaded protein
- MDA Malondialdeído
- MLCK Kinase da cadeia leve da miosina
- MLCP Fosfatase da cadeia leva da miosina
- MLV Músculo liso vascular
- NAD(P)H Nicotinamida Adenina dinucleotídeo fosfato
- NO Óxido nítrico
- NOS NO sintase
- NPS Nitroprussiato de sódio
- O2⁻⁻ Ânion superóxido
- OONO- Peroxinitrito
- PE Fenilefrina
- $PGH_2 e PGF_{2\alpha} Prostaglandinas H_2 e F_{2\alpha}$
- PGI2 Prostaciclina
- PGMI Metabólitos da prostaciclina
- PI3K Fosfatidil inositol 3-kinase
- PKA Proteína kinase dependente de AMPc
- PKC Proteína kinase C
- PLA2 Fosfolipase A2
- PLC Fosfolipase C
- PLD Fosfolipase D
- Rmáx Resposta máxima
- SOD Superóxido dismutase
- SRA Sistema renina angiotensina

TBARs - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

- TfR Receptor de transferrina
- TP Receptor de tromboxano A2
- TXA₂ –Tromboxano A₂
- TXB2 Metabólitos do tromboxano A2
- UFES Universidade Federal do Espirito Santo

SUMÁRIO

1	NTRODUÇÃO	18
1.1	ERRO	18
1.1.	Ciclo do ferro no organismo dos mamíferos	18
1.1.:	Sobrecarga de ferro	22
1.1.	2.1 Efeito da sobrecarga de ferro em diferentes sistemas	25
1.1.	2.2 Efeito da sobrecarga de ferro sobre o sistema cardiovascular	27
1.2	REGULAÇÃO DO TÔNUS	29
1.2.	Endotélio no controle do tônus vascular	30
1.2.	.1 Fatores vasodilatadores derivados do endotélio	31
1.2.	.2 Fatores vasoconstritores derivados do endotélio	32
1.3	FEITOS DO FERRO SOBRE O ENDOTÉLIO VASCULAR	35
1.4	TEROSCLEROSE	35
1.4.	Ferro e aterosclerose	38
1.5	USTIFICATIVA E HIPÓTESE	39
2)BJETIVOS	41
2.1	DBJETIVO GERAL	41
2.2	DBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3	IATERIAL E MÉTODOS	42
3.1	NIMAIS EXPERIMENTAIS	42
3.1.	Protocolo de sobrecarga crônica com ferro	42
3.1.	2 Avaliação ponderal e biométrica	43
3.1.	Mensuração do colesterol e ferro sérico	43
3.1.	Atividade séricas das transaminases hepáticas	44
3.1.	Avaliação do estresse oxidativo sistêmico	44
3.1.	Análise da placa aterosclerótica e depósito de ferro no arco aórtico	45
3.1.	Microscopia eletrônica de varredura	46
3.1.	Protocolo para estudos de reatividade vascular em aortas	46
3.1.	8.1 Avaliação da integridade do músculo liso vascular	48
3.1.	8.2 Avaliação do relaxamento dependente e independente do endotélio	48
3.1.	3.3 Avaliação da resposta vasoconstritora à fenilefrina	48
3.1.9	Avaliação <i>in situ</i> da produção de óxido nítrico vascular	49
3.1.	0 Atividade das enzimas antioxidantes na aorta	50
3.1.	1 Expressão proteica da COX-2 na aorta	51
3.1.	2 Medição de metabólitos do tromboxano A2 e prostaciclina na urina	52
3.2	EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTÁTISTICA	52

3.3	FÁRMACOS E REAGENTES UTILIZADOS53
4	RESULTADOS55
4.1	EFEITOS DA SOBRECARGA CRÔNICA DE FERRO SOBRE OS PARÂMETROS
	PONDERAIS, BIOMÉTRICOS E SÉRICOS
4.2	EFEITOS DA SOBRECARGA CRÔNICA DE FERRO SOBRE O PROCESSO
	ATEROSCLERÓTICO
4.3	EFEITOS DA SOBRECARGA CRÔNICA DE FERRO SOBRE A MORFOLOGIA DA
	SUPERFÍCIE ENDOTELIAL EM AORTA
4.4	EFEITOS DA SOBRECARGA CRÔNICA DE FERRO SOBRE A REATIVIDADE
	VASCULAR EM AORTA
4.4	.1 Mecanismos envolvidos nas alterações de reatividade vascular à fenilefrina em
	aortas após sobrecarga de ferro61
4.4	.1.1 Participação do óxido nítrico na modulação da resposta contrátil à fenilefrina61
4.4	.1.2 Participação dos prostanóides sintetizados pela COX na resposta contrátil à
	fenilefrina62
4.4	.1.3 Participação do estresse oxidativo na resposta contrátil à fenilefrina64
5	DISCUSSÃO67
6	CONCLUSÃO75
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS76
	APÊNDICE – Material suplementar95
	ANEXO – Artigo publicado referente à tese96

1 INTRODUÇÃO

1.1 FERRO

O ferro é um dos elementos mais abundantes da crosta terrestre, sendo um metal de transição com capacidade de doar e receber elétrons. Por meio de suas ações oxidantes e redutoras, participa de muitas reações biológicas, dentre elas a síntese do DNA, ação como cofator enzimático na cadeia respiratória mitocondrial e proliferação celular. Por ser um componente do heme incorporado a proteínas como a hemoglobina e mioglobina, participa de funções vitais como a oxigenação e respiração celular. Além disso, pode-se associar a proteínas como a NADPH oxidase e óxido nítrico sintase, participando da catálise de reações metabólicas e reações redox antimicrobianas (DEV; BABITT, 2017; GROTTO, 2010; GUDJONCIK et al., 2014).

1.1.1 Ciclo do ferro no organismo dos mamíferos

A obtenção do ferro no organismo dos mamíferos é feita por meio da dieta e pelo reaproveitamento de eritrócitos senescentes (DUNN; RAHMANTO; RICHARDSON, 2007). Em carnes vermelhas e derivados animais encontra-se na forma heme (mais facilmente absorvida) e em vegetais e grãos, o tipo não-heme, que está principalmente na forma férrica (Fe³⁺) (GROTTO, 2010).

Conforme mostrado na figura 1, o ferro é absorvido pelo enterócito no epitélio duodenal, por meio da proteína transportadora do heme-1 (HCP1) e do transportador de metal divalente 1 (DMT1). Para a absorção da forma Fe³⁺ ocorre uma reação de redução, através da redutase férrica, para a forma ferrosa (Fe²⁺). Após absorção, no meio intracelular certa quantidade de Fe²⁺ é convertida para Fe³⁺ e se liga à ferritina e o restante de Fe²⁺ se liga ao transportador basolateral, a ferroportina, direcionandose para o sangue para ser oxidado para Fe³⁺ pela ferroxidase hefaestina, ligando-se posteriormente à transferrina. O ferro heme é absorvido através do HCP1, e no meio intracelular o ferro é liberado da protoporfirina pela heme oxigenasse, e segue o mesmo destino do restante do Fe²⁺ presente do enterócito. O organismo humano

absorve cerca de 1–2 mg de ferro por dia em uma dieta normal contendo entre 13–18 mg de ferro (DUNN; RAHMANTO; RICHARDSON, 2007; GANZ, 2013; GROTTO, 2010; SIDDIQUE; KOWDLEY, 2012).



Figura 1. Controle dos níveis circulantes de ferro. A hepcidina, ao formar um complexo com a ferroportina, leva à sua internalização e degradação. No enterócito o ferro não é exportado para o exterior da célula e a absorção pelo DMT-1 é inibida (figura a esquerda). Nos macrófagos, principalmente do baço e fígado, o ferro fica acumulado em seu interior, diminuindo o ferro disponível para eritropoese (GROTTO, 2010).

Além da absorção intestinal, a fagocitose e a degradação de hemácias senescentes são uma fonte importante de ferro para o organismo (20–25 mg por dia), quantidade que é suficiente para manter a hematopoese diária. Esse processo é realizado principalmente pelos macrófagos do baço e medula óssea e em menor proporção nas células de Kupffer no fígado, que ocasiona em liberação de ferro e bilirrubina. O ferro pode então ser retido nas moléculas de ferritina no macrófago ou exportado pela ferroportina para circulação (DEV; BABITT, 2017; GROTTO, 2010).

A transferrina, molécula transportadora do ferro no organismo, é uma glicoproteína sintetizada no fígado, retina, testículo e cérebro. Possui dois sítios, e em pH neutro pode transportar até dois átomos de ferro, e além disso o solubiliza, atenua

sua reatividade e facilita sua liberação para as células (GROTTO, 2010). Em condições normais, a transferrina no corpo humano tem capacidade de transportar até 12 mg de ferro. Porém, esta capacidade raramente é utilizada, e em geral de 4–6 mg de ferro circulam ligados à transferrina, equivalente a aproximadamente 30-50% de saturação pelo ferro. Quando complexado à transferrina, a internalização celular do ferro é iniciada pela interação desse complexo ao receptor de transferrina (TfR) presente na superfície da maioria das células (DUNN; RAHMANTO; RICHARDSON, 2007; PONKA; BEAUMONT; RICHARDSON, 1998) que levará, após várias etapas, a endocitose do complexo apoTf-TfR-HFE, com posterior liberação do ferro (DUNN; RAHMANTO; RICHARDSON, 2007; GROTTO, 2010; SIDDIQUE; KOWDLEY, 2012).

Além disso, alguns sistemas podem captar o ferro também não ligado à transferrina, como o coração e o fígado (LIUZZI et al., 2006). Dessa forma, quando a capacidade de ligação a transferrina está totalmente saturada o ferro pode circular livremente pelo soro, intensificando seu depósito nesses tecidos (GROTTO, 2010). O ferro fica armazenado na forma de estoques de ferritina e hemossiderina, normalmente presentes nas células reticuloendoteliais do baço, fígado e medula óssea (GROTTO, 2010).

Conforme mostrado na figura 2, no organismo, a maior parte do ferro está contido na hemoglobina dos eritrócitos, enquanto em torno de 2–4 mg permanece na circulação e é utilizado para atender às necessidades diárias de ferro para apoiar a hematopoese e outras necessidades corporais. Aproximadamente 1–2 mg de ferro são fornecidos pela absorção dietética no duodeno, que é equilibrada por uma perda não regulada de 1–2 mg de ferro principalmente por meio das secreções corpóreas, descamação das células intestinais e epidérmicas e perda de sangue como no caso do sangramento menstrual. No entanto, em situações de sobrecarga, como o organismo não possui mecanismos específicos que regulem sua eliminação, o equilíbrio do ferro corporal necessita de especial comunicação entre os locais de absorção, utilização e estoque (DEV; BABITT, 2017; GROTTO, 2010).



Figura 2. Homeostase do ferro sistêmico (adaptado de DEV; BABBIT, 2017).

Esta comunicação é estabelecida principalmente pela hepcidina, um hormônio peptídico circulante, sintetizado pelos hepatócitos, e que em níveis aumentados reduz a absorção de ferro, enquanto em níveis diminuídos a aumenta, podendo levar à sobrecarga. Além disso, a interação da hepicidina com a ferroportina controla os níveis séricos de ferro nos enterócitos, hepatócitos e macrófagos. Com a formação do complexo hepcidina-ferroportina ocorre internalização daguela proteína assim como sua degradação, desta forma o ferro não é externalizado, depositando na forma de ferritina em hepatócitos e macrófagos (DUNN; RAHMANTO; RICHARDSON, 2007; GANZ, 2013; GROTTO, 2010). A expressão da hepcidina é regulada principalmente pelos níveis circulantes de ferro (excesso de ferro na circulação aumenta a expressão, enquanto a anemia e hipóxia diminuem). Além disso, estado inflamatório, transferrina saturada com ferro e vias ativadas pelas moléculas HFE, hemojuvelina e TfR2 também aumentam a expressão da hepcidina (GANZ, 2013; GROTTO, 2010). Assim, em situações fisiológicas, o organismo de forma sistêmica consegue manter a homeostase do ferro principalmente pela ação da hepcidina, conforme descrito na figura 1.

1.1.2 Sobrecarga de ferro

Apesar do importante papel do ferro na homeostase celular, desordens de origens primárias ou secundárias podem causar sobrecarga desse metal no organismo, ocasionando em depósitos de ferritina e/ou hemossiderina em vários tecidos (SIDDIQUE; KOWDLEY, 2012), incluindo fígado, baço, coração, artérias, cérebro e macrófagos (BERTOLI et al., 2018; DAY et al., 2003; JIANG et al., 2007; LEGSSYER et al., 2003; LOU et al., 2009; MA; ZHOU; XIE, 2012; MARQUES et al., 2015; RIBEIRO JÚNIOR et al., 2017), contribuindo para lesões importantes nesses sítios.

Como descrito anteriormente, diversas proteínas são responsáveis pela homeostase do ferro, e algumas mutações nos genes que as codificam, tais como HFE, TfR2, HJV, BMP6 e HAMP, levam a diferentes formas de hemocromatoses hereditárias (SIDDIQUE; KOWDLEY, 2012). A hemocromatose hereditária (HH) é uma desordem genética caracterizada pelo aumento da absorção de ferro intestinal que, na ausência de terapia adequada, leva a sobrecarga de ferro e lesão em muitos órgãos, com cirrose hepática, cardiomiopatia e arritmias, artropatia, diabetes, hipogonadismo e hiperpigmentação da pele (SANTOS et al., 2012; SANTOS; KRIEGER; PEREIRA, 2012). A HH relacionada ao gene HFE (HH tipo 1) ocorre em aproximadamente 80% dos casos de HH. A proteína codificada pelo gene relacionado à hemocromatose (HFE) normalmente participa de vias inibitórias para a absorção e disponibilização de ferro, compete com a transferrina (proteína transportadora de ferro) na ligação com seu receptor (TfR1), regulando a passagem deste íon para o citoplasma das células do organismo (EDISON; BAJEL; CHANDY, 2008), e ainda sinaliza o estímulo da expressão de hepcidina em situações de ferro sérico elevado (DARSHAN; ANDERSON, 2009). Dentre as HH não-HFE, destacam-se as do tipo 2, 3 e 4. A HH tipo 2 é mais rara, causada tanto por mutações no gene para a hemojuvelina (HJV, tipo 2A) quanto para a hepcidina (HAMP, tipo 2B). A HH tipo 3 é causada por mutações no gene codificador do receptor de transferrina 2, comprometendo assim como na HH tipo 1, o controle da expressão de hepcidina e a interação com transferrina na sinalização em elevações dos níveis de ferro. Já a HH tipo 4 é uma doença autossômica dominante, originada por mutações no gene codificador da ferroportina (SLC40A1), o que compromete a saída de ferro de células com enterócitos e macrófagos (SANTOS et al., 2012; SANTOS; KRIEGER; PEREIRA, 2012; SIDDIQUE; KOWDLEY, 2012).

A sobrecarga de ferro de origem secundária, assim como a sobrecarga de origem primária, tem alto índice de morbidade e mortalidade, levando a disfunção em vários órgãos, inclusive cardiomiopatias (BERDOUKAS et al., 2013; DANJOU et al., 2013; OLIVEIRA; ROCHA; FERNANDES, 2014; SIDDIQUE; KOWDLEY, 2012). As principais desordens de origem secundária responsáveis por sobrecarga de ferro são as desordens hematológicas: talassemia (maior e intermediária), anemias sideroblástica (adquiridas ou congênitas) e anemias diseritropoiéticas (deficiência de piruvato kinase, anemia perniciosa crônica, esferocitose herediária, anemia falciforme e síndrome mielodisblásica) (SIDDIQUE; KOWDLEY, 2012). A talassemia é a causa mais comum de hematopoese ineficiente e consequente sobrecarga de ferro secundária, tendo uma estimativa de incidência de 1:10000 pessoas sintomáticas na União Europeia e 1:100000 em todo o mundo (CAO; GALANELLO, 2010; SIDDIQUE; KOWDLEY, 2012). Apesar da presença das desordens hematológicas supracitadas em território nacional, não existem dados de incidência e prevalência de sobrecarga de ferro no Brasil, e sim estimativas indiretas, mediante os cálculos da população que requerem transfusões e, assim, poderão desenvolver sobrecarga de ferro (BRASIL, 2009, 2018). Muitas dessas doenças, especialmente a talassemia e síndrome mielodisblásica, demandam necessidade de múltiplas transfusões sanguíneas, o que pode agravar em sobrecarga de ferro ao longo do tempo secundária a transfusões, pois uma unidade de concentrado de hemácias contém entre 200-250 mg de ferro elementar (GATTERMANN, 2009; PIPPARD et al., 1979; SIDDIQUE; KOWDLEY, 2012). Nesse aspecto, vale ressaltar que a transfusão sanguínea crônica é a principal causa de sobrecarga de ferro, independente da doença de base (GATTERMANN, 2009). Assim como a transfusão sanguínea, a administração parenteral excessiva de ferro em pacientes com insuficiência renal de estágio terminal pode levar a sobrecarga desse metal no organismo, devido à inadequada atenção para as reservas de ferro e/ou inflamação sistêmica e aos altos valores administrados i.v. (100-1000mg), que excede a capacidade de transferrina livre e representa uma quantidade enorme em comparação a absorção intestinal (1-2 mg/dia) (SOOD et al., 2008; VAZIRI, 2014).

Além das desordens hematológicas, outras situações patológicas podem levar ao aumento da sobrecarga de ferro, como as doenças crônicas do fígado, principalmente hepatite (DI BISCEGLIE et al., 1992; SEBASTIANI et al., 2006) e aceruloplasminemia, uma doença recessiva autossômica ocorrida devido a mutação do gene de ceruloplasmina (HARRIS; KLOMP; GITLIN, 1998). As manifestações clínicas nas sobrecargas de ferro secundárias são semelhantes às descritas anteriormente para a HH, sendo mais brandas ou graves dependendo da origem da sobrecarga e dos órgãos acometidos (GATTERMANN, 2009).

Ademais, a ingestão acidental de ferro é um dos motivos de intoxicação por este metal, sendo importante causa de morbidade e mortalidade principalmente entre as crianças. Ocorre principalmente pela ingestão acidental de comprimidos contendo ferro em sua formulação, tal como o sulfato ferroso, prescritos a mulheres grávidas no pré-natal, e os diversos multivitamínicos prescritos a crianças. A ingestão acontece devido a múltiplos fatores, principalmente as características dos medicamentos, como a cor, revestimento com açúcar, semelhança a doces populares e a frequente associação dos multivitamínicos com personagens de desenhos animados, e também devido a incapacidade dos pais e do público em geral de reconhecer a toxicidade desses medicamentos (LINDQUIST, 1949; MADIWALE; LIEBELT, 2006).

A existência de testes de rastreio sensíveis e tratamentos relativamente eficazes, associada a significante morbidade e mortalidade em pacientes não tratados, têm levado à consideração de rastreio da população e formulação de diretrizes para o manejo da sobrecarga de ferro em todo o mundo, incluindo o Brasil, através da Portaria conjunta Nº 7/2018 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2018), que regulamenta protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas na sobrecarga de ferro em âmbito nacional. Segundo a diretriz nacional, para o diagnóstico é importante a avaliação de manifestações clinicas como as citadas acima e também exames laboratoriais como a saturação da transferrina (normal de 20– 50%) e ferritina sérica (normal: mulheres de 11–306,8 ng/ml e homens de 23,9–336,2 ng/ml), enquanto o tratamento envolve flebotomia e/ou uso de quelantes de ferro a depender da origem da sobrecarga e complicações clinicas apresentadas pelo paciente.

1.1.2.1 Efeito da sobrecarga de ferro em diferentes sistemas

A sobrecarga de ferro tem sido associada a muitos danos morfológicos e funcionais em diversos órgãos. A pigmentação marrom da pele em pacientes com sobrecarga de ferro é muito comum, e geralmente é um dos primeiros sinais

identificados nesses pacientes. Isso ocorre devido à melanina e à deposição de ferro na camada basal da epiderme e em torno de glândulas sudoríparas, sendo mais pronunciada nas regiões onde a pele é exposta ao sol, como face, pescoço, antebraço, dorso das mãos, pernas e velhas cicatrizes (CHEVRANT BRETON et al., 1977; SIDDIQUE; KOWDLEY, 2012). Além disso, também é comum a presença de atrofia cutânea, achatamento das unhas e perda dos pelos do corpo (SIDDIQUE; KOWDLEY, 2012).

Como o fígado é o primeiro órgão envolvido nos estoques de ferro é frequentemente acometido (SANTOS et al., 2012; SANTOS; KRIEGER; PEREIRA, 2012; SIDDIQUE; KOWDLEY, 2012). Pacientes assintomáticos podem apresentar aumento do fígado e elevados níveis de biomarcadores de lesão hepática (BACON; BRITTON, 1990; DI BISCEGLIE et al., 1992). Entre as pessoas com sobrecarga de ferro, embora a maioria, cerca de 40-100% dos pacientes desenvolvam significante deposição de ferro no fígado, apenas 10-25% progridem para fibrose hepática e 4-6% desenvolvem cirrose (OLYNYK et al., 1999). Essas condições dependem da duração da sobrecarga, de níveis de ferritina sérica maiores que 1000 µg/L e da presença de outros fatores de risco como hepatite C viral e consumo crônico de álcool (MORRISON et al., 2003). Além disso, a deposição hepática aumentada de ferro tem sido relacionados com a síndrome dismetabólica da sobrecarga de ferro, resultando em anormalidades metabólicas como hiperglicemia e resistência à insulina, dislipidemia, aumento do índice de massa corpórea, esteatose não-alcoólica e hepatite (BRITTON; SUBRAMANIAM; CRAWFORD, 2016; DEUGNIER; BARDOU-JACQUET; LAINÉ, 2017).

Disfunções no sistema endócrino também são comuns em pacientes com sobrecarga de ferro, principalmente a diabetes, prevalente em mais de 70% dos pacientes com cirrose (SIDDIQUE; KOWDLEY, 2012). Ocorre devido à diminuição da secreção de insulina em consequência ao acúmulo de ferro nas células beta do pâncreas ou devido ao aumento da resistência insulínica (HRAMIAK; FINEGOOD; ADAMS, 1997; MENDLER et al., 1999), favorecendo o surgimento de outras anormalidades metabólicas. Além disso, hipogonadismo pode ocorrer devido à disfunção no hipotálamo, hipófise ou gônadas (SIMINOSKI; D'COSTA; WALFISH, 1990), assim como a disfunção tireoidiana também pode estar presente, na forma de hipotireoidismo ou hipertireoidismo (EDWARDS et al., 1983). Ademais, um estudo do nosso grupo mostrou que o ferro, mesmo agudamente, já provoca anormalidade no

eixo hipotálamo-hipófise-gonadal associada ao estresse oxidativo em ratas (ROSSI et al., 2016).

Problemas orteoarticulares também têm sido encontrados em pacientes com sobrecarga de ferro. Na HH a osteoporose ocorre aproximadamente em 25% dos pacientes (VALENTI et al., 2009) e as artropatias estão presentes em 25-50% dos pacientes (HAMILTON et al., 1981; VALENTI et al., 2008).

Muitas das alterações supracitadas estão relacionadas, pelo menos em parte, aos efeitos nocivos do estresse oxidativo sobre sistemas biológicos, devido a capacidade oxidante e redutora do ferro no organismo de mamíferos (DEV; BABITT, 2017; GUDJONCIK et al., 2014). Esta relação entre ferro e estresse oxidativo tem sido demonstrada em muitos estudos clínicos e experimentais. Em humanos, tem sido descrito a presença de estresse oxidativo tanto na sobrecarga de ferro de origem primária, como na secundária (GAENZER et al., 2002; KUKONGVIRIYAPAN et al., 2008; VINCHI et al., 2019). Em roedores, vários estudos demostram estresse oxidativo no organismo de ratos submetidos à sobrecarga de ferro crônica (BERTOLI et al., 2018; KRAMER et al., 2012; LOU et al., 2009; MARQUES et al., 2015; RIBEIRO JÚNIOR et al., 2017) e aguda(ANDREU et al., 2009; ROSSI et al., 2016). Além disso, estresse oxidativo também tem sido identificado em camundongos submetidos a sobrecarga de ferro (DAVIS; BARTFAY, 2004; DAY et al., 2003; OUDIT et al., 2003, 2004; VINCHI et al., 2019), o que leva a danos importantes em diversos sistemas.

Por ser um metal de transição, possui alta capacidade de doar ou receber elétrons o que favorece o estresse oxidativo. Assim, a capacidade do ferro induzir a produção de espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs), não édevida somente aos efeitos do ferro sobre o organismo, e sim eventos gerais e inerentes ao próprio elemento químico. Sabidamente, o ferro é capaz de reagir com outras espécies químicas e ainda agir como catalisador de reações químicas que geram radicais livres, tais como as reações de Fenton e Haber-Weiss (BURKITT; MASON, 1991; BYLER et al., 2017; KEHRER, 2000; WARDMAN; CANDEIAS, 1996):

Reação de Fenton

 $Fe^{2+} + O_2 \leftrightarrow Fe^{3+} + O_2^{-}$ $2 O_2^{-} + 2H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O_2$ $Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH + OH^-$

Reação de Haber-Weiss

$$Fe^{3+} + O_2^{--} \leftrightarrow Fe^{2+} + O_2$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^-$$

$$O_2^{--} + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + OH + OH^-$$

Já é bem conhecido que o aumento da produção de EROs associado ao estresse oxidativo pode causar danos ao sistema cardiovascular, sendo um importante alvo terapêutico em estudos experimentais nas sobrecargas de ferro (KRAMER et al., 2012; OUDIT et al., 2004; SANGARTIT et al., 2016).

1.1.2.2 Efeito da sobrecarga de ferro sobre o sistema cardiovascular

As alterações cardiovasculares são complicações comuns na sobrecarga de ferro, sendo as cardiomiopatias fatores determinantes na sobrevida destes pacientes devido a sua associação com alta morbidade e mortalidade (MURPHY; OUDIT, 2010). Apesar das pesquisas do efeito de ferro sobre o coração terem início desde a década de 1960 (BUJA; ROBERTS, 1971; ENGLE; ERLANDSON; SMITH, 1964; LEON et al., 1979; SCHELLHAMMER; ENGLE; HAGSTROM, 1967), os mecanismos e vias envolvidas nas cardiomiopatias férricas não são completamente esclarecidas, sendo investigadas até os dias atuais (ÁVILA et al., 2016; KREMASTINOS; FARMAKIS, 2011; MURPHY; OUDIT, 2010).

A condição clinica mais importante que leva à cardiomiopatia por sobrecarga de ferro é a β-talassemia maior, sendo a insuficiência cardíaca responsável por maior número de mortes nesta doença (PENNELL et al., 2013). Além disso, também em pacientes com HH, o acumulo de ferro no coração leva à cardiomiopatia, arritmias e insuficiência cardíaca (DEMANT et al., 2007). Existem modelos experimentais descritos em que a sobrecarga de ferro no organismo animal igualmente induz toxicidade em vários sistemas, incluindo disfunção cardíaca com altas taxas de mortalidade, basicamente por aumento na geração de radicais livres e diminuição das vias antioxidantes endógenas (BARTFAY et al., 1999a, 1999b; BARTFAY; BARTFAY, 2000; DAY et al., 2003; OUDIT et al., 2003).

Em estudo experimental de sobrecarga de ferro em ratos, Kramer et al (2012) verificaram diminuição do trabalho cardíaco e do débito cardíaco e aumento da

pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (KRAMER et al., 2012). Em camundongos, espécie com maior número de estudos com sobrecarga de ferro e cardiomiopatia, são descritos aumento da mortalidade, bradicardia, hipotensão, disfunção sistólica e diastólica, aumento da fibrose miocárdica e estresse oxidativo (OUDIT et al., 2003, 2004) e as alterações da espessura do septo interventricular e da parede posterior ventricular durante a diástole são correlacionadas com concentração de ferro tecidual, que por sua vez dependem das doses acumulativas de ferro (MOON et al., 2011). Além disso, segundo Gao et al (2010), a disfunção mitocondrial pode explicar a cardiomiopatia crônica em camundongos com sobrecarga de ferro (GAO et al., 2010). Interessantemente, camundongos fêmeas possuem certa proteção contra a cardiomiopatia induzida por sobrecarga de ferro, provavelmente devido aos efeitos do hormônios sexuais ovarianos como supressores do estresse oxidativo (DAS et al., 2017). Considerando a importância do controle neural sobre o sistema cardiovascular, também foi identificado aumento do ganho barorreflexo em ratos com sobrecarga de ferro, sendo o mesmo normalizado após injeção de deferoxamina, e tanto a frequência cardíaca quando a variabilidade desta também foram diminuídas na sobrecarga de ferro (CARDOSO et al., 2005).

Como mencionado anteriormente, o acúmulo de ferro no coração pode resultar em cardiomiopatia (tanto restritiva e dilatadas), arritmias (disfunções do nodo sinusal e também fibrilação atrial) e até mesmo insuficiência cardíaca, sendo que morte súbita devido à essas causas podem ocorrer em pacientes com sobrecarga avançada de ferro. Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que o estresse oxidativo durante a sobrecarga de ferro exerce papel importante no sistema cardiovascular, particularmente na cardiomiopatia (ANDREU et al., 2009; CHENG; LIAN, 2013; KRAMER et al., 2012; LOU et al., 2009; MURPHY; OUDIT, 2010; OUDIT et al., 2003, 2004; PENNELL et al., 2013).

Enquanto os efeitos danosos sobre o coração tem sido o foco nas investigações desde os anos 1960, os impactos sobre a função vascular foram relativamente negligenciados. Somente cerca de 40 anos depois houve a primeira descrição na literatura de redução da vasodilatação dependente do fluxo em artéria braquial de uma mulher com hemocromatose idiopática, o que levantava a hipótese da relação entre a sobrecarga de ferro e a disfunção endotelial (LEKAKIS et al., 1999). A seguir, outros estudos clínicos mostraram prejuízos no relaxamento dependente do endotélio em pacientes com sobrecarga de ferro de origem primária ou secundária (GAENZER et

al., 2002; KUKONGVIRIYAPAN et al., 2008). Em estudo incluindo adultos com talassemia, ambos relaxamentos dependentes e independentes do endotélio foram prejudicados, evidenciando que tanto o músculo liso vascular, quanto as células endoteliais podem potencialmente ser danificados nas condições de sobrecarga de ferro (HAHALIS et al., 2008). Além dos achados clínicos, estudos experimentais em roedores têm demonstrado disfunção endotelial em diferentes tipos de artérias (BERTOLI et al., 2018; DAY et al., 2003; MARQUES et al., 2015; RIBEIRO JÚNIOR et al., 2017). Assim, os estudos citados previamente mostram relação entre sobrecarga de ferro e disfunção vascular, sendo um importante fenótipo a ser estudado.

1.2 REGULAÇÃO DO TÔNUS

O músculo liso vascular (MLV) tem importante função no controle da circulação sanguínea e resistência periférica, por meio do controle dos tônus arterial e venoso. A regulação do tônus é realizada pelos fatores derivados do endotélio, fatores mecânicos relacionados a pressão e fluxo sanguíneos, inervação autonômica e por substâncias circulantes e localmente produzidas. As células musculares lisas vasculares requerem um aumento na concentração de Ca²⁺ citoplasmático, para desencadear a sua contração. Este aumento pode resultar tanto do influxo do Ca²⁺ através de canais para Ca²⁺ dependentes de voltagem da membrana citoplasmática, quanto de liberação dos estoques intracelulares, como o retículo sarcoplasmático. Durante o relaxamento, o Ca²⁺ intracelular livre é bombeado para dentro do retículo sarcoplasmático, para fora da célula pela bomba de Ca²⁺ sarcolemal ou removido da célula pelo trocador Na/Ca²⁺ (HOROWITZ et al., 2017; LINCOLN; DEY; SELLAK, 2001; SALAMANCA, 2006; SOMLYO; SOMLYO, 2003; TOUYZ et al., 2018; WEBB et al., 2003).

A contração do MLV é mediada por dois mecanismos, o acoplamento eletromecânico e o acoplamento farmacomecânico (LINCOLN; DEY; SELLAK, 2001).

O acoplamento eletromecânico promove a contração através de modificações no potencial de membrana da célula. A despolarização da membrana promove influxo de Ca²⁺ por meio da abertura de canais para Ca²⁺ operados por voltagem, o Ca²⁺ interage com a calmodulina, que ativa a kinase da cadeia leve da miosina (MLCK). Esta por sua vez, catalisa a transferência do fosfato para as cabeças da miosina,

proporcionando a formação das pontes cruzadas com os filamentos de actina. A remoção do Ca²⁺ a partir do citosol e estimulação de fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP) iniciam o processo de relaxamento da musculatura lisa. Já a abertura de canais para K⁺ presentes na membrana das células musculares vasculares leva ao efluxo de K⁺, com aumento do potencial de membrana e consequente fechamento de canais para Ca²⁺ dependentes de voltagem e diminuição do influxo de Ca²⁺ para o interior da célula, causando o relaxamento. Já o fechamento de um canal para K⁺ causa um estado de despolarização, abertura de canais para Ca²⁺ dependentes de voltagem e consequentemente, aumento da concentração de Ca²⁺ intracelular e vasoconstrição (EDWARDS; WESTON, 1990; NELSON et al., 1995; NELSON; QUAYLE, 1995).

O acoplamento farmacomecânico baseia-se na contração induzida por agonistas contráteis, como a norepinefrina e a angiotensina II. Esses agonistas ligamse a receptores específicos da membrana da célula muscular lisa que são acoplados à proteína $G_{q11/12}$. A interação agonista-receptor ativa a subunidade α da proteína G, que por sua vez, ativa a fosfolipase C (PLC) levando à síntese de 1,4,5-trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 interage com seus receptores na membrana do retículo sarcoplasmático e estimula a liberação de Ca²⁺. O DAG ativa a proteína quinase C (PKC), que aumenta a mobilização de Ca2+ por meio de canais da membrana, além de aumentar a sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca²⁺, fosforilar a cadeia leve da miosina e inibir a MLCP, o que também resulta em contração do MLV (RINGVOLD; KHALIL, 2017; SOMLYO et al., 1999; SOMLYO; SOMLYO, 1998; WEBB et al., 2003). Outra via importante do acoplamento farmacomecânico é a ativação da RhoA/Rho kinase que, ao fosforilar a MLCP, inibe sua atividade e, assim, inibe a desfosforilação da cadeia leve da miosina o que mantém a geração de força, independente do nível de cálcio citosólico livre (BÜLBRING; TOMITA, 1987; GANITKEVICH V; ISENBERG, 1991; KIM et al., 2008; NUNES; RIGSBY; WEBB, 2010; SHIMOKAWA; SUNAMURA; SATOH, 2016; STULL et al., 1991; WEBB et al., 2003).

1.2.1 Endotélio e controle do tônus vascular

O endotélio vascular durante muito tempo foi considerado apenas uma barreira física passiva inerte, entre o sangue o MLV. Durante as décadas de 1970 e 1980

grandes avanços no conhecimento das funções das células endoteliais vasculares conduziram ao reconhecimento do seu papel central na homeostase vascular (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; MONCADA et al., 1977; PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987). Atualmente, é bem sabido que além de regular a angiogênese, inflamação, agregação plaquetária, adesão leucocitária, proliferação celular vascular e controle do estresse oxidativo (FÉLÉTOU; KÖHLER; VANHOUTTE, 2010; FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2009; HIGASHI, 2009; MONTEZANO; TOUYZ, 2012), é também fundamental no controle do tônus vascular por meio da liberação de vários fatores vasodilatadores ou vasoconstritores que, em condições fisiológicas, permanecem em equilíbrio.

1.2.1.1 Fatores vasodilatadores derivados do endotélio

Os principais fatores vasodilatadores são: óxido nítrico (NO), a prostaciclina (PGI₂) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; MONCADA et al., 1977; PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987). Furchgott e Zawadizk demonstraram em 1980 que a integridade do endotélio era essencial para a resposta vasodilatadora promovida pela acetilcolina, apontando como mediador dessa resposta, a liberação de então denominado fator relaxante derivado do endotélio (EDRF). Alguns anos depois, Palmer e colaboradores (1987) identificaram o EDRF como o NO.

O NO é o principal mediador do relaxamento vascular, um gás de meia vida curta e altamente difusível por membranas celulares, sintetizado pelo óxido nítrico sintase. Em condições fisiológicas sua síntese é estimula por meio de alterações do fluxo sanguíneo (estresse de cisalhamento), estiramento vascular e da estimulação de receptores de membrana por agonistas como acetilcolina, bradicinina, adenosina difosfato, substância P, entre outros (FÉLÉTOU; KÖHLER; VANHOUTTE, 2012; MONCADA; HIGGS, 2006; MONTEZANO; TOUYZ, 2012; VANHOUTTE et al., 2017). Essa produção é feita a partir da oxidação da L-arginina, que é transformada em NO e L-citrulina por ação da NO sintase (NOS) (PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987; VANHOUTTE et al., 2017). O NO ao se difundir pela célula vascular interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), alterando a conformação da enzima, ativando-a. Ocorre a seguir a catálise da saída de dois

grupamentos fosfatos da molécula de guanosina trifosfato (GTP), resultando na formação de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). O aumento de GMPc no MLV resulta em relaxamento destas células por meio de hiperpolarização por abertura de canais para K⁺ e diminuição da entrada de Ca²⁺, inibição da liberação de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático e aumento do sequestro de Ca²⁺ para o retículo sarcoplasmático (FÉLÉTOU; KÖHLER; VANHOUTTE, 2012; MONCADA; HIGGS, 2006; VANHOUTTE et al., 2017).

Desde 1977, Moncada e colaboradores já haviam identificado a PGI₂ como importante metabólito derivado do ácido araquidônico pela ação da ciclooxigenase em células endoteliais mediando papel relevante na agregação plaquetária e formação de trombos. Além disso, o acoplamento da PGI₂ com seu receptor de membrana acoplado a proteína G_s, localizado no MLV, ativa a adenilato ciclase e leva à produção de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). Isto leva ao estímulo da proteína kinase dependente de AMPc (PKA), que por fosforilação, é capaz de ativar canais para K⁺ hiperpolarizando o MLV reduzindo a entrada de Ca²⁺, estimulando a recaptação de Ca²⁺ para o retículo sarcoplasmático e inibir a MLCK, reduzindo a concentração do Ca²⁺ mioplasmático e contribuindo assim para o relaxamento vascular (FÉLÉTOU; HUANG; VANHOUTTE, 2011; FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006, 2009).

Como nem todo vasorelaxamento pode ser explicado pelo NO e a PGI₂, vários autores sugeriram a existência de mecanismo adicionais por meio de outros fatores vasodilatores produzidos pelo endotélio, que proveriam hiperpolarização do MLV (BÉNY; BRUNET, 1988; COWAN; COHEN, 1991; HASUNUMA et al., 1991). A identidade do EDHF ainda é desconhecida, e a hipótese vigente é a da existência de vários EDHFs que podem variar conforme o leito vascular e a condição fisiológica ou patológica. Independente do EDHF em questão, a hiperpolarização do MLV ocorre sem aumentos celulares de GMPc, e parece depender da participação ativa dos canais para K⁺ presentes no MLV (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006, 2009).

1.2.1.2 Fatores vasoconstritores derivados do endotélio

Dentre os fatores constritores, os principais são: endotelina-1 (ET-1), angiotensina II, prostaglandinas H₂ e $F_{2\alpha}$ (PGH₂ e PGF_{2\alpha}), tromboxano A₂ (TXA₂), e radicais livres derivados do oxigênio e nitrogênio tais como ânion superóxido (O₂⁻⁻), radical hidroxila ('OH) e peroxinitrito (LUSCHER, 1990; LUSCHER et al., 1992; STANKEVICIUS, E.; KEVELAITIS, E.; VAINORIUS, E.; SIMONSEN, 2003; VANE; ÄNGGÅRD; BOTTING, 1990).

As prostaglandinas H₂ e F_{2α} e o tromboxano A₂ são derivados da via de metabolismo do ácido araquidônico pela ciclooxigenase (AA-COX). A produção é regulada a partir da disponibilidade do ácido araquidônico, originado dos fosfolipídios de membrana, pela ação da enzima fosfolipase A₂. O ácido araquidônico pode ser metabolizado pela COX e convertido a prostaglandina H₂, que tem ação direta vasoconstritora e é precursora das demais prostaglandinas. As prostaglandinas e os tromboxanos estimulam a atividade contrátil MLV por meio do acoplamento com receptores específicos, e esta interação acarreta em aumento de Ca²⁺ intracelular e a maior sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca²⁺ (FÉLÉTOU; HUANG; VANHOUTTE, 2010, 2011; FÉLÉTOU; KÖHLER; VANHOUTTE, 2010).

Diferentes EROs estão relacionadas ao aumento do tônus vascular não só pelo seu efeito vasoconstrictor, mas também pelo seu efeito danoso sobre vias e moléculas vasodilatadoras. As EROs são metabólitos derivados da redução do oxigênio, e incluem os radicais livres e outras espécies que embora não possuam elétrons desemparelhados, são altamente instáveis e reativas. A formação das EROs é mediada por mitocôndrias e muitas enzimas no sistema cardiovascular, incluindo a NAD(P)H oxidase, xantina oxidase, mieloperoxidase, NO sintase desacoplada, isoenzimas do citocromo P450, lipooxigenase, COX, heme-oxigenase e glicose oxidase (CAI, 2005a; FÖRSTERMANN; XIA; LI, 2017; TANIYAMA; GRIENDLING, 2003).

Dentre as principais EROs de relevância vascular, destacam-se: o ânion superóxido (O_2^{--}), radical hidroxila ('OH), o peroxinitrito (ONOO⁻) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O O_2^{--} é um dos mais importantes radicais para a biologia vascular, o qual é formado pela redução univalente do oxigênio. Além de o O_2^{--} poder diretamente promover alterações na função vascular por ação direta ou diminuição da biodisponibilidade de NO, ele também é fundamental na produção de outras espécies reativas, por meio de sua dismutação pelas diferentes isoformas da enzima superóxido dismutase (SOD) e sua reação direta com o NO, originando H_2O_2 e ONOO⁻, respectivamente (CAI; HARRISON, 2000; FERRER-SUETA; RADI, 2009; TANIYAMA; GRIENDLING, 2003) (figura 3). O ONOO⁻, além de ser responsável pela diminuição o NO disponível, pode induzir danos vasculares diretos e ser protonado

para radical hydroperoxyl, que desempenha um papel importante na peroxidação lipídica e aterogênese (CAT et al., 2013).

Já os efeitos do H₂O₂ sobre o tônus vascular podem ser por diferentes mecanismos, a depender do sitio, concentração e condição experimental (CAI, 2005a; CSEKO, 2004; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 1998; THAKALI et al., 2006). Além disso, na presença do ferro, o H₂O₂ é componente essencial na reação de Fenton, que forma metabólitos secundários altamente reativos, tais como 'OH (CAI, 2005b; THAKALI et al., 2006; WARDMAN; CANDEIAS, 1996). A glutationa peroxidase e a catalase são as enzimas envolvidas na degradação do peróxido de hidrogênio. Enquanto a catalase transforma H₂O₂ em H₂O e O₂, a glutationa peroxidase utiliza o H₂O₂ para transformar a glutationa reduzida (GSH) em glutationa oxidada (GSSG) (CAI, 2005a).



Figura 3: Vias bioquímicas da geração e metabolismo de espécies reativas de oxigênio. O oxigênio reduz um ou dois elétrons (1 ou 2é) e da origem a ânion superóxido ($O_{2^{--}}$) ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2) respectivamente. A principal via de formação de H_2O_2 é através da dismutação do $O_{2^{--}}$ pela SOD (superóxido dismutase), enquanto a degradação de H_2O_2 ocorre através da catalase (CAT) intracelular e a glutationa peroxidase (Gpx) extracelular. H_2O_2 também, indiretamente, pode ser degradado em radical hidroxila (HO) na presença do Fe²⁺ (reação de Fenton) ou componente I (produto da oxidação do H_2O_2 por enzimas contendoFe3⁺ com a mieloperoxidase, MPO). O $O_{2^{--}}$ pode também reagir com o NO⁻ diminuindo a biodisponibilidade de NO⁻ independente da regulação da NO sintase (CAI, 2005b).

1.3 EFEITOS DO FERRO SOBRE O ENDOTÉLIO VASCULAR

É sabido que as EROs diminuem a biodisponibilidade de NO, promovendo disfunção endotelial e levando à adesão e agregação plaquetária (IRANI, 2000; MONTEZANO; TOUYZ, 2012). De fato, Day et al. (2003) propuseram que aumento de EROs esteja também envolvida na disfunção endotelial em camundongos com sobrecarga de ferro. Em humanos, por sua vez, foi identificado estresse oxidativo em combinação com prejuízo do relaxamento dependente do endotélio em condições de sobrecarga de ferro de origem primária e secundária (GAENZER et al., 2002; KUKONGVIRIYAPAN et al., 2008). Em estudo incluindo jovens adultos com talassemia, a disfunção endotelial foi associada a marcadores inflamatórios e apoptóticos, assim como início precoce da aterosclerose dependente de transfusões (HAHALIS et al., 2008). Além disso, estudos prévios do nosso laboratório mostraram que na presença da sobrecarga de ferro existe uma relação entre disfunção endotelial, estresse oxidativo e diminuição da produção de NO, tanto em vasos de condutância (MARQUES et al., 2015), como de resistência (BERTOLI et al., 2018; RIBEIRO JÚNIOR et al., 2017). Ademais, um estudo recente mostrou a presença de estresse oxidativo, apoptose e marcadores inflamatórios em células endoteliais de humanos com HH e em camundongos geneticamente modificados para desenvolvimento de HH do tipo IV (VINCHI et al., 2019). Dessa maneira, seria compreensível que o ferro, por promover disfunção endotelial e aumentar a peroxidação lipídica via estresse oxidativo poderia promover a formação de placa aterosclerótica.

1.4 ATEROSCLEROSE

A aterosclerose é uma doença inflamatória de origem multifatorial, caracterizada por gradual acumulo de lipídios, células inflamatórias e matriz extracelular no espaço subendotelial (BÄCK et al., 2019; ROSS, 1999; TABAS; GARCÍA-CARDEÑA; OWENS, 2015). Apesar do importante papel da hipercolesterolemia, as causas da aterosclerose vão muito além (ROSS, 1999), tendo uma importante influência da disfunção endotelial (GIMBRONE; GARCÍA-CARDEÑA, 2016; TABAS; GARCÍA-CARDEÑA; OWENS, 2015) e do estresse oxidativo em sua progressão (FÖRSTERMANN; XIA; LI, 2017). As lesões ateroscleróticas ocorrem
principalmente em artérias elásticas e musculares de tamanho grande ou médio e em regiões de arcos e bifurcações, onde o fluxo sanguíneo é turbilhonar e favorece o estresse de cisalhamento sobre a parede vascular, o que está associada ao estresse oxidativo e diminuição da produção de óxido nítrico (FÖRSTERMANN; XIA; LI, 2017; ROSS, 1999).

A fisiopatologia da aterosclerose envolve muitas alterações morfofuncionais no organismo, e pode ser estimulada por diversos fatores, como tabagismo, dislipidemia, hipertensão e diabetes mellitus (FÖRSTERMANN; XIA; LI, 2017). Conforme demonstrado na figura 4, a disfunção endotelial tem importante contribuição para o desenvolvimento da placa de ateroma (GIMBRONE; GARCÍA-CARDEÑA, 2016), pois ao aumentar a permeabilidade da camada íntima permite que lipoproteínas plasmáticas se acumulem no espaço subendotelial, e quanto maior o nível de lipoproteínas plasmáticas, maior será o seu acúmulo (PAOLETTI, 2004). Ao ser aprisionado, a LDL é oxidada por espécies reativas do oxigênio produzidas por enzimas como a NAD(P)H oxidase, presentes no endotélio, musculo liso vascular e macrófagos (FÖRSTERMANN; XIA; LI, 2017). A seguir, a LDL oxidada leva a liberação de fosfolipídios que estimulam a expressão de moléculas de adesão leucocitária (molécula de adesão celular vascular- VCAM-1, molécula de adesão intercelular- ICAM-1 e E-selectina) na superfície endotelial que são responsáveis pela atração de monócitos e linfócitos para a parede arterial (HANSSON, 2005). Ao migrar para o tecido, os monócitos se diferenciam em macrófagos, que por sua vez captam as LDL oxidadas, formando as células espumosas que são os principais componentes da lesão inicial (HANSSON, 2005). Várias moléculas endógenas e microbianas podem ligar-se aos receptores do tipo Toll (TLR) presentes nos macrófagos, induzindo ativação e levando à liberação de citocinas inflamatórias, quimiocinas, espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio, e outras moléculas inflamatórias, que potencializam a inflamação e estimulam a proliferação e a migração de células musculares lisas da camada média para intima (HANSSON, 2005). Por sua vez, as células musculares lisas passam a produzir citocinas, fatores de crescimento e matriz extracelular que fará parte da capa fibrótica da placa de ateroma. Além disso, as citocinas produzidas pelos macrófagos também estimulam enzimas proteolíticas e a apoptose celular, o que pode tornar a placa mais instável e susceptível a ruptura e ao processo de aterotrombose (HANSSON, 2005).



Figura 4. Desenvolvimento de uma lesão aterosclerótica. A progressão de uma lesão aterosclerótica é mostrada de forma simplificada, desenvolvendo-se a partir de um vaso sanguíneo normal (à esquerda) para um vaso com uma placa aterosclerótica e trombo sobreposto (extrema direita). Alvos potenciais para imagens moleculares em cada estágio também são listados. AHA, American Heart Association; ICAM1, molécula de adesão intercelular 1; LDL, lipoproteína de baixa densidade; MMP, metaloproteinase de matriz; VCAM1, molécula vascular de adesão celular 1. (Adaptada de SANZ; FAYA, 2008).

Apesar dos avanços nos conhecimentos sobre aterosclerose, formas de prevenção e tratamento, atualmente ainda está associada ao desenvolvimento das doenças cardiovasculares como as doenças isquêmicas cardíacas e os acidentes vasculares encefálicos, as principais causas de morte em todo o mundo (WHO, 2018).

Devido a relevância clínica da aterosclerose muitos modelos experimentais em animais têm sido utilizados para melhor compreensão do processo aterosclerótico, suas complicações e intervenções terapêuticas, como é o caso do camundongo homozigótico nocaute para o gene da apolipoproteína E (apoE^{-/-}), que foi o primeiro camundongo geneticamente modificado para estudo da aterosclerose, desenvolvido em 1992 (LEE et al., 2017; PIEDRAHITA et al., 1992; PLUMP et al., 1992). Para o desenvolvimento do modelo o gene que codifica a apoE foi inativado em células troncos embrionárias por meio de recombinação homóloga (PIEDRAHITA et al., 1992; PLUMP et al., 1992). Como a apoE medeia a ligação de alta afinidade com os receptores das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), é responsável pela captação celular dessas partículas e em sua ausência, as partículas lipídicas se acumulam no plasma intensificando a hipercolesterolemia (KOLOVOU et al., 2008; MAHLEY, 1988; MAHLEY; JI, 1999). A acentuada hipercolesterolemia e aterosclerose espontânea desenvolvida por estes animais é uma vantagem, pois assim é possível evitar as dietas altamente tóxicas (LEE et al., 2017). Além disso, dependendo do gênero e idade, também apresentam disfunção do endotélio vascular associada em diversos territórios (MEYRELLES et al., 2011). Ademais, camundongos apoE^{-/-} fêmeas desenvolvem disfunção endotelial e formação de placa de ateroma precoce em comparação aos machos (MEYRELLES et al., 2011), sendo um modelo interessante para estudar as relações entre sobrecarga de ferro, dano endotelial e aterosclerose.

1.4.1 Ferro e aterosclerose

Para referência aos danos vasculares induzidos por sobrecarga de ferro, incluindo seus efeitos ateroscleróticos, tem sido utilizado o termo "hipótese do ferro". Sua capacidade aterogênica tem sido defendida por muitos autores e questionada por outros que até demonstram redução da aterosclerose nas condições de carga de ferro (VINCHI et al., 2014; XU, 2019). Em revisão bibliográfica, Muñoz-Bravo et al. (2013) descreveram que entre os 55 principais estudos epidemiológicos envolvendo a "hipótese do ferro", 27 apoiaram, 20 não encontraram evidências e 8 foram contra a hipótese do ferro, evidenciando a disparidade dos achados (MUÑOZ-BRAVO et al., 2013).

Marcadores precoces da aterosclerose tem sido descritos em condições de sobrecarga de ferro, por exemplo em camundongos submetidos ao ferro cronicamente a resposta trombótica foi acelerada em artérias carótidas (DAY et al., 2003), assim como a espessura da íntima e média da carótida em humanos talassêmicos (ADLY et al., 2015; HAHALIS et al., 2008). Estudos demonstram que a espessura da camada íntima e média da artéria carótida é um marcador precoce da aterosclerose, e é associada com a administração anual de ferro, com níveis séricos de ferritina e marcadores de dano oxidante na doença renal de estado terminal (BISHU; AGARWAL, 2006; DRÜEKE et al., 2002; REIS et al., 2005).

Em humanos, estudos mostram que o ferro está presente em placas de ateroma e é associado ao estresse oxidativo local, mesmo na ausência de sobrecarga de ferro (MICHEL et al., 2011; PANG et al., 1996; SMITH et al., 1992; SWAIN; GUTTERIDGE, 1995). Além disso, os níveis de colesterol nas lesões ateroscleróticas também estão correlacionados com os depósitos de ferro (STADLER; LINDNER; DAVIES, 2004). Interessantemente, a ferritina sérica foi associada a aterosclerose carotídea em mulheres e homens de meia idade aparentemente saudáveis (AHLUWALIA et al., 2010). Já em indivíduos com sobrecarga de ferro primária ou secundária muitos estudos trazem fortes evidências entre ferro e aterogênese, apesar de haver ideias contrárias (MUÑOZ-BRAVO et al., 2013; VINCHI et al., 2014).

Similar aos estudos clínicos, em estudos experimentais também não há um consenso comum entre a sobrecarga de ferro e a aterosclerose. Por exemplo, em camundongos de uma mesma linhagem (apoE^{-/-}) foram encontrados resultados diferentes na progressão da aterosclerose (sem alteração, diminuição ou aumento) em animais submetidos ao ferro cronicamente por diferentes vias (KAUTZ et al., 2013; KIRK; HEINECKE; LEBOEUF, 2001; XIE et al., 2008), sendo necessário novos estudos para o esclarecimento e melhor compreensão desta temática.

1.5 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Como já mencionado, a sobrecarga de ferro é responsável por significante morbidade e mortalidade por complicações cardiovasculares (CHENG; LIAN, 2013; PENNELL et al., 2013; SIDDIQUE; KOWDLEY, 2012). Assim, é importante o conhecimento de como o ferro poderia promover esses danos, especialmente as vias e os mecanismos relacionados. Além disso, os estudos envolvendo ferro e o sistema cardiovascular têm dado uma maior ênfase para as cardiomiopatias (KREMASTINOS; FARMAKIS, 2011; MURPHY; OUDIT, 2010) e apenas nas últimas décadas uma maior atenção tem sido dada ao estudo da vasculatura.

Estudos atuais do nosso laboratório mostram que a sobrecarga de ferro provoca disfunção endotelial em diferentes tipos de artérias (BERTOLI et al., 2018; MARQUES et al., 2015; RIBEIRO JÚNIOR et al., 2017), o que poderia favorecer o desenvolvimento de doenças vasculares inflamatórias. Além disso, apesar de muitas pesquisas abordarem a "hipótese do ferro", ainda não está claro se o ferro, de fato, é

ou não maléfico para o sistema vascular, pois muitas pesquisas possuem resultados favoráveis e contrários a esta hipótese (MUÑOZ-BRAVO et al., 2013; VINCHI et al., 2014). Apesar do conhecimento atual envolvendo tanto os níveis de ferro circulantes quanto seu depósito no tecido vascular e a aterogênese, ainda não se sabe se a sobrecarga de ferro secundária, per se, pode potencializar a disfunção vascular e a aterosclerose em indivíduos geneticamente susceptíveis ao desenvolvimento da doença. Além disso, as vias e mecanismos de como o ferro poderia influenciar no processo aterogênico ainda não estão completamente esclarecidas, principalmente a respeito da relação entre ferro, função/disfunção vascular e aterosclerose.

Como existe uma interação dinâmica entre a função endotelial e a aterosclerose, e ambas podem ser influenciadas pelo estresse oxidativo, propomos que a disfunção endotelial poderia ser um mecanismo potencial pelo qual a sobrecarga de ferro intensifica a aterosclerose em vez de gerá-la, aumentando assim o risco de eventos cardiovasculares. No presente estudo, testamos a hipótese de que a sobrecarga crônica de ferro intensifica o processo aterosclerótico associado a disfunção endotelial em camundongos nocautes para apoE.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre o processo aterosclerótico e a função vascular em aorta de camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar nosso fenótipo da sobrecarga de ferro em camundongos C57BL/6J e apoE^{-/-}, por meio do ferro sérico, deposição tecidual e estresse oxidativo.
- Avaliar os efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre a função hepática e lipidemia em camundongos.
- Mensurar alterações ponderais e biométricas em camundongos submetidos a sobrecarga crônica de ferro.
- Verificar os efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre o infiltrado celular e desenvolvimento de placa aterosclerótica em arco aórtico de camundongos.
- Analisar a morfologia endotelial em aortas de camundongos submetidos a sobrecarga crônica de ferro.
- Avaliar os efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre a reatividade vascular da aorta analisada *in vitro*, assim como testar os impactos sobre a modulação endotelial, estresse oxidativo e papel da COX;
- Quantificar a produção *in situ* de NO em aorta de camundongos apoE^{-/-} após sobrecarga de ferro;
- Quantificar metabólitos da prostaciclina e do tromboxano A₂ na urina de camundongos apoE^{-/-} após sobrecarga de ferro;
- Mensurar a atividade da SOD e catalase na aorta de camundongos apoE^{-/-} após sobrecarga de ferro;
- Avaliar o conteúdo proteico da COX-2 em aorta de camundongos apoE^{-/-} após sobrecarga de ferro.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Os experimentos foram conduzidos em fêmeas adultas (5 meses de idade, 22-25g) de camundongos nocautes para apolipoproteína E (apoE^{-/-}) com fundo genético C57BL/6J, e os respectivos selvagens (C57), produzidos pelo Laboratório de Fisiologia Translacional da UFES. Foi previamente demonstrado que camundongos apoE^{-/-} fêmeas desenvolvem, espontaneamente, hipercolesterolemia e aterosclerose nessa idade, mesmo sem dieta rica em gordura (MEYRELLES et al., 2011). Durante o tratamento os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (3 indivíduos por gaiola) sob condições de temperatura, umidade e ventilação controladas, com livre acesso a água e ração padrão para roedores (não hipercolesterolêmica) e submetidos a um ciclo de claro e escuro de 12/12 horas. As camas foram trocadas 3 vezes por semana, assim como as caixas devidamente limpas. Toda a manipulação dos animais foi feita com uso de máscara, luvas, gorros e jalecos, por se tratarem de animais geneticamente modificados e mais suscetíveis a patógenos.

Todos os experimentos foram realizados de acordo com os protocolos aprovados pela CEUA-UFES (Prot. Nº 86/2015), e com os princípios éticos da pesquisa com animais estabelecidos pela SBCAL e pela Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (CONCEA, 2016).

3.1.1 Protocolo de sobrecarga crônica com ferro

Os animais de cada linhagem foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: C57 controle (C57 Ct, n=22); C57 com sobrecarga crônica de ferro (C57 Fe, n=21); apoE^{-/-} controle (apoE^{-/-} Ct, n=26); e apoE^{-/-} com ferro crônico (apoE^{-/-} Fe, n=27). O modelo de sobrecarga de ferro foi realizado conforme descrito anteriormente (GAO et al., 2010; LIN et al., 2013): injeções intraperitoneais diárias de ferro-dextrano 10% P/V (Ferrodex®, Fabiani Ltda, São Paulo, Brasil) na dose de 10 mg/camundongo, 5 dias/semana durante 4 semanas, enquanto grupo controle recebeu solução salina

isotônica por igual período e mesmo regime de execução do grupo Fe. As análises foram feitas durante e após 4 semanas de exposição crônica ao metal. Após o término da sobrecarga crônica de ferro, os animais foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg i.p.) e xilazina (10 mg/kg i.p.). Após a confirmação da anestesia geral por meio de arreflexia, os camundongos foram eutanasiados por exsanguinação, e órgãos e amostras de sangue e a aorta foram retirados para as análises descritas a seguir.

3.1.2 Avaliação ponderal e biométrica

No início e ao final do tratamento os camundongos foram pesados para verificar se a sobrecarga de ferro influência no ganho de peso corporal. Para avaliar possíveis alterações sobre o crescimento ósseo, após eutanásia a tíbia foi dissecada e seu comprimento medido com paquímetro. Além disso, foram removidos cirurgicamente e pesados em balança de precisão o fígado e as gorduras: peritoneal, retroperitoneal, retroabdominal, mesentérica e perirrenal. Os pesos dos órgãos foram representados tanto em valores absolutos (mg), como também normalizados pelo peso do próprio animal (mg/g).

3.1.3 Mensuração do colesterol e ferro sérico

Amostras de sangue foram coletadas e alíquotas de soro foram separadas por centrifugação a 1400 G e armazenadas a –80 °C até o dia da análise. A concentração sérica de ferro foi mensurada em duplicata pelo método colorimétrico de Goodwin modificado com o uso de kit colorimétrico comercial (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil). O ferro foi liberado da transferrina em meio ácido (ácido succínico) e reduzido ao seu estado ferroso pela ação da hidroxilamina. Posteriormente, ele reagiu com ferrozina levando à formação de um complexo violáceo medido a 540 nm e expresso em µg/dL.

Já o colesterol foi determinado pelo método colorimétrico enzimático (COD-PAP). Os ésteres de colesterol são biotransformados em cromógeno cereja pela adição da lipoproteína lipase, colesterol oxidase e peroxidase, e a intensidade da cor cereja formada é diretamente proporcional à concentração de colesterol na amostra, mensurado a 540nm e expresso em mg/dL.

3.1.4 Atividade sérica das transaminases hepáticas

As atividades da transaminase oxalacética (TGO) e transaminase pirúvica (TGP) séricas foram avaliadas pelo método de Reitmmamm e Frankel, com o uso de Kit colorimétrico comercial (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil).

A TGO catalisa a transferência do grupo Amino de um Alfa-Aminoácido para um Alfa-Cetoácido:



O Oxalacetato reage com a Dinitrofenilhidrazina. A intensidade de coloração da Hidrazona formada, em meio alcalino, é diretamente proporcional à quantidade de Oxalacetato, em determinado tempo, que por sua vez é função da atividade enzimática da TGO.

Já a TGP catalisa a transferência do agrupamento Amino de um Alfa-Aminoácido (L-Alanina + Alfa-cetoglutamato) para um Alfa-Cetoácido (L-Glutamato+ Piruvato).



O Piruvato reage com a dinitrofenilhidrazina. A intensidade de coloração da hidrazona formada, em meio alcalino, é diretamente proporcional à quantidade de piruvato, em determinado tempo, que, por sua vez, é em função da atividade enzimática da TGP.

3.1.5 Avaliação do estresse oxidativo sistêmico

O malondialdeído (MDA) foi mensurado no soro utilizando um método colorimétrico previamente descrito (RIBEIRO et al., 2013) para estimar as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, que são produtos da peroxidação lipídica que aumentam em consequência do estresse oxidativo. Os radicais livres reagem com os ácidos graxos poli-insaturados da membrana celular e lipoproteínas, transformando-os em ácidos graxos peroxidados os quais sofrem redução de sua cadeia lateral liberando MDA, de maneira que sua concentração sérica é proporcional à quantidade

de ácidos graxos poli-insaturados oxidados e, portanto, um indicador de peroxidação lipídica. O plasma previamente coletado foi misturado ao ácido tricloroacético (20%) em 0,6 M HCI (1:1 vol/vol) e mantidos em gelo por 20 minutos para precipitar seus componentes e evitar possíveis interferências. As amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 1500 G antes de adicionar o ácido tiobarbitúrico (120 mM em Tris 260 mM, pH 7) ao sobrenadante numa proporção de 1:5 (v/v). Após, a mistura foi aquecida a 97°C por 30 minutos. A medida foi realizada através da absorbância usando a comprimento de onda de 540 nm.

Além disso, o protocolo de ensaio de produtos proteicos de oxidação avançada (AOPP) foi utilizado para avaliar a oxidação de proteínas no soro, sendo outro marcador de estresse oxidativo sistêmico (ZOVICO et al., 2016). Em placa de Elisa foram pipetados: 160 µL de PBS seguidos de 10 µL de iodeto de potássio (KI) e 40 µL da amostra do soro. Após o termino da primeira etapa do protocolo foram adicionados 20 µL de ácido acético glacial (ultrapuro) e em seguida a placa foi submetida a agitação por 6 minutos. Imediatamente ao processo de agitação a leitura da placa foi realizado com o comprimento de onda de 340 nm. A curva padrão para quantificar os níveis de AOPP foi feita com o uso de cloramina-T (0 a 100 µM). Todas as amostras foram feitas em duplicata e o resultado final foi expresso em µmol de cloramina-T.

3.1.6 Análise da placa aterosclerótica e depósito de ferro no arco aórtico

Imediatamente após a eutanásia, os arcos aórticos foram cuidadosamente isolados e dissecados, e foram imersos e fixados em formalina (solução de formol a 4%, tamponada) ou Karnovsky (1% paraformaldeído + 3% glutaraldeído em tampão cacodilato 0,07M, pH 7,4), por, no mínimo, 24h. Após a fixação, os arcos foram imersos em tampão Krebs-HEPES (em mM: 130 NaCl, 5,6 KCl, 2 CaCl₂, 0,24 MgCl₂, 8,3 HEPES e 11 glicose, pH 7,4) com 30% de sacarose por uma hora, em seguida, incorporado no meio de inclusão para criostato (Killik ®, Easy Path). As secções do arco aórtico foram cortadas em criostato a 10 µm de espessura e transferidas para lâminas gelatinizadas, e foram congeladas -20°C até o momento do protocolo.

No dia do protocolo, as lâminas foram mantidas em estufa a 37ºC por uma hora para retirada do meio de inclusão e fixadas na lâmina com acetona gelada. Os

depósitos de ferro no tecido foram visualizados em secções do arco aórtico coradas com azul da Prússia (método de Mallory) e a placa aterosclerótica foi marcada com coloração com *Oil-Red-O*. Para contagem de células nas placas, o azul de toluidina foi usado para corar os núcleos. Cortes histológicos foram examinados com microscópio óptico Leica DM 2500 acoplado a uma câmera para aquisição de imagens Leica DFC 310 FX.

3.1.7 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada por métodos previamente descritos (FRIQUES et al., 2015). Após fixação da aorta em Karnovsky (1% paraformaldeído + 3% glutareldeído em tampão cacodilato 0,07M, pH 7,4) por 24h, e pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio a 1%, ferrocianeto de potássio a 1,25% e tampão cacodilato a 0,2 mol/L (solução B) por 1 h, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato (0,1 mol/L) e água ultrapura. A seguir, os segmentos da aorta torácica foram seccionados através de cortes longitudinais, desidratados em graus ascendentes de etanol e submetidas ao ponto crítico com CO₂ líquido. As amostras foram montadas em pulverizadores catódicos revestidos com 10 nm de ouro puro e examinados usando um microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JEM6610 LV, Jeol Inc., EUA). Para cada espécime, quatro fotomicrografias foram tomadas aleatoriamente em aumento de 2000×.

3.1.8 Protocolo para estudos da reatividade vascular em aortas

Para estudar a reatividade vascular em segmentos de artéria aorta, foi utilizado o método previamente descrito (MULVANY; HALPERN, 1977). Após eutanásia do animal, a aorta torácica foi cuidadosamente dissecada e limpa de tecido conectivo. Conforme mostrado em esquema na figura 5, para as experiências de reatividade, a aorta torácica foi dividida em segmentos de 2 mm de comprimento com o auxílio de um microscópio para dissecção. Dois fios de tungstênio (40 µm de diâmetro) foram inseridos no lúmen das artérias e montados em um miógrafo para estudos de tensão isométrica (Danish Myo Tech, Modelo 410A e 610M, JP-Trading I/S, Aarhus,

Dinamarca). Um dos fios foi acoplado a um transdutor de tensão e o outro a um micrômetro que permite o estiramento das artérias. Esse miógrafo, por sua vez, foi conectado a um sistema para aquisição (Powerlab/800 ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Austrália) de dados e este a um computador.

Posteriormente, as artérias foram estabilizadas por um período de 30 minutos em solução de Krebs-Henseleit, gaseificada com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2 , pH 7,4) e mantida à temperatura de 37° C. Transcorrida a estabilização, as artérias foram estiradas a uma tensão de repouso considerada ótima em relação ao seu diâmetro interno. Para isso, em cada segmento arterial a relação tensão/diâmetro interno foi calculada e a circunferência interna correspondente a uma pressão transmural de 100 mmHg para um vaso relaxado *in situ* (L₁₀₀) foi determinada (MULVANY; HALPERN, 1977). Para a realização dos experimentos, as artérias foram mantidas com uma circunferência interna L₁, calculado como L₁ = 0,90 x L₁₀₀, circunferência na qual o desenvolvimento de força é máximo (MULVANY; HALPERN, 1977).



Figura 5: Esquema representativo da preparação experimental dos anéis de artéria aorta para a realização de estudos de reatividade vascular *in vitro.* (Adaptado de NUNES et al., 2018).

3.1.8.1 Avaliação da integridade do músculo liso vascular

Após o período de estabilização em sua tensão de estiramento ideal, foi administrado ao banho solução de Krebs contendo KCI 120 mM para verificar a atividade contrátil do músculo liso vascular induzida por despolarização. Ao atingir o platô nos registros de tensão máxima, num período de 30 minutos, a solução com alta concentração de KCI foi trocada por solução de Krebs-Henseleit por três vezes e mantidas em período de estabilização para continuidade das avaliações (figura 6).



Figura 6: Registro com curva do teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCI (cloreto de potássio).

3.1.8.2 Avaliação do relaxamento dependente e independente do endotélio

Com intuito de verificar se sobrecarga crônica de ferro altera a função endotelial, esta foi avaliada por meio do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico acetilcolina (ACh). Para tal, os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina suficiente para atingir 50% da contração produzida pela solução de Krebs-Henseleit com KCl 120 mM, e então, o relaxamento foi obtido por exposição a uma curva concentração-resposta à ACh (10⁻¹⁰ a 3×10⁻⁴M) (figura 7). Já o relaxamento independente do endotélio, foi avaliado por exposição a uma curva concentração resposta de sódio (10⁻¹⁰ a 3×10⁻⁴M), após atingir o platô da curva concentração resposta à fenilefrina (figura 7).

3.1.8.3 Avaliação da resposta vasoconstritora à fenilefrina

Após a avaliação da integridade do músculo liso e do endotélio, concentrações crescentes de fenilefrina (10⁻¹⁰ a 3×10⁻⁴ M) foram aplicadas ao banho, a fim de verificar

se a sobrecarga crônica de ferro afeta a responsividade vascular constritora ao agonista α₁ adrenérgico. Com a finalidade de estudar as vias e mecanismos envolvidos, diferentes fármacos foram incubados 30 minutos antes da realização das curvas concentração resposta à fenilefrina (figura 7).

Para avaliar a participação do óxido nítrico (NO) na resposta contrátil à fenilefrina, os anéis de aorta foram incubados com um inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o N G -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 μ M). Já em relação a participação dos prostanóides derivados da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta contrátil à fenilefrina, os anéis foram incubados com indometacina (10 μ M), inibidor não específico da ciclooxigenase. Além disso, para avaliar a participação das espécies reativas de oxigênio (EROs) na resposta vasoconstritora foi utilizado tiron (1mM), varredor não seletivo de EROs.



Figura 7: Esquema representativo dos protocolos das curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh), fenilefrina (PE) e nitroprussiato de sódio (NPS) (adaptado de BATISTA, 2014 e NUNES, 2018).

3.1.9 Avaliação in situ da produção de óxido nítrico vascular

A produção de NO foi determinada usando a 4,5-diaminufluoresceína (DAF-2), de acordo com método comumente descrito (MARQUES et al., 2015). Após isolamento e dissecção, as aortas foram imersas em solução tampão de Krebs-HEPES (em mM: 130 NaCl, 5,6 KCl, 2 CaCl₂, 0,24 MgCl₂, 8,3 HEPES, e 11 glicose, pH 7.4) com 30% de sacarose durante uma hora. A seguir, foram embebidas em meio de inclusão para cortes com criostato (Killik ®, Easy Path) e mantidas em −80°C até o momento de realização dos cortes.

As secções de aorta foram cortadas em criostato a 10 µm de espessura e transferidas para lâminas gelatinizadas, congeladas até o momento do protocolo com DAF-2. As lâminas foram mantidas em estufa a 37°C por uma hora para retirar o meio de inclusão. A seguir as secções de aorta foram incubadas a 37°C em idênticas condições ao protocolo de reatividade vascular durante 30 min com tampão fosfato (0,1 M) contendo CaCl₂ (0,45 mM) e fenilefrina (10⁻⁴ M) na ausência e na presença do L-NAME (100 µM) para avaliar com maior especificidade a fluorescência dependente da síntese de NO. As lâminas foram secadas e incubadas durante 30 min a 37°C em câmara úmida protegida da luz com 8 µM de DAF diluído em solução tampão fosfato contendo CaCl₂ contendo fenilefrina (10⁻⁴ M). Imagens digitais foram coletadas no microscópio de fluorescência Leica DM 2500 e câmera Leica DFC 310 X, usando a mesma configuração de imagem para os diferentes grupos. Para quantificação, 5 segmentos da aorta por animal foram utilizados para obter a média amostral. A densidade de fluorescência média foi calculada usando o *software Image J*.

3.1.10 Atividade de enzimas antioxidantes na aorta

Proteínas de aortas homogeneizadas foram usadas para medir a atividade de enzimas antioxidantes. A atividade enzimática da catalase foi avaliada pelo decaimento da absorbância após a adição de H₂O₂, que ocorre por meio da enzima catalase. Durante o protocolo, 50 μ L de amostra e 5 μ L de triton a 10% foram pipetados em microtubo, agitados em vórtex e mantidos por 15 minutos em gelo para liberar a catalase. 240 μ L de tampão fosfato pH 7,0 (10 mM) foram então adicionados a cada poço da placa de Elisa e o espectro foi zerado. Em seguida, em duplicata, 10 μ L de amostra e 240 μ L de meio foram pipetados com H₂O₂ (temperatura ambiente) e aguardados dois minutos para leitura a 240 nm por 30 minutos, com leitura a cada 30 segundos.

Já a atividade da superóxido dismutase (SOD), foi avaliada com um método que é baseado na inibição da auto-oxidação da adrenalina pela SOD. A adrenalina, quando adicionada ao meio básico, reage com o ânion superóxido e forma o adrenocromo, que exibe absorção máxima a 480 nm. Assim, quanto menor a absorbância do adrenocromo, maior a capacidade da SOD de desmutar o ânion superóxido e inibir a reação de auto-oxidação, refletindo sua atividade por um método indireto. Para este fim, 190 μ L de tampão de glicina e 10 μ L de amostra foi adicionado e o espectro foi zerado. Depois, 5 μ L de adrenalina foram pipetados em cada poço, imediatamente lidos a 480 nm por 10 minutos, a cada 40 segundos.

3.1.11 Expressão proteica da COX-2 na aorta

A técnica de Western Blotting foi utilizada para determinar a influência da sobrecarga de ferro sobre o conteúdo proteico da COX-2 em aortas de animais apoE-¹. Para extração das proteínas, os segmentos aórticos foram homogeneizados por trituração em banho de gelo com solução contendo: Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); NaVO₃ (1 mM); SDS, 1%; DTT (0,5 mM); EDTA (5 mM, pH 8); PMSF (1 mM); NaF (10 mM) e Inibidor de protease. Depois de homogeneizadas as amostras foram centrifugadas (Eppendorf-NeitheirHinz, Gmbh22331, Alemanha) a 4°C com 3825 G, durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e o precipitado descartado. Em seguida, foi feita a quantificação das proteínas pelo método Lowry (PETERSON, 1977). Posteriormente, foi calculado o volume necessário para uma carga de 80 µg de proteína, sendo este volume de amostra misturado, em partes iguais, com tampão de homogeneização. A seguir, as proteínas foram separadas por SDS-PAGE a 10% e subsequentemente transferidas para membranas de nitrocelulose que foram expostas ao anticorpo monoclonal primário anti-COX-2 (1: 1000, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA). Depois de lavadas, as membranas foram incubadas com anticorpo antiimunoglobulina de camundongo conjugado a peroxidase de rábano (1: 5000; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Depois de lavados cuidadosamente, os imunocomplexos foram detectados usando um sistema de quimioluminescência de peroxidase/luminol melhorado (ECL Plus; GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) e a imunodetecção foi realizada usando o sistema ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA). Os sinais no "immunoblot" foram quantificados usando o programa de computador ImageJ. A mesma membrana foi utilizada para determinar a expressão de α-actina (1: 20.000, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os dados da expressão proteica são expressos como a razão entre os sinais na imunotransferência correspondente à proteína e α -actina estudadas.

3.1.12 Medição de metabólitos do tromboxano A2 e da prostaciclina na urina

O nível de 11-deydro tromboxano B₂ (TXB₂) e dos metabólitos da prostaciclina (PGIM) na urina coletada por 24 horas, por meio da gaiola metabólica, foram quantificados usando um kit competitivo de imunoensaio enzimático para estimar a produção sistêmica de TXA₂ e PGI₂, respectivamente. Todas as medidas dos metabólitos dos prostanóides urinários foram normalizadas pelo conteúdo de creatinina na mesma amostra. Os kits TXB₂ (Nº 519510) e PGIM (Nº 501100) foram adquiridos da Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EUA) e creatinina obtida da Bioclin (Belo Horizonte, MG, Brasil).

3.2 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

As respostas vasoconstritoras induzidas pela fenilefrina foram expressas como força normalizada pelo dobro do tamanho do anel (mN/mm). As respostas vasodilatadoras são expressas como uma porcentagem da contração prévia. Para cada curva concentração-resposta, o efeito máximo (Rmáx) e a concentração de agonista que produziu metade da Rmáx (EC50) foram calculados usando análise de regressão não linear com uma construção sigmoide de inclinação variável. A sensibilidade dos agonistas foi expressa como pD2 (-log EC50). Para comparar os efeitos da incubação de fármacos nas respostas contráteis à fenilefrina, os resultados foram expressos como diferença entre as áreas sob as curvas concentração-resposta (dASC) com e sem incubação. Para a expressão da proteína COX-2, os dados são expressos como a razão da expressão da α-actina. Todos os dados foram previamente submetidos ao teste para avaliação da distribuição normal Shapiro-Wilk. Os resultados são expressos como médias ± EPM do número de camundongos indicados; para dados com distribuição normal as diferenças foram analisadas usando o teste t de Student ou ANOVA duas vias seguido pelo pós-teste de Fisher para comparações múltiplas. Já para dados com distribuição não normal (não-gaussiana) foi utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney. Para todas as inferências, considerou-se significância quando p<0,05. A análise estatística e a construção do gráfico foram realizadas usando o GraphPad Prism versão 6.0 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

3.3 FÁRMACOS E REAGENTES UTILIZADOS

- > 4,5-Diaminufluoresceína (Sigma)
- Acetilcolina, cloridrato (Sigma)
- Ácido aminoacético (Glicina) (Sigma)
- Ácido clorídrico (Sigma)
- Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Merck)
- Albumina bovina (Sigma)
- Anticorpo anti-COX2 (Cayman)
- > Anticorpo anti- α -actina (Sigma)
- > Anticorpos secundários conjugados com peroxidase (Sigma)
- Azul de toluidina (Dinâmica)
- Bicarbonato de sódio (Vetec)
- Cloreto de Ca²⁺ dihidratado (Merck)
- Cloreto de potássio (Merck)
- Cloreto de sódio (Merck)
- Dihidroetídio (Sigma)
- Dodecilsulfato de sódio (SDS) (Sigma)
- Eosina (Dinâmica)
- Epinefrina (SIGMA)
- Ferrocianeto de potássio (Neon)
- > Fosfato de potássio monobásico (Merck)
- Glicose (Merck)
- Heparina sódica (Cristália)
- ➢ HEPES (SIGMA)
- Hidróxido de sódio (Sigma)
- Indometacina (Purifarma)
- Leite desnatado (Nestle)
- L-Fenilefrina, hidrocloridrato (Sigma)
- L-NAME (Sigma)
- Metanol (Sigma)
- > N,N, N',N'- Tetrametil-etilenodiamina (Temed) (Sigma)
- > N,N'- Metilenbisacrilamida 40% Solução 37, 5:1 (Acrilamida) (Sigma)
- Nitroprussiato de sódio dihidratado (Fluka)

- N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Sigma)
- Peróxido de hidrogênio (Sigma)
- Persulfato de amônio (APS) (Sigma)
- Polioxietileno sorbitam monolaurato (Tween 20) (Sigma)
- Reagente para detecção de Western Blot (ECL Prime) (Amersham)
- Sulfato de magnésio heptahidratado (Merk)
- Tiron (Sigma)
- ➤ Tris HCl (Sigma)

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada, exceto indometacina preparada em solução TRIS/bicarbonato de sódio, e mantidas no congelador à -20°C (fármacos), a 4°C na geladeira (soluções de Krebs) e temperatura ambiente (anestésico e corantes para histologia). Os kits utilizados para ensaios colorimétricos estão indicados na descrição dos respectivos métodos.

4RESULTADOS

4.1 EFEITOS DA SOBRECARGA CRÔNICA DE FERRO SOBRE OS PARÂMETROS PONDERAIS, BIOMÉTRICOS E SÉRICOS

Ao final do tratamento, todos os animais injetados com ferro apresentaram um fenótipo característico de modelos experimentais de sobrecarga crônica, como hiperpigmentação da pele e órgãos internos, aumento do peso do fígado e elevação do ferro sérico e biomarcadores de lesão hepática (TGO e TGP), sem diferença significativa entre as linhagens (tabela 1 e figura 8). O peso corporal aumentou significativamente na sobrecarga de ferro, sem alterar o crescimento ósseo (tabela 1). Além disso, o ferro foi capaz de reduzir o peso do tecido adiposo branco de diversas gorduras corporais (tabela 1).

	C57		apoE ^{-/-}	
	Controle	Ferro	Controle	Ferro
Peso final (g)	24,7±0,3 (22)	25,4± 0,3 (21)*	23,9± 0,3 (16)	24,9± 0,3 (26)*
Tíbia (mm)	17,0±0,1 (9)	17,2±0,1 (8)	17,1±0,2 (15)	17,3±0,1 (8)
Fígado (mg)	1.360±27 (18)	3.645±113 (17)*	1.232±46 (7)	3.437±156 (19)*
Fígado (mg/g)	55,5±1,1 (18)	145,3±2,5 (17)*	50,1±1 (7)	136,9±5,1 (19)*
Gorduras:				
Peritoneal (mg)	212±47 (7)	113±16 (9)*	238±47 (9)	120±8 (19)*
Peritoneal (mg/g)	8,6±1,8 (7)	5,2±0,3 (9)*	9,5±1,8 (9)	4,5±0,4 (19)*
Retroperitoneal (mg)	65±8 (7)	29±4 (8)*	88±15 (9)	21±2 (18)*
Retroperitoneal (mg/g)	2,6±0,3 (7)	1,1±0,1 (8)*	3,6±0,6 (9)	1,0±0,2 (18)*
Retroabdominal (mg)	139±30 (8)	122±18 (9)	221±33 (8)	117±8 (17)*
Retroabdominal (mg/g)	5,8±0,7 (8)	4,8±0,5 (9)	8,9±1,2 (8)	4,98±0,4 (17)*
Mesentérica (mg)	247±21 (8)	152±9 (8)*	217±27 (9)	130±11 (19)*
Mesentérica (mg/g)	10,1±0,8 (8)	6,1±0,4 (8)*	8,8±0,9 (9)	5,2±0,5 (19)*
Perirrenal (mg/g)	76±8 (6)	48±3 (7)*	64±9 (9)	39±3 (16)*
Perirrenal (mg/g)	3,1±0,3 (6)	1,9±0,1 (7)*	2,6±0,3 (9)	1,6±0,1 (16)*

Tabela 1. Parâmetros ponderais e biométricos de camundongos injetados com ferro

Valores são expressos em médias ± EPM. *P<0.05 ferro vs. controle da mesma linhagem, pelo uso da ANOVA duas vias seguido do pós-teste de Fisher. O número de animais é indicado entre parênteses.

Como mostrado na figura 8 B, os camundongos apoE^{-/-} Ct apresentaram colesterol total elevado em comparação aos C57 Ct. Ademais, a sobrecarga crônica de ferro potencializou a hipercolesterolemia dos animais apoE^{-/-} Fe comparado aos apoE^{-/-} Ct (figura 8 B). Esse comprometimento no perfil lipêmico da linhagem apoE^{-/-} foi associado ao estresse oxidativo sistêmico: tanto os níveis séricos de MDA quanto de AOPP, indicativos de peroxidação lipídica e oxidação proteica respectivamente, foram aumentados pelo tratamento com ferro em ambas as linhagens, mas em maior magnitude no grupo apoE^{-/-} Fe (figura 8 E e F).



Figura 8. Parâmetros séricos de camundongos injetados com ferro. TGO: transaminase glutâmico oxalacética; TGP: transaminase glutâmica-pirúvica; MDA: malondialdeído; AOPP: produtos proteicos de oxidação avançada; C57: camundongos selvagens. Os valores são expressos como média ± EPM. *P<0,05 Fe vs. Ct dentro da mesma linhagem e #P<0,05 apoE^{-/-} vs. C57 dentro da mesma condição experimental, usando ANOVA duas vias e pós-teste de Fisher. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses.

4.2 EFEITOS DA SOBRECARGA CRÔNICA DE FERRO SOBRE O PROCESSO ATEROSCLERÓTICO

Após os protocolos de sobrecarga de ferro, foi verificado por meio da coloração com *"Oil-Red-O"* a ausência ou presença de placa aterosclerótica no arco aórtico, assim como o seu percentual de ocupação da área do lúmen. Conforme esperado, os grupos das linhagens C57 não apresentaram placa aterosclerótica. Da mesma forma, não houve aterosclerose em aortas do grupo C57 Fe. No entanto, o grupo apoE^{-/-} Ct apresentou placas ateroscleróticas de tamanho pequeno a moderado, e a sobrecarga de ferro aumentou significativamente o tamanho das placas em camundongos apoE^{-/-} (figura 9 A-B).



Figura 9. Aumento da placa aterosclerótica e depósitos de ferro no arco aórtico de camundongos apoE^{-/-} após sobrecarga de ferro. Em A, secções do arco aórtico representando deposição de lipídios (coloração amarronzada) demonstrada pela coloração *Oil-Red-O*. Em B, gráfico de barras demonstrando análise quantitativa da extensão da placa, como porcentagem da luz do vaso. Depósitos de ferro (em azul) são visualizados por coloração azul da Prússia (C). Em D, gráfico de barras demonstrando análise quantitativa dos depósitos de ferro, como porcentagem da área. Secções do arco aórtico representativas dos grupos controle (Ct) e ferro (Fe), nas linhagens selvagem (C57) e apoE^{-/-}. Aumento original ×100. Os dados são expressos como média ± EPM. *P<0,05 Fe vs. Ct dentro da mesma linhagem e #P <0,05 apoE^{-/-} vs. C57 dentro da mesma condição experimental, usando o teste *t* não pareado de Student. Número amostral de 4-6 por grupo.

A sobrecarga de ferro cursou com deposição de ferro na parede da aorta de ambas as linhagens, porém em maior intensidade nos camundongos ateroscleróticos (figura 9 C e D). Além disso, na placa de ateroma do grupo apoE^{-/-} Fe foram encontrados significantes depósitos de ferro (figura 9 C e D), associados ao aumento do infiltrado celular (figura 10).



Figura 10. Efeitos da sobrecarga crônica de ferro no infiltrado celular dentro da placa aterosclerótica de camundongos apoE^{-/-}. Em A, secções do arco aórtico representando a coloração com azul de toluidina nas placas. Em B, gráfico de barras demonstrando análise quantitativa de células dentro das placas. As secções do arco aórtico são representativas dos grupos controle (Ct) e ferro (Fe), nas linhagens selvagem (C57) e apoE^{-/-}. Aumento original × 200. Os dados são expressos como média ± EPM. *P<0,05 apoE^{-/-} Fe vs. apoE^{-/-} Ct pelo teste *t* não pareado de Student. Número amostral de 3 por grupo.

4.3 EFEITOS DA SOBRECARGA CRÔNICA DE FERRO SOBRE A MORFOLOGIA DA SUPERFICIE ENDOTELIAL EM AORTA

Usamos microscopia eletrônica de varredura para avaliar a superfície das células endoteliais. Como mostrado na figura 11, as eletromicrografias das aortas torácicas de camundongos C57 Ct mostraram um endotélio regular e confluente. No entanto, no grupo C57 Fe foi possível identificar o início da lesão estrutural na camada luminal superficial (ruptura da superfície endotelial com aparecimento de vacúolos superficiais ou bolhas). Além das mudanças observadas no grupo C57 Fe, no grupo apoE^{-/-} Ct também houve dano notável na regularidade e confluência endotelial. No grupo apoE^{-/-} Fe, além das alterações já citadas, a presença de vários leucócitos

aderidos à superfície endotelial caracterizou um dano mais severo induzido pelo ferro nessa linhagem.



Figura 11. Efeitos da sobrecarga crônica de ferro na arquitetura da superfície endotelial. Microscopia eletrônica de varredura mostrando estrutura endotelial representativa de aortas dos grupos controle (Ct) e sobrecarga de ferro (Fe), nas linhagens selvagem (C57) e apoE^{-/-}. Barra de escala de 10 μm. Seta longa: célula endotelial; seta curta: vacúolos ou "bolhas"; cabeça de seta: dano na regularidade e confluência endotelial; seta pontilhada: leucócitos.

4.4 EFEITOS DA SOBRECARGA CRÔNICA DE FERRO SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR EM AORTA

Além da análise estrutural do endotélio, utilizamos protocolos de reatividade vascular *in vitro* para avaliar o grau de alteração funcional induzido pela sobrecarga de ferro em ambas as linhagens. Como observado na figura 12B, a resposta de relaxamento independente do endotélio ao nitroprussiato de sódio (doador de óxido nítrico) foi semelhante entre os grupos. Além disso, embora os grupos C57 Fe e apoE⁻^{/-} tenham apresentado alterações morfológicas na superfície das células endoteliais, o relaxamento dependente do endotélio pela ação da acetilcolina foi significativamente

prejudicado apenas no grupo apoE^{-/-} Fe (figura 12 A e tabela suplementar 1). Esses dados sugerem que apesar do ferro não alterar o relaxamento dependente do endotélio em animais C57, o mesmo parece acelerar a disfunção endotelial na linhagem apoE^{-/-}.



Figura 12. Efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre o relaxamento vascular em aorta. Curvas concentração-resposta à acetilcolina (A) e ao nitroprussiato de sódio (B) foram construídas em anéis aórticos das linhagens selvagem (C57) e apoE^{-/-}, nos grupos controle (Ct) e com sobrecarga de ferro (Fe). ACh: acetilcolina, NPS: nitroprussiato de sódio. Os dados são expressos como média ± EPM. *P<0,05 e **P<0,01 apoE^{-/-} Fe vs. apoE^{-/-} Ct, pela ANOVA duas vias seguida do pós-teste de Fisher. O número de animais é indicado entre parênteses.

Com a finalidade de verificar a capacidade contrátil das artérias utilizadas, após procedimento de normalização os anéis foram expostos a uma solução com alta concentração de KCI (120 mM) para conduzir ao estímulo despolarizante. A sobrecarga de ferro aumentou a resposta contrátil ao KCI (C57 Ct: 3,26±0,22 mN/mm, n=9; C57 Fe: 3,70±0,14 mN/mm, n=8; apoE^{-/-} Ct: 3,31±0,10 mN/mm, n=9; apoE^{-/-} Fe: 4,07±0,18 mN/mm, n=9; P<0,05). No entanto, a sobrecarga de ferro aumentou significativamente a resposta contrátil à fenilefrina (agonista α_1 adrenérgico) apenas na linhagem apoE^{-/-} (figura 13 e tabela suplementar 2). Esses dados sugerem que o ferro é capaz de alterar a modulação da resposta contrátil à fenilefrina em animais ateroscleróticos, que associada à disfunção do relaxamento à acetilcolina são fortes marcadores de lesão endotelial.



Figura 13. Efeitos da sobrecarga crônica de ferro na reatividade vascular à fenilefrina. Curva concentração-resposta à fenilefrina (PE) foram construídas em anéis aórticos das linhagens selvagem (C57) (A) e apoE^{-/-} (B), nos grupos controle (Ct) e com sobrecarga de ferro (Fe). Os dados são expressos como média ± EPM. *P<0,05 apoE^{-/-} Fe vs. apoE^{-/-} Ct, pela ANOVA duas vias seguida do pós-teste de Fisher. O número de animais é indicado entre parênteses.

4.4.1 Mecanismos envolvidos nas alterações de reatividade vascular à fenilefrina em aortas após sobrecarga de ferro

Os resultados apresentados anteriormente mostraram que sobrecarga crônica de ferro foi capaz de prejudicar o relaxamento dependente do endotélio e de aumentar a resposta contrátil à fenilefrina em aorta dos animais ateroscleróticos submetidos a sobrecarga de ferro. Assim, para verificar a influência dos fatores endoteliais na resposta à fenilefrina, investigamos algumas vias de agentes vasoativos derivados do endotélio.

4.4.1.1 Participação do óxido nítrico na modulação da resposta contrátil à fenilefrina

Para avaliar se a sobrecarga de ferro alterou a participação do óxido nítrico (NO) na resposta contrátil à fenilefrina, utilizou-se L-NAME (100 μ M), um inibidor não seletivo da NO sintase. O L-NAME foi capaz de provocar aumento na contração à fenilefrina nas artérias de ambos os grupos (figura 14 A e B e tabela suplementar 2), porém em menor magnitude no grupo apoE^{-/-} Fe (figura 14 C).



Figura 14. Efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre a modulação nitrérgica na reatividade vascular à fenilefrina. Curva concentração-resposta à fenilefrina (PE) foram construídas em anéis aórticos das linhagens selvagem (C57) e apoE^{-/-}, nos grupos controle (Ct) e com sobrecarga de ferro (Fe). A magnitude dos efeitos foi mensurada através das diferenças da área sob a curva (dASC), com e sem pré-incubação com 100 μ M de L-NAME (A e B). Os dados são expressos como média ± EPM. *P<0,05 apoE^{-/-} Fe vs. apoE^{-/-} Ct, pela ANOVA duas vias seguida do pós-teste de Fisher. O número de animais é indicado entre parênteses.

Como a modulação reduzida do NO na reatividade vascular à fenilefrina foi observada apenas no grupo apoE^{-/-} Fe, a avaliação da produção *in situ* e/ou biodisponibilidade do NO através de sonda fluorescente (NO sensível) foi restrita aos anéis aórticos dos grupos da linhagem apoE^{-/-}. Corroborando os dados funcionais, a fluorescência sensível ao NO foi reduzida no grupo apoE^{-/-} Fe, e o L-NAME foi capaz de reduzir a fluorescência no apoE^{-/-} Ct, mas não na apoE^{-/-} Fe, indicando diminuição da produção e/ou biodisponibilidade de NO (figura 15).



Figura 15. Detecção *in situ* do NO em segmentos aórticos de camundongos ateroscleróticos. Em A, fotomicrografias de fluorescência representam secções aórticas na presença da sonda fluorescente sensível ao NO 4,5-diaminuflureceim (DAF-2) de camundongos apoE^{-/-} controle (Ct) e submetidos à sobrecarga de ferro (Fe). A especificidade do método foi avaliada pela incubação das aortas com L-NAME (LN, 100 µM). Em B, gráfico de barras demonstrando a análise semiquantitativa. Os dados são expressos como média ± EPM da densidade de fluorescência. *P<0,05 indica efeito significativo da incubação do LN apenas no apoE^{-/-} Ct, pela ANOVA duas vias seguida pelo pós-teste de Fisher. O número de animais foi de 4-6 por grupo.

4.4.1.2 Participação dos prostanóides sintetizados pela COX na resposta contrátil à fenilefrina

Para investigar a influência da COX na vasoconstrição induzida pela fenilefrina na sobrecarga crônica de ferro, aortas foram submetidas a incubação com a indometacina (10 µM). A incubação com indometacina diminuiu a reatividade vascular à fenilefrina nos 4 grupos (figura 16 A e B e tabela suplementar 2), porém em maior magnitude no grupo apoE^{-/-} Fe (figura 16 C).



Figura 16. Papel da COX nos efeitos da sobrecarga de ferro crônica sobre a reatividade vascular da aorta. Curvas concentração-resposta à fenilefrina (PE) foram construídas com ou sem pré-incubação com indometacina 10 µM em aorta de camundongos dos grupos controle (Ct) e injetados com ferro (Fe), nas linhagens C57 (A) e apoE^{-/-} (B). A magnitude dos efeitos foi mensurada através das diferenças da área sob a curva (dASC), com e sem pré-incubação (C). Os dados são expressos como média ± EPM. *P<0,05 apoE^{-/-} Fe vs. apoE^{-/-} Ct, pela ANOVA duas vias seguida do pós-teste de Fisher. O número de animais é indicado entre parênteses.

Como a indometacina atenuou a vasoconstrição à fenilefrina em maior magnitude apenas na linhagem apoE^{-/-} submetida a sobrecarga de ferro, a expressão da COX e seus metabólitos foram mensuradas somente nesta linhagem. Como mostrado na figura 17 A e B, a quantidade de metabólitos da prostaciclina e do tromboxano A₂ aumentaram significativamente na urina de camundongos apoE^{-/-} Fe. Corroborando, um aumento da expressão proteica da COX-2 foi encontrado em aortas de apoE^{-/-} Fe em comparação ao grupo apoE^{-/-} Ct (Figura 17 C).



Figura 17. Efeitos da sobrecarga de ferro na expressão da COX-2 e produção de prostanóides. Os metabólitos da prostaciclina (A) e do tromboxano A₂ (B) foram mensurados em amostras de urina, enquanto a expressão da COX-2 em aorta de camundongos apoE^{-/-} controle (Ct) e submetidos a sobrecarga de ferro (Fe). Os dados são expressos como média \pm EPM. **P<0,01 apoE^{-/-} Fe vs. apoE^{-/-} Ct, pelo teste *t* não pareado de Student e \$ P<0,05 pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. O número de animais é indicado entre parênteses.

4.4.1.3 Participação do estresse oxidativo na resposta contrátil à fenilefrina

Para avaliar o papel do estresse oxidativo na sobrecarga de ferro, anéis de aorta foram incubados com tiron (1mM), "varredor" de EROs. Como mostrado na figura 18, a prévia incubação com tiron reduziu a resposta contrátil à fenilefrina somente no grupo apoE^{-/-} Fe, restaurando a reatividade vascular a valores similares ao grupo controle de sua linhagem (apoE^{-/-} Ct).



Figura 18. Papel do estresse oxidativo nos efeitos da sobrecarga de ferro crônica sobre a reatividade vascular da aorta. Curvas concentração-resposta à fenilefrina (PE) foram construídas com ou sem préincubação com tiron 1 mM em aorta de camundongos dos grupos controle (Ct) e injetados com ferro (Fe), nas linhagens C57 (A) e apoE^{-/-} (B). A magnitude dos efeitos foi mensurada através das diferenças da área sob a curva (dASC), com e sem pré-incubação (C). Os dados são expressos como média ± EPM. *P<0,05 apoE^{-/-} Fe vs. apoE^{-/-} Ct, pela ANOVA duas vias seguida do pós-teste de Fisher. O número de animais é indicado entre parênteses.

Como a sobrecarga de ferro foi capaz de aumentar os níveis séricos de MDA e AOPP em maior magnitude na linhagem apoE^{-/-} e devido ao fato do tiron ("varredor" de EROs) ter atenuado a vasoconstrição à fenilefrina apenas no grupo apoE^{-/-} Fe, os ensaios de atividade das enzimas antioxidantes foram realizados apenas na linhagem aterosclerótica. Como demonstrado na figura 19, a atividade das enzimas catalase e SOD diminuíram na aorta do grupo apoE^{-/-} Fe em comparação com o apoE^{-/-} Ct.



Figura 19. Efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre atividade antioxidante local. As atividades da superóxido dismutase (A) e catalase (B) foram medidas na aorta de camundongos apo $E^{-/-}$ controle (Ct) e submetidos a sobrecarga de ferro (Fe). Os dados são expressos como média ± EPM. **P<0,01 apo $E^{-/-}$ Fe vs. apo $E^{-/-}$ Ct, pelo teste *t* não pareado de Student. O número de animais é indicado entre parênteses.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram investigados os efeitos da sobrecarga crônica de ferro na função, estrutura endotelial e aterogênese nos camundongos apoE^{-/-}. A sobrecarga de ferro foi capaz de intensificar a aterosclerose associada as alterações endoteliais estruturais/funcionais em camundongos apoE^{-/-}. Os danos encontrados foram acompanhados de estresse oxidativo, redução na atividade de enzimas antioxidantes, diminuição da biodisponibilidade de NO e aumento na produção da prostanóides derivados da COX.

Independentemente da linhagem, todos os animais do nosso estudo que foram injetados com ferro-dextrano apresentaram elevação dos níveis séricos de ferro e hiperpigmentação da pele e órgãos internos, características fenotípicas da sobrecarga de ferro semelhante a outros estudos que utilizaram o mesmo esquema de tratamento (GAO et al., 2010; LEKAKIS et al., 1999; LIN et al., 2013; MOON et al., 2011), confirmando assim nosso modelo experimental.

Apesar da diminuição do peso da gordura, ao fim da sobrecarga de ferro os animais apresentaram maior peso corporal, sem alteração no crescimento ósseo. Provavelmente, isto se deve ao aumento do peso do fígado, o que corrobora estudos anteriores em modelos de roedores (LEGSSYER et al., 2003; LOU et al., 2009; OUDIT et al., 2004). A respeito disso, sabe-se que o ferro, quando em situações de sobrecarga, estimula a liberação de hepcidina pelos hepatócitos, hormônio capaz de internalizar e degradar a ferroportina (DUNN; RAHMANTO; RICHARDSON, 2007; GANZ, 2013; GROTTO, 2010; KAUTZ et al., 2013), assim inibindo o efluxo de ferro e contribuindo para o aumento da deposição hepática de ferro, o que pode estar contribuindo para o aumento do tamanho e peso deste órgão.

É descrito que, dependendo do sexo e da idade, camundongos apoE^{-/-} podem desenvolver hipercolesterolemia e aterosclerose de forma espontânea (MEYRELLES et al., 2011). De fato, em nosso estudo o grupo apoE^{-/-} teve um aumento no colesterol total (6,1 vezes). Interessantemente, a administração de ferro foi capaz de potencializar a hipercolesterolemia em camundongos apoE^{-/-} (1,7 vezes), mas sem alterações significativas nos animais C57. Nesse sentido, já é bem conhecido que a sobrecarga de ferro pode estar associada à lesão hepática (BACON; BRITTON, 1990; LOU et al., 2009) e, de fato, os marcadores séricos de dano hepático TGO e TGP, assim como o peso do fígado, aumentaram em ambas as linhagens em que injetamos

ferro-dextrano. Dessa maneira, poderíamos especular que a combinação do estado colesterolêmico alterado devido à deficiência de apoE^{-,-} com o dano hepático decorrente da sobrecarga de ferro intensificaram a hipercolesterolemia nos camundongos nocautes, e também podem estar relacionados com o aumento do peso do fígado, devido a possibilidade da presença de outras complicações como hepatite, esteatose, fibrose ou até mesmo cirrose e insuficiência hepática, problemas comuns em indivíduos como sobrecarga de ferro (SIDDIQUE; KOWDLEY, 2012) e que podem influenciar no peso do órgão. Além disso, como os marcadores séricos do estresse oxidativo MDA e AOPP também foram elevados pelo tratamento com ferro, e em maior magnitude nos camundongos apoE^{-/-}, sugere-se também uma possível contribuição do estresse oxidativo para a hipercolesterolemia exacerbada. Na verdade, a capacidade da sobrecarga crônica de ferro também aumentar a biossíntese do colesterol tem sido descrita em outros estudos com roedores, e parece estar relacionada a alterações gênicas no metabolismo lipídico e, como propomos, ao estresse oxidativo hepático (GRAHAM et al., 2010; SILVA et al., 2015). Não obstante, o dano hepático provocado pela sobrecarga de ferro tem sido associado a importantes alterações no metabolismo não só caracterizada por dislipidemia, mas também por peroxidação lipídica elevada, hiperglicemia e resistência insulínica, dando origem assim a síndrome dismetabólica da sobrecarga de ferro (BRITTON; SUBRAMANIAM; CRAWFORD, 2016; DEUGNIER; BARDOU-JACQUET; LAINE, 2017; MELI et al., 2013). Embora não tenhamos avaliado o metabolismo glicídico em nossos animais, diferentes estudos clínicos relacionam a hiperinsulinemia compensatória a hiperglicemia com aumento da lipogênese hepática, síntese de colesterol e redução do catabolismo de ácidos graxos livres (ANSTEE; TARGHER; DAY, 2013; BRITTON; SUBRAMANIAM; CRAWFORD, 2016; DEUGNIER; BARDOU-JACQUET; LAINÉ, 2017), o que poderia contribuir para o aumento do colesterol e peso do fígado identificados em nosso modelo experimental de sobrecarga de ferro. Finalmente, a diminuição do peso do tecido adiposo branco que identificamos nos animais com sobrecarga de ferro poderia ser uma consequência da lipólise já descrita nestas condições (CHIRUMBOLO et al., 2015; HUBLER; PETERSON; HASTY, 2015; RUMBERGER et al., 2004), o que também sustentaria o aumento do colesterol no grupo apoE^{-/-} injetado com ferro.

Como esperado, enquanto os camundongos C57 não apresentaram placa de ateroma em suas aortas, as artérias do grupo apoE^{-/-} Ct tiveram lesões ocupando

aproximadamente 4% da luz da aorta em média, o que corrobora evidências anteriores de aterosclerose em camundongos apoE^{-/-} adultos, mesmo quando alimentados com ração normal (não hipercolesterolêmica) (NAKASHIMA et al., 1994; PLUMP et al., 1992). Entretanto, a sobrecarga de ferro intensificou a formação de placas ateroscleróticas nos camundongos apoE^{-/-} (aproximadamente 19% da luz da aorta) e aumentou o infiltrado celular nas placas, em comparação com o apoE^{-/-} Ct. Curiosamente, outros estudos em camundongos apoE^{-/-} mostraram que a dieta rica em ferro não era aterogênica (KAUTZ et al., 2013) ou que até diminuiu a progressão da aterosclerose (KIRK; HEINECKE; LEBOEUF, 2001). Apesar desses dados diferentes sobre a relação entre ferro e aterogênese nessa linhagem, a maior carga de ferro aplicada e a diferente via de administração (parenteral) poderiam explicar o cenário particular do presente estudo. Na verdade, nossos achados reforçam evidências prévias de aumento da aterosclerose em camundongos apoE^{-/-} (XIE et al., 2008) e coelhos hipercolesterolêmicos (ARAUJO et al., 1995) quando injetados cronicamente com ferro-dextrano parenteral. Além disso, também foi descrito que a quelação de ferro com desferrioxamina atenuou a aterogênese em coelhos (MINQIN et al., 2005), e tanto a quelação de ferro quanto a dieta deficiente em ferro foram capazes de atenuar a formação de placas de aterosclerose em camundongos apoE^{-/-} (LEE et al., 1999; ZHANG; WEI; FREI, 2010), mesmo na ausência de sobrecarga de ferro. Mais recentemente, Vinchi et al. (2019), utilizando um modelo genético de HH do tipo IV em camundongos apoE^{-,-}, uma doença autossômica dominante, originada por mutações no gene codificador da ferroportina, demonstraram que a sobrecarga de ferro agrava a aterosclerose, enquanto que a quelação de ferro a atenua (VINCHI et al., 2019), o que reforça o papel do ferro circulante na progressão da placa de ateroma.

Por meio da coloração com azul da Prússia, detectamos depósitos de ferro na parede do arco aórtico, incluindo manchas endoteliais e deposição significativa de ferro na adventícia dos grupos C57 Fe e apoE^{-/-} Fe. Além disso, embora o ferro tenha sido identificado em lesões ateroscleróticas humanas até mesmo sem sobrecarga sistêmica evidente (MICHEL et al., 2011; SWAIN; GUTTERIDGE, 1995; ZHANG; WEI; FREI, 2010), em nosso estudo não foi encontrado depósito de ferro nas placas de camundongos apoE^{-/-} Ct. No entanto, também detectamos uma intensa coloração positiva para ferro (azul) nas placas ateroscleróticas dos camundongos apoE^{-/-}

da aterosclerose, que via efeitos pró-oxidantes e pró-inflamatórios podem potencializar a lesão aterosclerótica e torná-la mais suscetível à ruptura (GUDJONCIK et al., 2014; MICHEL et al., 2011; VINCHI et al., 2014).

Com o significante aumento nos níveis séricos de ferro encontrados em nosso modelo experimental, é compreensível que o mesmo tenha sido depositado em grande extensão em órgãos como o fígado, aorta e até mesmo na placa de ateroma como previamente relatado. Nesse sentido, sua entrada e depósito nas células presentes nas placas pode estar subjacente a três vias. É sabido que na sobrecarga de ferro ocorre a saturação do pool de moléculas de transferrina, e com isso o aumento do ferro livre (não ligado a transferrina). Este ferro livre, por sua vez, pode adentrar a várias células por meio dos canais para cálcio do tipo L e T, do DMT-1 e dos transportadores do zinco (ZIP) presentes na membrana citoplasmática (KUMFU; CHATTIPAKORN; CHATTIPAKORN, 2017; LIUZZI et al., 2006; MUCKENTHALER et al., 2017; PATEREK; MACKIEWICZ; MACZEWSKI, 2019). Além disso, também o ferro ligado a transferrina pode ser internalizado pela endocitose do complexo apoTf-TfR-HFE, com posterior liberação do ferro no citoplasma (DUNN; RAHMANTO; RICHARDSON, 2007; GROTTO, 2010; PATEREK; MACKIEWICZ; MACZEWSKI, 2019; SIDDIQUE; KOWDLEY, 2012). Finalmente, no caso específico da aterosclerose, a possível ocorrência de hemorragia intraplaca também poderia contribuir para o aumento da deposição de ferro no interior da placa de ateroma e do vaso sanguíneo (MICHEL et al., 2011), contribuindo para os danos importantes nesses sítios e maior vulnerabilidade da placa de ateroma a possíveis rupturas.

Entre os vários elementos envolvidos no controle do metabolismo do ferro, a interação entre a hepcidina e a ferroportina pode ter potencial relevância para a deposição de ferro tecidual e outros achados deste estudo. Como a hepcidina inibe a exportação de ferro por meio da ferroportina de células reticuloendoteliais, incluindo macrófagos das placas ateroscleróticas, tem sido proposto que a hepcidina aumentada pode desempenhar um papel na inflamação e na instabilidade da placa, por aumentar o aprisionamento de ferro, mediar a peroxidação lipídica e por mudanças fenotípicas das células espumosas (LI et al., 2012; SAEED et al., 2012). Como resultado, poderíamos especular que uma elevação da hepcidina nos camundongos apoE^{-/-} em resposta à sobrecarga de ferro estimularia a deposição em macrófagos reduzindo sua exportação mediada pela ferroportina, intensificando o

estresse oxidativo, aterosclerose e os danos endoteliais estruturais/funcionais encontrados neste estudo.

O aumento da aterosclerose no grupo apoE^{-/-} Fe foi acompanhado da adesão de vários leucócitos na superfície endotelial na aorta torácica, conforme demonstrado por MEV. Apesar de não termos medido os glóbulos brancos, se considerarmos que nosso tratamento foi o mesmo de Lin et al (2013), que mostrou o aumento dos níveis sanguíneos de leucócitos totais (monócitos e neutrófilos) em camundongos cronicamente injetados com ferro-dextrano, é possível que estas células inflamatórias em camundongos apoE^{-/-} Fe também estivessem aumentadas. É sabido que os leucócitos podem, por diapedese serem internalizados para o interior da placa, e lá por meio do estresse oxidativo associado ao dislipidemia identificada neste modelo experimental, poderiam dar origem as células espumosas ao digerir a LDL oxidada (HANSSON, 2005; MAGUIRE; PEARCE; XIAO, 2019; ROSS, 1999), o que poderia estar associada a intensificação na formação da placa aterosclerótica. Como em nosso estudo a placa aumentada e o acúmulo de ferro nas lesões ateroscleróticas foram bastante evidentes nos camundongos apoE^{-/-} injetados com ferro, avaliamos o infiltrado celular nas placas de ateroma onde foi encontrado aumento no número total de células em comparação ao apoE^{-/-} Ct. Confirmando a capacidade proliferativa induzida pelo ferro, Vinchi et al. (2019) demonstrou recentemente que o ferro circulante, em condições de sobrecarga, se acumula na placa e afeta não só os macrófagos e aumenta o recrutamento de monócitos, mas também afeta a proliferação e migração das células lisas vasculares para a lesão, favorecendo a progressão da placa. Assim, nosso estudo e o de Vinchi et al. (2019) mostram que sobrecarga de ferro intensifica a proliferação celular e a aterosclerose tanto em desordens de origem secundária como na primária, respectivamente.

Embora a aterosclerose seja uma doença multifatorial, estudos atuais enfatizam o papel central da disfunção endotelial associada ao estresse oxidativo nesta condição (BISHU; AGARWAL, 2006; SCHULZ et al., 2008). De fato, nossos dados indicaram que a aterosclerose exacerbada encontrada no grupo apoE^{-/-} Fe foi acompanhada por disfunção endotelial significativa, tal como evidenciado *in vitro* pelo prejuízo no relaxamento induzido pela acetilcolina e aumento da resposta vasocontrátil à fenilefrina. Ademais, a análise da superfície endotelial por microscopia eletrônica de varredura também demonstrou danos mais severos no grupo apoE^{-/-} Fe em relação aos demais. Curiosamente, a sobrecarga de ferro não alterou a reatividade
vascular dos anéis aórticos dos camundongos C57. Sobre isso, a demonstração prévia de que fêmeas de camundongos C57BL-6 são menos suscetíveis a algumas lesões induzidas por ferro (DAS et al., 2017; MUSUMECI et al., 2013) poderia explicar por que, apesar do estresse oxidativo e dos depósitos vasculares de ferro no grupo C57 com sobrecarga do metal, notamos apenas alterações morfológicas discretas enquanto o relaxamento dependente do endotélio estava preservado. Vale frisar que, independentemente daquelas alterações na reatividade vascular endotélio dependente do grupo apoE^{-/-} Fe, o relaxamento independente do endotélio foi semelhante aos outros grupos, sugerindo que o músculo liso vascular ainda estava preservado.

Como a disfunção endotelial é caracterizada pelo desequilíbrio entre fatores contráteis e relaxantes derivados do endotélio (FELETOU, 2006), investigamos algumas importantes vias envolvidas na modulação endotelial do tônus vascular. A incubação com o inibidor não-específico da NOS (L-NAME) aumentou a resposta contrátil à fenilefrina em todos os grupos, mas em menor magnitude nas aortas dos camundongos apoE^{-/-} Fe, o que sugere um comprometimento da capacidade do NO de modular a reatividade vascular. Corroborando os dados funcionais, a detecção in situ da liberação de NO, utilizando uma sonda NO-sensível, indicou uma redução da biodisponibilidade do NO vascular na sobrecarga de ferro, semelhante ao descrito anteriormente em ratos utilizando um modelo equivalente (BERTOLI et al., 2018; MARQUES et al., 2015; RIBEIRO JÚNIOR et al., 2017). Além disso, a reversão da função vascular alterada pela incubação com tiron sugere que um aumento das EROs poderia estar mediando estes efeitos do ferro, por exemplo, reagindo com o NO e reduzindo sua ação. Nesse sentido, é bem conhecido que o estresse oxidativo pode danificar o endotélio vascular, reduzindo a biodisponibilidade de NO e aumentando a agregação plaquetária, a adesão de leucócitos e a apoptose (IRANI, 2000; MONTEZANO; TOUYZ, 2012), bem como a camada de média, alterando a proliferação e hipertrofia de células musculares lisas e estimulando mediadores inflamatórios, desorganização da matriz extracelular e apoptose, e alterando o tônus vascular (IRANI, 2000; LYLE, 2006). Como o estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade antioxidante, e tem sido demonstrado que injeções crônicas de ferro em roedores geralmente diminuem os mecanismos de defesa antioxidante como SOD e catalase no sangue e fígado (BADRIA et al., 2015; ZHANG et al., 2014), avaliamos a atividade dessas enzimas na

aorta. Nossos resultados demonstram que também na aorta de camundongos apoE^{-/-} a sobrecarga de ferro reduz as atividades da SOD e da catalase, o que pode ter contribuído para o aumento do estresse oxidativo nesse grupo.

Em modelos humanos e animais, um aumento dos fatores vasoconstritores derivados da COX liberados pelo endotélio disfuncional tem sido associado ao desenvolvimento e/ou manutenção de complicações cardiovasculares tal como a aterosclerose (BALDAN et al., 2014; BURLEIGH et al., 2002, 2005; GÓMEZ-HERNÁNDEZ et al., 2006; LI et al., 2016). Enquanto vasos sanguíneos saudáveis produzem prostanóides principalmente pela isoforma constitutiva da COX-1, a COX-2 expressada de forma importante sob condições fisiopatológicas medeia a principal síntese desses mediadores(FÉLÉTOU; HUANG; VANHOUTTE, 2010, 2011). Em nossos protocolos de reatividade vascular, a incubação aguda com a indometacina, inibidor não seletivo da COX, atenuou as contrações vasculares para a fenilefrina em todos os grupos, mas em maior extensão no grupo apoE^{-/-} Fe, o que sugere um papel para os prostanóides derivados da COX no aumento da reatividade neste grupo experimental. Corroborando os dados funcionais, houve aumento da expressão de COX-2 na aorta, bem como aumento do nível urinário de metabólitos do TXA2 em camundongos apoE^{-/-} Fe. Os níveis de PGIM também aumentaram na urina do grupo apoE^{-/-} Fe, que pode ser um mecanismo compensatório via vasodilatação mediada por PGI₂, ou até mesmo um contribuinte para a hiperreatividade vascular, visto que sob certas condições, altas concentrações de PGI2 também podem ativar o receptor TP nas células musculares lisas (FÉLÉTOU; VERBEUREN; VANHOUTTE, 2009). Independentemente dessa participação da PGI₂, estudos anteriores já demonstraram fortes evidências de um papel do TXA2 no desenvolvimento da aterosclerose em camundongos apoE^{-/-} (CAYATTE et al., 2000; KOBAYASHI et al., 2004). Sobre a relação entre sobrecarga de ferro e COX, Mattera et al. (2001) descreveram que cardiomiócitos de ratos expostos a altas concentrações de citrato de ferro aumentam a indução de COX-2 e sua produção de metabólitos (MATTERA et al., 2001) e Lin et al. (2013), com evidencias de que a sobrecarga crônica de ferro tem efeitos cardíacos atenuados em camundongos nocautes para tromboxano sintase (TXAS-/-), propuseram que o TXA₂ medeia a cardiomiopatia por sobrecarga de ferro (LIN et al., 2013). Assim, tomados juntos nossos dados e as evidências prévias da literatura, poderíamos sugerir que um aumento de TXA2 derivado da COX-2 no sistema vascular

está, pelo menos em parte, implicado na gênese da disfunção endotelial e na potenciação da aterosclerose durante a sobrecarga crônica de ferro.

Finalmente, a relação entre sobrecarga de ferro e disfunção endotelial tem sido proposta por estudos prévios do nosso laboratório, que mostram estas alterações na reatividade vascular em vasos de diferentes territórios (BERTOLI et al., 2018; MARQUES et al., 2015; RIBEIRO JÚNIOR et al., 2017), o que poderia influenciar no controle local do fluxo. Em 2017, Ribeiro Junior et al. (2017) mostrou alterações estruturais e funcionais em artérias mesentéricas de resistência, o que sabidamente pode favorecer o surgimento de hipertensão arterial sistêmica. Já Bertolli et al. (2018), mostrou os efeitos do ferro sobre a artérias pulmonares de resistência, com importantes alterações morfofuncionais associadas a hipertrofia do VD, condições experimentais frequentemente associadas a problemas como hipertensão pulmonar. A patogênese das alterações vasculares provocada pelo ferro nos dois estudos supracitados, tem como características comuns o remodelamento vascular e o aumento da vasoconstrição em artérias de resistência, que foram associadas a diminuição da biodisponibilidade do NO, aumento da produção de EROs via NAD(P)H oxidase e importante participação do sistema renina-angiotensina. Já em relação aos efeitos do ferro em vasos de condutância, o estudo de Marques et al. (2015) mostrou aumento da reatividade vascular à fenilefrina em aorta de ratos Wistar, associada a prejuízo na modulação nitrérgica, estresse oxidativo e participação do sistema reninaangiotensina, o que poderia favorecer o surgimento ou intensificar doenças inflamatórias, como é o caso da aterosclerose demonstrada em nosso modelo experimental de camundongos apoE^{-/-} submetidos a sobrecarga crônica de ferro.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam que a sobrecarga crônica de ferro aumenta o processo aterosclerótico em camundongos apoE^{-/-}, provavelmente como resultado da hipercolesterolemia exacerbada e dos danos estruturais e funcionais no endotélio vascular. Enquanto a lesão hepática mediada por ferro possa explicar essa elevação adicional da lipidemia, o estresse oxidativo e a diminuição da biodisponibilidade do NO associada, e a maior produção de prostanóides derivados da COX-2 parecem ser os substratos patogênicos desta disfunção endotelial.

Como perspectivas e com base no conhecimento atual, estudos futuros são importantíssimos para determinar se a interrupção nessa relação causal entre ferro e doença cardiovascular, seja reduzindo os níveis de ferro em indivíduos hipercolesterolêmicos ou reduzindo fatores de risco relacionados à aterosclerose em pacientes com sobrecarga de ferro primária ou secundária, pode ser de fato benéfica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLY, A. A. M. et al. Vascular Dysfunction in Patients with Young β-Thalassemia. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 21, n. 8, p. 733–744, 2015.

AHLUWALIA, N. et al. Iron Status Is Associated with Carotid Atherosclerotic Plaques in Middle-Aged Adults. **The Journal of Nutrition**, v. 140, n. 4, p. 812–816, 2010.

ANDREU, G. L. P. et al. Uncoupling and oxidative stress in liver mitochondria isolated from rats with acute iron overload. **Archives of Toxicology**, v. 83, n. 1, p. 47–53, 2009.

ANSTEE, Q. M.; TARGHER, G.; DAY, C. P. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, n. 6, p. 330–344, 2013.

ARAUJO, J. A. et al. Iron overload augments the development of atherosclerotic lesions in rabbits. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 1995.

ÁVILA, R. A. et al. Mechanisms involved in the in vitro contractile dysfunction induced by different concentrations of ferrous iron in the rat myocardium. **Toxicology in Vitro**, 2016.

BÄCK, M. et al. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities. **Nature Reviews Cardiology**, 2019.

BACON, B. R.; BRITTON, R. S. The pathology of hepatic iron overload: A free radical-Mediated Process? **Hepatology**, 1990.

BADRIA, F. A. et al. Curcumin attenuates iron accumulation and oxidative stress in the liver and spleen of chronic iron-overloaded rats. **PLoS ONE**, 2015.

BALDAN, A. et al. Cyclooxygenase 2, toll-like receptor 4 and interleukin 1β mRNA expression in atherosclerotic plaques of type 2 diabetic patients. **Inflammation Research**, 2014.

BARTFAY, W. J. et al. Cardiac function and cytotoxic aldehyde production in a murine model of chronic iron-overload. **Cardiovascular Research**, v. 43, n. 4, p. 892–900,

1999a.

BARTFAY, W. J. et al. A biochemical, histochemical, and electron microscopic study on the effects of iron-loading on the hearts of mice. **Cardiovascular Pathology**, v. 8, n. 6, p. 305–314, 1999b.

BARTFAY, W. J.; BARTFAY, E. Systemic Oxygen – Free Radical Production in Iron-Loaded Mice 1. v. 22, n. 8, p. 927–935, 2000.

BÉNY, J. L.; BRUNET, P. C. Electrophysiological and mechanical effects of substance P and acetylcholine on rabbit aorta. **The Journal of Physiology**, v. 398, n. 1, p. 277–289, 1988.

BERDOUKAS, V. et al. Tissue iron evaluation in chronically transfused children shows significant levels of iron loading at a very young age. **American Journal of Hematology**, v. 88, n. 11, p. 283–285, 2013.

BERTOLI, S. R. et al. Chronic iron overload induces vascular dysfunction in resistance pulmonary arteries associated with right ventricular remodeling in rats. **Toxicology Letters**, v. 295, n. July, p. 296–306, 2018.

BISHU, K.; AGARWAL, R. Acute injury with intravenous iron and concerns regarding long-term safety. **Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN**, v. 1 Suppl 1, p. 19–23, 2006.

BRASIL. Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde (BRATS). Deferasirox para o tratamento da sobrecarga de ferro. p. 35, 2009.

BRASIL. PORTARIA CONJUNTA Nº 7, de 23 de fevereiro de 2018: Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Sobrecarga de Ferro. p. 1–26, 2018.

BRITTON, L. J.; SUBRAMANIAM, V. N.; CRAWFORD, H. D. Iron and non-alcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 36, p. 8112–8122, 2016.

BUJA, L. M.; ROBERTS, W. C. Iron in the heart. Etiology and clinical significance. **The American Journal of Medicine**, 1971.

BÜLBRING, E.; TOMITA, T. Catecholamine action on smooth muscle. **Pharmacological reviews**, 1987.

BURKITT, M. J.; MASON, R. P. Direct evidence for in vivo hydroxyl-radical generation in experimental iron overload: an ESR spin-trapping investigation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 19, p. 8440–8444, 1991.

BURLEIGH, M. E. et al. Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice. **Circulation**, 2002.

BURLEIGH, M. E. et al. Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in ApoE-deficient and C57BL/6 mice. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2005.

BYLER, R. M. et al. Hydrogen peroxide cytotoxicity in cultured cardiac myocytes is iron dependent. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 266, n. 1, p. H121–H127, 2017.

CAI, H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms, and consequences. **Cardiovascular Research**, v. 68, n. 1, p. 26–36, 2005a.

CAI, H. NAD(P)H oxidase-dependent self-propagation of hydrogen peroxide and vascular disease. **Circulation Research**, v. 96, n. 8, p. 818–822, 2005b.

CAI, H.; HARRISON, D. The role of oxidant stress. Circ Res, p. 840-844, 2000.

CAO, A.; GALANELLO, R. Beta-thalassemia. **Genetics in Medicine**, v. 12, n. 2, p. 61–76, 2010.

CARDOSO, L. M. et al. Baroreflex function in conscious rats submitted to iron overload. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 2, p. 205–214, 2005.

CAT, A. N. D. et al. Angiotensin II, NADPH Oxidase, and Redox Signaling in the Vasculature. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, n. 10, p. 1110–1120, 2013.

CAYATTE, A. J. et al. The thromboxane receptor antagonist S18886 but not Aspirin inhibits atherogenesis in apo E-deficient mice: Evidence that eicosanoids other than thromboxane contribute to atherosclerosis. **Arteriosclerosis**, **Thrombosis**, **and**

Vascular Biology, 2000.

CHENG, C. F.; LIAN, W. S. Prooxidant mechanisms in iron overload cardiomyopathy. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

CHEVRANT BRETON, J. et al. Cutaneous Manifestations of Idiopathic Hemochromatosis: Study of 100 Cases. **Archives of Dermatology**, 1977.

CHIRUMBOLO, S. et al. Iron primes 3T3-L1 adipocytes to a TLR4-mediated inflammatory response. **Nutrition**, v. 31, n. 10, p. 1266–1274, 2015.

CONCEA. Concelho Nacional de Experimentação Animail - CONCEA. Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica - DBCA. 2016.

COWAN, C. L.; COHEN, R. A. Two mechanisms mediate relaxation by bradykinin of pig coronary artery: NO-dependent and -independent responses. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, 1991.

CSEKO, C. Biphasic effect of hydrogen peroxide on skeletal muscle arteriolar tone via activation of endothelial and smooth muscle signaling pathways. **Journal of Applied Physiology**, 2004.

DANJOU, F. et al. Longitudinal analysis of heart and liver iron in thalassemia major patients according to chelation treatment. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 51, n. 3, p. 142–145, 2013.

DARSHAN, D.; ANDERSON, G. J. Interacting signals in the control of hepcidin expression. **BioMetals**, v. 22, n. 1, p. 77–87, 2009.

DAS, S. K. et al. Females Are Protected From Iron-Overload Cardiomyopathy Independent of Iron Metabolism: Key Role of Oxidative Stress. **Journal of the American Heart Association**, v. 6, n. 1, p. 11–13, 2017.

DAVIS, M. T.; BARTFAY, W. J. Dose-dependent effects of chronic iron burden on heart aldehyde and acyloin production in mice. **Biological Trace Element Research**, v. 99, n. 1–3, p. 255–268, 2004.

DAY, S. M. et al. Chronic Iron Administration Increases Vascular Oxidative Stress and Accelerates Arterial Thrombosis. **Circulation**, p. 2601–2606, 2003.

DEMANT, A. W. et al. Heart failure and malignant ventricular tachyarrhythmias due to hereditary hemochromatosis with iron overload cardiomyopathy. **Clinical Research in Cardiology**, v. 96, n. 12, p. 900–903, 2007.

DEUGNIER, Y.; BARDOU-JACQUET, É.; LAINÉ, F. Dysmetabolic iron overload syndrome (DIOS). **Presse Medicale**, v. 46, n. 12P2, p. e306–e311, 2017.

DEV, S.; BABITT, J. L. Overview of iron metabolism in health and disease. **Hemodialysis International**, v. 21, n. Suppl 1, p. S6–S20, 2017.

DI BISCEGLIE, A. M. et al. Measurements of iron status in patients with chronic hepatitis. **Gastroenterology**, 1992.

DRÜEKE, T. et al. Iron therapy, advanced oxidation protein products, and carotid artery intima-media thickness in end-stage renal disease. **Circulation**, v. 106, n. 17, p. 2212–2217, 2002.

DUNN, L. L.; RAHMANTO, Y. S.; RICHARDSON, D. R. Iron uptake and metabolism in the new millennium. **Trends in Cell Biology**, v. 17, n. 2, p. 93–100, 2007.

EDISON, E. S.; BAJEL, A.; CHANDY, M. Iron homeostasis: New players, newer insights. **European Journal of Haematology**, v. 81, n. 6, p. 411–424, 2008.

EDWARDS, C. Q. et al. Thyroid Disease in Hemochromatosis: Increased Incidence in Homozygous Men. Archives of Internal Medicine, 1983.

EDWARDS, G.; WESTON, A. H. Potassium channel openers and vascular smooth muscle relaxation. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 48, n. 2, p. 237–258, 1990.

ENGLE, M. A.; ERLANDSON, M.; SMITH, C. H. LATE CARDIAC COMPLICATIONS OF CHRONIC, SEVERE, REFRACTORY ANEMIA WITH HEMOCHROMATOSIS. **Circulation**, 1964.

FELETOU, M. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). **AJP: Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, n. 3, p. H985–H1002,

2006.

FÉLÉTOU, M.; HUANG, Y.; VANHOUTTE, P. M. Vasoconstrictor prostanoids. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 459, n. 6, p. 941–950, 2010.

FÉLÉTOU, M.; HUANG, Y.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 3, p. 894–912, 2011.

FÉLÉTOU, M.; KÖHLER, R.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived vasoactive factors and hypertension: Possible roles in pathogenesis and as treatment targets. **Current Hypertension Reports**, v. 12, n. 4, p. 267–275, 2010.

FÉLÉTOU, M.; KÖHLER, R.; VANHOUTTE, P. M. Nitric oxide: Orchestrator of endothelium-dependent responses. **Annals of Medicine**, v. 44, n. 7, p. 694–716, 2012.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: Where are we now? **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 6, p. 1215–1225, 2006.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. EDHF: an update. **Clinical Science**, v. 117, n. 4, p. 139–155, 2009.

FÉLÉTOU, M.; VERBEUREN, T. J.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent contractions in SHR: A tale of prostanoid TP and IP receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 156, n. 4, p. 563–574, 2009.

FERRER-SUETA, G.; RADI, R. Chemical biology of peroxynitrite: Kinetics, diffusion, and radicalsACS Chemical Biology, 2009.

FÖRSTERMANN, U.; XIA, N.; LI, H. Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis. **Circulation Research**, v. 120, n. 4, p. 713– 735, 2017.

FRIQUES, A. G. F. et al. Chronic administration of the probiotic kefir improves the endothelial function in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Translational Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1–16, 2015.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 1980.

GAENZER, H. et al. Association between increased iron stores and impaired endothelial function in patients with hereditary hemochromatosis. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 40, n. 12, p. 2189–2194, 2002.

GANITKEVICH V, Y. A.; ISENBERG, G. Depolarization-mediated intracellular calcium transients in isolated smooth muscle cells of guinea-pig urinary bladder. **The Journal of Physiology**, 1991.

GANZ, T. Systemic Iron Homeostasis. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 4, p. 1721– 1741, 2013.

GAO, X. et al. Mitochondrial dysfunction may explain the cardiomyopathy of chronic iron overload. **Free Radical Biology and Medicine**, 2010.

GATTERMANN, N. The Treatment of Secondary Hemochromatosis. **Deutsches Aerzteblatt Online**, v. 106, n. 30, p. 499–504, 2009.

GIMBRONE, M. A.; GARCÍA-CARDEÑA, G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. **Circulation Research**, 2016.

GÓMEZ-HERNÁNDEZ, A. et al. Overexpression of COX-2, Prostaglandin E Synthase-1 and Prostaglandin E Receptors in blood mononuclear cells and plaque of patients with carotid atherosclerosis: Regulation by nuclear factor-κB. **Atherosclerosis**, 2006.

GRAHAM, R. M. et al. Hepatic iron loading in mice increases cholesterol biosynthesis. **Hepatology**, 2010.

GROTTO, H. Z. W. Fisiologia e metabolismo do ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, p. 08–17, 2010.

GUDJONCIK, A. et al. Iron, oxidative stress, and redox signaling in the cardiovascular system. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 58, n. 8, p. 1721–1738, 2014.

HAHALIS, G. et al. Global vasomotor dysfunction and accelerated vascular aging in β -thalassemia major. **Atherosclerosis**, v. 198, n. 2, p. 448–457, 2008.

HAMILTON, E. et al. The Natural History of Arthritis in Idiopathic Haemochromatosis: Prograssion of the Clinical and Radiological Features Over Ten Years. **QJM: An International Journal of Medicine**, 1981.

HANSSON, G. K. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. **New** England Journal of Medicine, 2005.

HARRIS, Z. L.; KLOMP, L. W. J.; GITLIN, J. D. Aceruloplasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis 1-3. v. 67, p. 972–977, 1998.

HASUNUMA, K. et al. Effects of inhibitors of EDRF and EDHF on vasoreactivity of perfused rat lungs. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 1991.

HIGASHI. Endothelial Function in Cardiovascular Diseases. **Circulation Journal**, v. 73, n. March, p. 411–418, 2009.

HOROWITZ, A. et al. Mechanisms of smooth muscle contraction. **Physiological Reviews**, 2017.

HRAMIAK, I. M.; FINEGOOD, D. T.; ADAMS, P. C. Factors affecting glucose tolerance in hereditary hemochromatosis. **Clinical and Investigative Medicine**, 1997.

HUBLER, M. J.; PETERSON, K. R.; HASTY, A. H. Iron homeostasis: A new job for macrophages in adipose tissue? **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 26, n. 2, p. 101–109, 2015.

IRANI, K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival. **Circulation Research**, v. 87, n. 1, p. 179–183, 2000.

JIANG, H. et al. Peripheral iron dextran induced degeneration of dopaminergic neurons in rat substantia nigra. **Neurochemistry International**, v. 51, n. 1, p. 32–36, 2007.

KAUTZ, L. et al. Testing the iron hypothesis in a mouse model of atherosclerosis. **Cell Reports**, v. 5, n. 5, p. 1436–1442, 2013.

KEHRER, J. P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicityToxicology,

2000.

KIM, H. R. et al. Smooth muscle signalling pathways in health and disease: Contractility in Health and DiseaseReview Series. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 6A, p. 2165–2180, 2008.

KIRK, E. A.; HEINECKE, J. W.; LEBOEUF, R. C. Iron overload diminishes atherosclerosis in apoE-deficient mice. **Journal of Clinical Investigation**, 2001.

KOBAYASHI, T. et al. Roles of thromboxane A 2 and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE- deficient mice Find the latest version: Roles of thromboxane A 2 and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoEdeficient mice. v. 114, n. 6, p. 784–794, 2004.

KOLOVOU, G. et al. Apolipoprotein E Knockout Models. Current Pharmaceutical **Design**, 2008.

KRAMER, J. H. et al. *d* -Propranolol protects against oxidative stress and progressive cardiac dysfunction in iron overloaded rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 90, n. 9, p. 1257–1268, 2012.

KREMASTINOS, D. T.; FARMAKIS, D. Iron overload cardiomyopathy in clinical practiceCirculation, 2011.

KUKONGVIRIYAPAN, V. et al. Endothelial dysfunction and oxidant status in pediatric patients with hemoglobin E-β thalassemia. **Pediatric Cardiology**, v. 29, n. 1, p. 130–135, 2008.

KUMFU, S.; CHATTIPAKORN, S. C.; CHATTIPAKORN, N. T-type and L-type calcium channel blockers for the treatment of cardiac iron overload: An update. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 70, n. 5, p. 277–283, 2017.

LEE, T. S. et al. Iron-deficient diet reduces atherosclerotic lesions in ApoE-deficient mice. **Circulation**, v. 99, n. 9, p. 1222–1229, 1999.

LEE, Y. T. et al. Mouse models of atherosclerosis: A historical perspective and recent advances. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, n. 1, p. 1–11, 2017.

LEGSSYER, R. et al. Changes in function of iron-loaded alveolar macrophages after in vivo administration of desferrioxamine and/or chloroquine. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 94, n. 1–2, p. 36–42, 2003.

LEKAKIS, J. et al. Hemochromatosis associated with endothelial dysfunction: evidence for the role of iron stores in early atherogenesis. **Vasc Med**, v. 4, n. 3, p. 147–148, 1999.

LEON, M. B. et al. Detection of Early Cardiac Dysfunction in Patients with Severe Beta-Thalassemia and Chronic Iron Overload. **New England Journal of Medicine**, 1979.

LI, J. J. et al. Hepcidin destabilizes atherosclerotic plaque via overactivating macrophages after erythrophagocytosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 5, p. 1158–1166, 2012.

LI, S. et al. Role of cyclooxygenase-1 and -2 in endothelium-dependent contraction of atherosclerotic mouse abdominal aortas. **Clinical and Experimental Pharmacology** and **Physiology**, v. 43, n. 1, p. 67–74, 2016.

LIN, H. et al. Thromboxane A2 Mediates Iron-Overload Cardiomyopathy in Mice Through Calcineurin-Nuclear Factor of Activated T Cells Signaling Pathway. **Circulation Journal**, v. 77, n. 10, p. 2586–2595, 2013.

LINCOLN, T. M.; DEY, N.; SELLAK, H. Invited Review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. **Journal of Applied Physiology**, 2001.

LINDQUIST, N. Acute Iron "Poisoning". Acta Pædiatrica, 1949.

LIUZZI, J. P. et al. Iron Uptake Into Cells. v. 14, p. 10–15, 2006.

LOU, L. X. et al. Endoplasmic reticulum stress involved in heart and liver injury in ironloaded rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 36, n. 7, p. 612–618, 2009.

LUSCHER, T. F. Imbalance of endothelium-derived relaxing and contracting factors: a new concept in hypertension? **American Journal of Hypertension**, v. 3, n. 4, p. 317–330, 1990.

LUSCHER, T. F. et al. Endothelium-derived factors and contracting factors. **Hypertension**, p. 117–130, 1992.

LYLE, A. N. Modulation of Vascular Smooth Muscle Signaling by Reactive Oxygen Species. **Physiology**, v. 21, n. 4, p. 269–280, 2006.

MA, Z. G.; ZHOU, Y.; XIE, J. X. Nifedipine prevents iron accumulation and reverses iron-overload-induced dopamine neuron degeneration in the substantia nigra of rats. **Neurotoxicity Research**, v. 22, n. 4, p. 274–279, 2012.

MADIWALE, T.; LIEBELT, E. Iron: Not a benign therapeutic drug. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 18, n. 2, p. 174–179, 2006.

MAGUIRE, E. M.; PEARCE, S. W. A.; XIAO, Q. Foam cell formation: A new target for fighting atherosclerosis and cardiovascular disease. **Vascular Pharmacology**, v. 112, n. August, p. 54–71, 2019.

MAHLEY, R. W. Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biologyScience, 1988.

MAHLEY, R. W.; JI, Z. S. Remnant lipoprotein metabolism: Key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein EJournal of Lipid Research, 1999.

MARQUES, V. B. et al. Chronic iron overload in rats increases vascular reactivity by increasing oxidative stress and reducing nitric oxide bioavailability. **Life Sciences**, v. 143, p. 89–97, 2015.

MATTERA, R. et al. Increased release of arachidonic acid and eicosanoids in ironoverloaded cardiomyocytes. **Circulation**, v. 103, n. 19, p. 2395–2401, 2001.

MELI, R. et al. High Fat Diet Induces Liver Steatosis and Early Dysregulation of Iron Metabolism in Rats. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

MENDLER, M. H. et al. Insulin resistance-associated hepatic iron overload. **Gastroenterology**, 1999.

MEYRELLES, S. S. et al. Endothelial Dysfunction in the Apolipoprotein E-deficient

Mouse: Insights into the influence of diet, gender and aging. Lipids in Health and Disease, v. 10, n. 1, p. 211, 2011.

MICHEL, J. B. et al. Intraplaque haemorrhages as the trigger of plaque vulnerability. **European Heart Journal**, v. 32, n. 16, p. 1977–1985, 2011.

MINQIN, R. et al. The iron chelator desferrioxamine inhibits atherosclerotic lesion development and decreases lesion iron concentrations in the cholesterol-fed rabbit. **Free Radical Biology and Medicine**, 2005.

MONCADA, S. et al. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI2) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. **Thrombosis Research**, 1977.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. Nitric oxide and the vascular endothelium. **Handbook** of Experimental Pharmacology, 2006.

MONTEZANO, A. C.; TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species and endothelial function - Role of nitric oxide synthase uncoupling and nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 110, n. 1, p. 87–94, 2012.

MOON, S. N. et al. Establishment of secondary iron overloaded mouse model: Evaluation of cardiac function and analysis according to iron concentration. **Pediatric Cardiology**, v. 32, n. 7, p. 947–952, 2011.

MORRISON, E. D. et al. Serum Ferritin Level Predicts Advanced Hepatic Fibrosis among U.S. Patients with Phenotypic Hemochromatosis. **Annals of Internal Medicine**, v. 138, n. 8, p. 627–634, 2003.

MUCKENTHALER, M. U. et al. A Red Carpet for Iron Metabolism. **Cell**, v. 168, n. 3, p. 334–361, 2017.

MULVANY, M. J.; HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circulation Research**, 1977.

MUÑOZ-BRAVO, C. et al. Iron: Protector or risk factor for cardiovascular disease? still

controversial. Nutrients, v. 5, n. 7, p. 2384–2404, 2013.

MURPHY, C. J.; OUDIT, G. Y. Iron-overload cardiomyopathy: Pathophysiology, diagnosis, and treatment. **Journal of Cardiac Failure**, v. 16, n. 11, p. 888–900, 2010.

MUSUMECI, M. et al. The C57BL/6 genetic background confers cardioprotection in iron-overloaded mice. **Blood Transfusion**, v. 11, n. 1, p. 88–93, 2013.

NAKASHIMA, Y. et al. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 1994.

NELSON, M. T. et al. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. **Science**, 1995.

NELSON, M. T.; QUAYLE, J. M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, 1995.

NUNES, K. P.; RIGSBY, C. S.; WEBB, R. C. RhoA/Rho-kinase and vascular diseases: what is the link? **Cell Mol Life Sci**, v. 67, n. 22, p. 3823–3836, 2010.

OLIVEIRA, F.; ROCHA, S.; FERNANDES, R. Iron metabolism: From health to disease. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 28, n. 3, p. 210–218, 2014.

OLYNYK, J. K. et al. A Population-Based Study of the Clinical Expression of the Hemochromatosis Gene. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 10, p. 718–724, 1999.

OUDIT, G. Y. et al. L-type Ca2+ channels provide a major pathway for iron entry into cardiomyocytes in iron-overload cardiomyopathy. **Nature Medicine**, v. 9, n. 9, p. 1187–1194, 2003.

OUDIT, G. Y. et al. Taurine Supplementation Reduces Oxidative Stress and Improves Cardiovascular Function in an Iron-Overload Murine Model. **Circulation**, v. 109, n. 15, p. 1877–1885, 2004.

PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for

the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature, 1987.

PANG, J. H. S. et al. Increased ferritin gene expression in atherosclerotic lesions. **Journal of Clinical Investigation**, v. 97, n. 10, p. 2204–2212, 1996.

PAOLETTI, R. Inflammation in Atherosclerosis and Implications for Therapy. **Circulation**, 2004.

PATEREK, A.; MACKIEWICZ, U.; MĄCZEWSKI, M. Iron and the heart: A paradigm shift from systemic to cardiomyocyte abnormalities. **Journal of Cellular Physiology**, n. December 2018, p. 1–17, 2019.

PENNELL, D. J. et al. Cardiovascular function and treatment in β-thalassemia major: A consensus statement from the american heart association. **Circulation**, v. 128, n. 3, p. 281–308, 2013.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, 1977.

PIEDRAHITA, J. A. et al. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1992.

PIPPARD, M. J. et al. Iron Absorption and Loading in B-Thalassæmia Intermedia. **The** Lancet, v. 314, n. 8147, p. 819–821, 1979.

PLUMP, A. S. et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. **Cell**, 1992.

PONKA, P.; BEAUMONT, C.; RICHARDSON, D. R. Function and regulation of transferrin and ferritin. **Seminars in hematology**, 1998.

REIS, K. A. et al. Intravenous Iron Therapy as a Possible Risk Factor for Atherosclerosis in End-stage Renal Disease **International Heart Journal**, v. 46, n. 2, p. 255–264, 2005.

RIBEIRO JÚNIOR, R. F. et al. Chronic iron overload induces functional and structural vascular changes in small resistance arteries via NADPH oxidase-dependent O2[rad]-

production. Toxicology Letters, v. 279, n. July, p. 43–52, 2017.

RIBEIRO, R. F. et al. Carvedilol Prevents Ovariectomy-Induced Myocardial Contractile Dysfunction in Female Rat. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

RINGVOLD, H. C.; KHALIL, R. A. Protein Kinase C as Regulator of Vascular Smooth Muscle Function and Potential Target in Vascular Disorders. In: **Advances in Pharmacology**. [s.l: s.n.].

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, M. A. et al. Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved. **British Journal of Pharmacology**, 1998.

ROSS, R. Inflammation or Atherogenesis. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 2, p. 115–126, 1999.

ROSSI, E. M. et al. Acute iron overload leads to hypothalamic-pituitary-gonadal axis abnormalities in female rats. **Toxicology Letters**, v. 240, n. 1, p. 196–213, 2016.

RUMBERGER, J. M. et al. Transferrin and iron contribute to the lipolytic effect of serum in isolated adipocytes. **Diabetes**, v. 53, n. 10, p. 2535–2541, 2004.

SAEED, O. et al. Pharmacological suppression of hepcidin increases macrophage cholesterol efflux and reduces foam cell formation and atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 2, p. 299–307, 2012.

SALAMANCA, D. A. Protein Kinase C isoforms as Specific Targets for Modulation of Vascular Smooth Muscle Function in Hypertension. **Biochemical pharmacology**, v. 70, n. 11, p. 1537–1547, 2006.

SANGARTIT, W. et al. Tetrahydrocurcumin in combination with deferiprone attenuates hypertension, vascular dysfunction, baroreflex dysfunction, and oxidative stress in iron-overloaded mice. **Vascular Pharmacology**, 2016.

SANTOS, P. C. J. DE L. et al. Non-HFE hemochromatosis. **Santos**, v. 34, n. 4, p. 311–316, 2012.

SANTOS, P. C. J. L.; KRIEGER, J. E.; PEREIRA, A. C. Molecular diagnostic and

pathogenesis of hereditary hemochromatosis. International Journal of Molecular Sciences, v. 13, n. 2, p. 1497–1511, 2012.

SANZ, J.; FAYA, Z. A. Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. **Nature**, v. 451, n. February, p. 953–957, 2008.

SCHELLHAMMER, P. F.; ENGLE, M. A.; HAGSTROM, J. W. Histochemical studies of the myocardium and conduction system in acquired iron-storage disease. **Circulation**, 1967.

SCHULZ, E. et al. Nitric Oxide, Tetrahydrobiopterin, Oxidative Stress, and Endothelial Dysfunction in Hypertension. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 6, p. 1115–1126, 2008.

SEBASTIANI, G. et al. Hepatic iron, liver steatosis and viral genotypes in patients with chronic hepatitis C. Journal of Viral Hepatitis, v. 13, n. 3, p. 199–205, 2006.

SHIMOKAWA, H.; SUNAMURA, S.; SATOH, K. RhoA/Rho-Kinase in the Cardiovascular System. **Circulation Research**, v. 118, n. 2, p. 352–366, 2016.

SIDDIQUE, A.; KOWDLEY, K. V. Review article: The iron overload syndromes. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, v. 35, n. 8, p. 876–893, 2012.

SILVA, M. et al. Iron Dextran Increases Hepatic Oxidative Stress and Alters Expression of Genes Related to Lipid Metabolism Contributing to Hyperlipidaemia in Murine Model. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–9, 2015.

SIMINOSKI, K.; D'COSTA, M.; WALFISH, P. G. Hypogonadotropic hypogonadism in idiopathic hemochromatosis: evidence for combined hypothalamic and pituitary involvement. Journal of Endocrinological Investigation: Official Journal of the Italian Society of Endocrinology, 1990.

SMITH, C. et al. Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl-radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions. **The Biochemical journal**, v. 286 (Pt 3, p. 901–905, 1992.

SOMLYO, A. P. et al. Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases. In: **Reviews of Physiology Biochemistry and**

Pharmacology, Volume 134. [s.l: s.n.].

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. From pharmacomechanical coupling to Gproteins and myosin phosphatase. Acta Physiologica Scandinavica. Anais...1998

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca2+ Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 4, p. 1325–1358, 2003.

SOOD, M. M. et al. Effects of parenteral iron on inflammation and the myocardium in hemodialysis patients. **Hemodialysis International**, v. 12, n. 3, p. 362–368, 2008.

STADLER, N.; LINDNER, R. A.; DAVIES, M. J. Direct Detection and Quantification of Transition Metal Ions in Human Atherosclerotic Plaques: Evidence for the Presence of Elevated Levels of Iron and Copper. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, n. 5, p. 949–954, 2004.

STANKEVICIUS, E.; KEVELAITIS, E.; VAINORIUS, E.; SIMONSEN, U. Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, v. 39, n. 4, p. 333–41, 2003.

STULL, J. T. et al. Vascular smooth muscle contractile elements cellular regulationHypertension, 1991.

SWAIN, J.; GUTTERIDGE, J. M. C. Prooxidant iron and copper, with ferroxidase and xanthine oxidase activities in human atherosclerotic material. **FEBS Letters**, 1995.

TABAS, I.; GARCÍA-CARDEÑA, G.; OWENS, G. K. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. **Journal of Cell Biology**, v. 209, n. 1, p. 13–22, 2015.

TANIYAMA, Y.; GRIENDLING, K. K. Reactive Oxygen Species in the Vasculature: Molecular and Cellular Mechanisms. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1075–1081, 2003.

THAKALI, K. et al. Pleiotropic effects of hydrogen peroxide in arteries and veins from normotensive and hypertensive rats. **Hypertension**, 2006.

TOUYZ, R. M. et al. Vascular smooth muscle contraction in hypertension. **Cardiovascular Research**, v. 114, n. 4, p. 529–539, 2018.

VALENTI, L. et al. The hand arthropathy of hereditary hemochromatosis is strongly associated with iron overload. **Journal of Rheumatology**, 2008.

VALENTI, L. et al. Association between iron overload and osteoporosis in patients with hereditary hemochromatosis. **Osteoporosis International**, 2009.

VANE, J. R.; ÄNGGÅRD, E. E.; BOTTING, R. M. Regulatory Functions of the Vascular Endothelium. **New England Journal of Medicine**, 1990.

VANHOUTTE, P. M. et al. Endothelial dysfunction and vascular disease – a 30th anniversary update. Acta Physiologica, v. 219, n. 1, p. 22–96, 2017.

VAZIRI, N. D. Toxic effects of IV iron preparations in CKD patients. **Nephrology news & issues**, 2014.

VINCHI, F. et al. Atherogenesis and iron: From epidemiology to cellular level. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5 MAY, n. May, p. 1–20, 2014.

VINCHI, F. et al. Atherosclerosis is aggravated by iron overload and ameliorated by dietary and pharmacological iron restriction. **European Heart Journal**, p. 1–16, 2019.

WARDMAN, P.; CANDEIAS, L. P. Fenton Chemistry: An Introduction. **Radiation Research**, 1996.

WEBB, R. C. et al. Relaxation Smooth Muscle Contraction and Relaxation. **Society**, p. 201–206, 2003.

WHO. **The top 10 causes of death**. Disponível em: https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death. Acesso em: 24 jul. 2019.

XIE, X. M. et al. Effect of chronic iron overload on atherosclerosis lesion in apolipoprotein E knockout mice. Journal of Central South University (Medical Sciences), 2008.

XU, S. Iron and Atherosclerosis: The Link Revisited. **Trends in Molecular Medicine**, v. xx, n. xx, p. 3–5, 2019.

ZHANG, W. J.; WEI, H.; FREI, B. The iron chelator, desferrioxamine, reduces inflammation and atherosclerotic lesion development in experimental mice.

Experimental Biology and Medicine, 2010.

ZHANG, Z. et al. Taurine supplementation reduces oxidative stress and protects the liver in an iron-overload murine model. **Molecular Medicine Reports**, 2014.

ZOVICO, P. V. C. et al. Effects of controlled doses of Oxyelite Pro on physical performance in rats. **Nutrition and Metabolism**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2016.

APÊNDICE – Material suplementar

		57		apoE ^{-/-}								
	Controle		Ferro		Controle		Ferro					
	pD ₂	R _{máx}	pD ₂	R _{máx}	pD ₂	R _{máx}	pD ₂	R _{máx}				
ACh	7.25 ± 0.17	85 ± 3	7.05 ± 0.13	84 ± 4	7.27 ± 0.16	79 ± 3	$6.47 \pm 0.31*$	$73\pm7^{\#}$				
NPS	7.96 ± 0.07	99 ± 1	7.78 ± 0.16	101 ± 2	8.15 ± 0.13	101 ± 2	7.78 ± 0.16	101 ± 2				

Tabela suplementar 1. Efeito da sobrecarga de ferro na resposta vasodilatadora ($R_{máx} e pD_2$) à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio em aortas das linhagens C57 e apoE^{-/-}.

ACh: acetilcolina; NPS: nitroprussiato de sódio; R_{max} : resposta máxima; pD₂: log da metade da resposta máxima. Valores são expressos em médias \pm EPM. *P<0.05 apoE^{-/-} ferro vs. apoE^{-/-} controle e *P<0.05 apoE^{-/-} vs. C57 dentro da mesma condição experimental, pelo uso da ANOVA duas vias seguido do pós-teste de Fisher. O número de animais é indicado na figura 12.

Tabela suplementar 2. Efeito do L-NAME, indometacina e tiron na resposta vasoconstritora à fenilefrina ($R_{máx} e pD_2$) em aortas das linhagens C57 e apoE^{-/-}.

	C57				apoE ^{-/-}			
	Controle		Ferro		Controle		Ferro	
	pD ₂	R _{máx}	pD ₂	R _{máx}	pD ₂	R _{máx}	pD ₂	R _{máx}
VHC	6.99 ± 0.07	2.9 ± 0.2	7.19 ± 0.09	3.1 ± 0.2	6.91 ± 0.06	2.3 ± 0.2	7.09 ± 0.09	$3.3\pm0.1^{\#}$
LN	$7.35\pm0.12*$	$4.1\pm0.4*$	$7.59\pm0.06*$	$4.1\pm0.3*$	$7.18\pm0.09*$	$3.8 \pm 0.3*$	7.25 ± 0.11	3.7 ± 0.2
INDO	6.90 ± 0.05	$2.6\pm0.2*$	6.97 ± 0.13	$2.6\pm0.2*$	6.84 ± 0.11	$1.7 {\pm}~ 0.4{*}$	6.92 ± 0.13	$2.4\pm0.3*$
Tiron	6.87 ± 0.13	3.0 ± 0.3	7.17 ± 0.06	2.8 ± 0.2	6.87 ± 0.06	2.1 ± 0.3	6.89 ± 0.11	$2.4\pm0.4*$

 $R_{máx}$: resposta máxima; pD₂: log da metade da resposta máxima; VHC: veículo; LN: (L-NAME) NG-nitro-L arginine methyl ester; INDO: indometacina; Tiron: ácido 4,5-Dihydroxy-1,3-benzenedisulfonic. Valores são expressos em médias ± EPM. *P<0.05 vs. VHC pelo teste *t* pareado de Student e *P<0.05 apoE^{-/-} ferro vs. apoE^{-/-} controle, pelo uso da ANOVA duas vias seguida do pós-teste de Fisher. O número de animais é indicado nas figuras 13, 14, 16 e 18.

ANEXO – Artigo publicado referente à tese