

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

JANDINAY GONZAGA ALEXANDRE MAGESKI

**EFEITOS DA SOBRECARGA CRÔNICA DE FERRO SOBRE A
REPRODUTIVIDADE DE CAMUNDONGOS**

Vitória
2022

JANDINAY GONZAGA ALEXANDRE MAGESKI

**EFEITOS DA SOBRECARGA CRÔNICA DE FERRO SOBRE A
REPRODUTIVIDADE DE CAMUNDONGOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Leonardo dos Santos

Vitória
2022

Aos Amigos que Deus colocou em meu caminho.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a **Deus** por ter me escolhido e por sempre estar comigo, mesmo não merecendo. Em todas as situações difíceis que me consolou, me sustentou e por ter me dado alegria, realmente foram dias intensos. Agradeço, **Deus**, por ser meu melhor amigo e por ter colocado pessoas especiais em minha caminhada. Já estava tudo preparado, não teria conseguido sem Tua presença.

A minha **família** que amo tanto, cada um com sua particularidade. Minha **Mãe**, que fez de tudo para chegar onde chegamos, trabalhou com muita dificuldade para nos sustentar, você é uma guerreira. Minha **Irmã** querida, **Poliana**, que sempre esteve comigo, nunca me abandonou, esteve ao meu lado nos dias mais difíceis, mas me proporcionou lembranças incríveis desde a infância, eu te amo muito. A minha **sobrinha**, **Esther**, não sei nem como descrever como a amo. Estar longe de você corta meu coração, mas saber que sempre vou contar contigo me faz transbordar de alegria. Ao meu **cunhado**, **Jean** e ao meu **padrasto**, **Francisco**, obrigada pelo carinho, por sempre acreditar em mim e por trazer a família os momentos cômicos. Amo a todos.

A minha **nova família**, vocês são especiais. Meu **esposo**, **Cristiano**, obrigada por toda a compreensão e por me incentivar a melhorar sempre, com você as coisas são mais fáceis, Te amo. Aos meus **sogros**, **Edinha** e **Divino**, obrigada por me acolherem em sua casa. As minhas cunhadas, **Beatriz** e **Lorena**, os momentos de conversas sempre foram animados, ficaria por horas com vocês, obrigada por me aceitarem tão bem, Amo vocês. Meus **cunhados** (**Renato** e **Maycon**) e **sobrinho** (**Guilherme** e **Gustavo**), a diversão sempre esteve garantida com vocês, obrigada por tudo.

Agradeço aos meus professores da graduação Andressa, Cassiano, Clay, Florêncio, Giovanna, Gustavo, Lauer, Leonardo, Maria Elisa, Pedro, Tânia mara e em especial a minha querida professora, **Wanize Rocha**, por ter visto um potencial em mim que nem eu tinha capacidade de reconhecer. Obrigada pelos conselhos e por me apresentar a pessoas tão inteligentes. Você é espetacular.

Ao meu colega de experimentos **Vinicius Bermond**. Obrigada por compartilhar comigo um pouco de sua inteligência e de suas experiências. No mais,

te agradeço por me mostrar o laboratório que faria parte da minha vida e por me apresentar ao meu orientador.

Ao **Prof. Dr. Leonardo**, meu orientador. Obrigada por me aceitar como aluna desde a Iniciação Científica até o Mestrado. Por todas as discussões e trabalhos sugeridos. Te agradeço por me ensinar a fisiologia com tanto carinho e por me orientar nessa jornada até me descobrir uma cientista. Por esse trabalho e por me permitir fazer parte do grupo do “Léo” eu te agradeço.

A **Renata**, que me trouxe ensinamentos além do laboratório. Obrigada por me ensinar uma técnica juntamente ao **Marito**. Porém quero te agradecer pelas aulas, pelos momentos de risos e pelas conversas maravilhosas, você me incentivou muito durante todos esses anos.

A **Sabrina** e a **Rakel**, amigas de laboratório e de trabalho, agradeço por todas as conversas e lanchinhos que fizemos. Vocês trouxeram felicidades em momentos de exaustão.

Ao **LEMC**, desde os professores que são de uma inteligência extraordinária (Dalton, Ivanita, Alessandra), aos alunos com quem tive momentos de conversa e descontração no laboratório. Também aos colegas e professores da Pós-Graduação da UFES.

Aos colegas do **Laboratório de Endocrinologia e Toxicologia Celular (LETC)**, que me receberam muito bem. Em especial ao professor **Jones**, que teve toda paciência e disponibilidade de me explicar os procedimentos necessários, me acolhendo em seu laboratório com todo o respeito. Também, aos seus alunos, **Charles**, que sempre esteve à disposição e com bom humor, conseguia transformar o difícil em coisas simples, e a **Jeanini**, por toda a ajuda na parte histológica e nas conversas divertidas.

Agradeço aos colaboradores do HUCAM e ao Departamento de Química - UFES pela mensuração do ferro sérico e tecidual.

Aos meus amigos e familiares que me apoiaram mesmo à distância em orações. Meus **tios, Luciano e Adriana**, sempre me apoiando. Minha **amiga, Lara**, que muitas vezes veio a UFES pra me fazer companhia, você nem sabe como me ajudou. Ao mais novo integrante da família, meu **afilhado, Israel Fernando**, que amo tanto. Aos amigos próximos, **Larissa, Jordana, Josyelton e Gleison**. A todos,

muito obrigada.

À UFES e seus Departamentos e Laboratórios. A CAPES, a FAPES e o CNPQ pelo apoio financeiro.

Também a todos os animais que foram utilizados nessa pesquisa com o intuito de melhorar a ciência no nosso país.

Meus sinceros agradecimento de coração a todos.

Resumo

O ferro é um metal essencial para a homeostase corporal, adquirido a partir de uma dieta rica em carne vermelha e grãos e vegetais, porém a sobrecarga de Ferro (Fe) crônica pode causar danos em diversos órgãos como coração, vasos, fígado, pâncreas e, também, nos órgãos do sistema reprodutor. Estudos que avaliam os efeitos da sobrecarga de ferro no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG) na literatura são particularmente escassos. O objetivo desta dissertação é estudar os efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre o sistema reprodutor e a capacidade reprodutiva de camundongos fêmeas. Utilizamos camundongos fêmeas (C57BL/6) e dois grupos experimentais, o controle e o Fe 10 mg/Kg. Os animais destinados ao grupo Fe receberam injeções via intraperitoneal (i.p) de ferro-dextrano (10mg/kg/dia, 5x/semana), já, os animais do grupo controle receberam solução salina (NaCl a 0,9 %) no mesmo volume, condições e período de tempo. Consecutivamente, por 30 dias, foi avaliado o ciclo estral dos animais através de esfregaço vaginal devidamente corado com metanol, hematoxilina e eosina. Ao fim da exposição, um ensaio reprodutivo foi realizado com alguns animais e outros animais foram anestesiados e eutanasiados para a retirada e conseqüentemente obtenção dos órgãos envolvidos no eixo hipotálamo-hipófise-gonada para análises. Nos nossos resultados foi possível identificar diminuição do tamanho do ovário, útero e hipotálamo. Também foi perceptível o acúmulo de ferro no fígado, baço, hipotálamo, ovário e útero. O ciclo estral das camundongas apresentou-se desregulado. A histologia dos ovários demonstrou um prejuízo do desenvolvimento folicular, com redução numérica de corpo lúteo e aumento do número de folículos atrésicos. A histologia apresentou hipotrofia uterina. Mesmo com a supressão do Fe o ciclo estral não foi normalizado e quando quantificamos a ninhada, não foram registrados filhotes nas gaiolas dos animais pertencentes ao grupo Fe. Esses resultados sugerem que a exposição crônica ao ferro gerou hemossiderose, prejudicando os órgãos envolvidos no eixo hipotálamo-hipófise-gonada, promovendo uma taxa reprodutiva diminuída ou inexistente.

Palavras chave: Sobrecarga de ferro, disfunção endócrina, anormalidade no ciclo estral.

ABSTRACT

Iron is an essential metal for body homeostasis, acquired from a diet rich in red meat and grains and vegetables, but iron overload (chronic Fe) can cause damage to organs such as the heart, vessels, liver, pancreas and , also, in the organs of the reproductive system. Studies evaluating the effects of iron overload on the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis in the literature are particularly scarce. The objective of this dissertation is to study the effects of chronic iron overload on the reproductive system and reproductive capacity of female mice. We used female mice (C57BL/6) and two experimental groups, control and Fe 10 mg/Kg. The animals destined to the Fe group received intraperitoneal (i.p) injections of iron-dextran (10mg/kg/day, 5x/week), while the animals in the control group received saline solution (0.9% NaCl) in the same volume, conditions and time period. Consecutively, for 30 days, the estrous cycle of the animals was evaluated through a vaginal smear properly stained with methanol, hematoxylin and eosin. At the end of the exposure, a reproductive assay was performed with some animals and other animals were anesthetized and euthanized for removal and consequently obtaining the organs involved in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis for analysis. In our results, it was possible to identify a decrease in the size of the ovary, uterus and hypothalamus. It was also noticeable the accumulation of iron in the liver, spleen, hypothalamus, ovary and uterus. The estrous cycle of mice was deregulated. The histology of the ovaries showed impaired follicular development, with a numerical reduction of corpus luteum and an increase in the number of atretic follicles. Histology showed uterine hypotrophy. Even with Fe suppression, the estrous cycle was not normalized and when we quantified the litter, no pups were registered in the cages of animals belonging to the Fe group. These results suggest that chronic exposure to iron generated hemosiderosis, harming the organs involved in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, promoting a reduced or non-existent reproductive rate.

Keywords: Iron overload, endocrine dysfunction, estrous cycle abnormality.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo do ferro.....	17
Figura 2: Regulação da absorção do ferro.....	18
Figura 3: Regulação da concentração do ferro.....	19
Figura 4: Representação do Sistema Reprodutor feminino.....	27
Figura 5: Esquematização da liberação hormonal do Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonadal.....	29
Figura 6: Representação do Modelo Experimental.....	33
Figura 7: Caracterização das fases do ciclo estral mediante alterações hormonais.....	34
Figura 8: Imagem Representativa do ensaio Reprodutivo.....	38
Figura 9: Efeito da sobrecarga de ferro sobre o peso corporal (A), ovariano (D), uterino (F), hipofisário (E) e hipotalâmico (G).....	38
Figura 10: Níveis de ferro tecidual.....	40
Figura 11: Análise do ciclo estral.....	41
Figura 12: Efeitos da sobrecarga crônica sobre a histomorfologia ovariano.....	43
Figura 13: Efeitos da sobrecarga crônica sobre a histomorfologia uterina.....	44
Figura 14: Avaliação do ciclo estral. Confirmação da copulação	45
Figura 15: Representação gráfica da avaliação reprodutiva de camundongos fêmeas Ct e Fe.....	45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACES

°C - Graus Celsius

•OH - Radical hidroxila

% - Porcentagem

µL - Microlitros

µm - Micrmetro

An - Folículo Antral

ANOVA - Análise de Variância

At - Folículo Atrsico

BMP - Proteína morfogenética óssea

C57BL/6 - Camundongo

CEUA - Comissão de tica em Uso de Animais

CL - Corpo Lúteo

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CON - Controle

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentao Animal

Ct - Controle

Dctyb - Citocroma b redutase 1

dL - Decilitro

DF - Doenças falciformes

DMT1 - Transportador de metal divalente 1

DNA - cido desoxirribonucleico

End - Endométrio

EPM - Erro padrão da média

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

Fe - Ferro

Fe²⁺ - Ferro ferroso

Fe³⁺ - Ferro férrico

FeCl₃ - Cloreto de ferro

FSH - Hormônio Folículo-estimulante

GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofinas

g - Grama

h - Horas

HAMP - Gene que codifica a hepcidina

HbB - Gene beta globina

H₂O - Água

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HCP1 - Proteína transportadora heme-1

H&E - Eosina e hematoxilina

HFE - gene

HH - Hemocromatose Hereditária

HHG - Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal

HJV - Hemojuvelina

HNO₃ - Ácido Nítrico

i.p - via intraperitoneal

ICP-OES - Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente

IRE - Elementos reguladores de ferro

IRON - Ferro

Kg - Quilograma

LH - Hormônio Luteinizante

mg - Miligrama

mL - Mililitro

MYO - miométrio

NaCl - Cloreto de sódio

nm - Nanômetro

NO - Óxido Nítrico

O₂⁻ - Ânion superóxido

O₂ - Oxigênio

OH⁻ - radical hidroxila

Redox - Reações de oxidação-redução

RM - Ressonância Magnética

RNA - Ácido ribonucleico

ROS - Espécies reativas de oxigênio

Steap4 - Six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 4

TfR - Receptor da transferrina

UFES - Universidade Federal do Espírito Santo

USA - Estados Unidos da América

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
Ferro	16
Sobrecarga de ferro	20
Efeitos da sobrecarga de ferro sobre os sistemas orgânicos	23
Impactos sobre o sistema reprodutor feminino	24
O Sistema Reprodutor Feminino	26
Ciclo reprodutivo de roedores	28
Eixo Hipotálamo - Hipófise - Gônada (HHG)	28
Justificativa e Hipótese	30
OBJETIVOS	31
Objetivo Geral	31
Objetivo Específico	31
MATERIAL E MÉTODOS	32
Animais utilizados	32
Protocolos experimentais	32
Exposição crônica ao ferro	32
Análise do ciclo estral	33
Análise dos níveis de ferro circulante e tecidual	35
Histologia	36
Ensaio reprodutivo	37
Análise Estatística	38
RESULTADOS	39
Efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre o peso do animal e dos órgãos do eixo hipotálamo-hipófise-gônada	39
O teor de ferro no soro e nos órgãos	40
Efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre o ciclo estral das camundongas	41
Efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre a morfologia dos ovários	42
Efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre a morfologia uterina	43
Efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre a reprodutividade - ensaio de reprodução	44
DISCUSSÃO	47
CONCLUSÃO	52
Referências	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ferro

O ferro (Fe) é um elemento químico indispensável nas interações biológicas da maioria dos seres vivos, com alta capacidade de participar das reações de oxidação-redução (Redox) devida a sua facilidade em doar e receber elétrons (ANDREWS, 2000; GROTTTO, 2008; 2010). Abundantemente encontrado na natureza na forma de mineral, o ferro desempenha um papel essencial à homeostase celular e orgânica (DEV; BABITT, 2017; GROTTTO, 2008; 2010).

Nos vertebrados, o ferro participa de diversos mecanismos fisiológicos, dentre eles a ligação e o transporte de oxigênio através da hemoglobina e mioglobina, síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA), a ação como cofator enzimático na cadeia respiratória mitocondrial, além da sua essencialidade para a formação da molécula heme (DEV; BABITT, 2017; GROTTTO, 2008; 2010; FRANCHINI, 2008). O metal pode se apresentar em sua forma férrica (Fe^{3+}) ou interconverter à forma ferrosa (Fe^{2+}) (ANDREWS, 2000; DEV; BABITT, 2017).

A figura 1 ilustra o ciclo do ferro no nosso organismo. Ele pode ser absorvido de duas formas: inorgânico e heme. Normalmente é adquirido pelos seres humanos pela dieta rica em carnes vermelhas e derivados, na forma heme; e por vegetais e grãos, na forma inorgânica. A absorção é de apenas 1-2 mg de ferro em uma dieta normal de 13-18 mg de ferro. Além disso, a reciclagem de hemácias senescentes é outra fonte de ferro para a circulação (DEV; BABITT, 2017; GROTTTO, 2008; 2010).

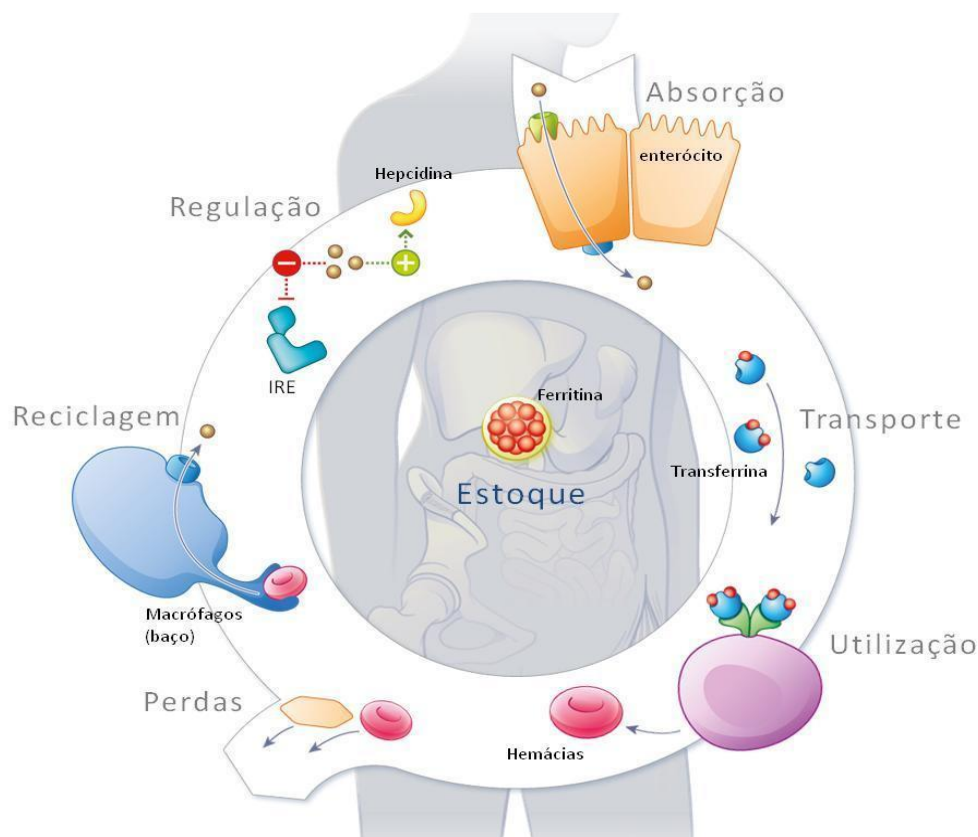


Figura 1: Ciclo do ferro. Seu transporte ligado à transferrina ou como parte da hemoglobina nas hemácias, estoque na forma de ferritina, e sua regulação pela hepcidina e ferroportina. A hepcidina controla o fluxo de ferro, induzindo a endocitose e proteólise da molécula que exporta o ferro, ferroportina. Modificado a partir de www.ironatlas.com.

A entrada do ferro ocorre no epitélio duodenal (Figura 2), onde os enterócitos absorvem o metal através da proteína transportadora heme1 (HCP-1) e o transportador de metal divalente (DMT-1). O Fe^{+3} , comum nos alimentos vegetais, não pode ser absorvido diretamente, desta forma, enzimas ferrirredutases na membrana celular o reduzem à forma ferrosa, Fe^{+2} , atravessando a membrana apical da célula pelo DMT-1. Em contrapartida, o ferro-heme é prontamente absorvido pela HCP-1 (DEV; BABITT, 2017; GROTTTO, 2008; 2010; KOHGO, 2008).

No meio intracelular certa quantidade de ferro é convertida novamente em Fe^{+3} , ligando-se à ferritina, que funciona como reservatório e, quando necessário, esse complexo é desacoplado para a distribuição. O ferro captado pode ainda ser utilizado em processos metabólicos do próprio enterócito ou ser excretado para a circulação. O

direcionamento do metal à circulação é possível por intermédio da ferroportina, a principal exportadora de ferro basolateral (DEV; BABITT, 2017; GROTTTO, 2008; 2010).

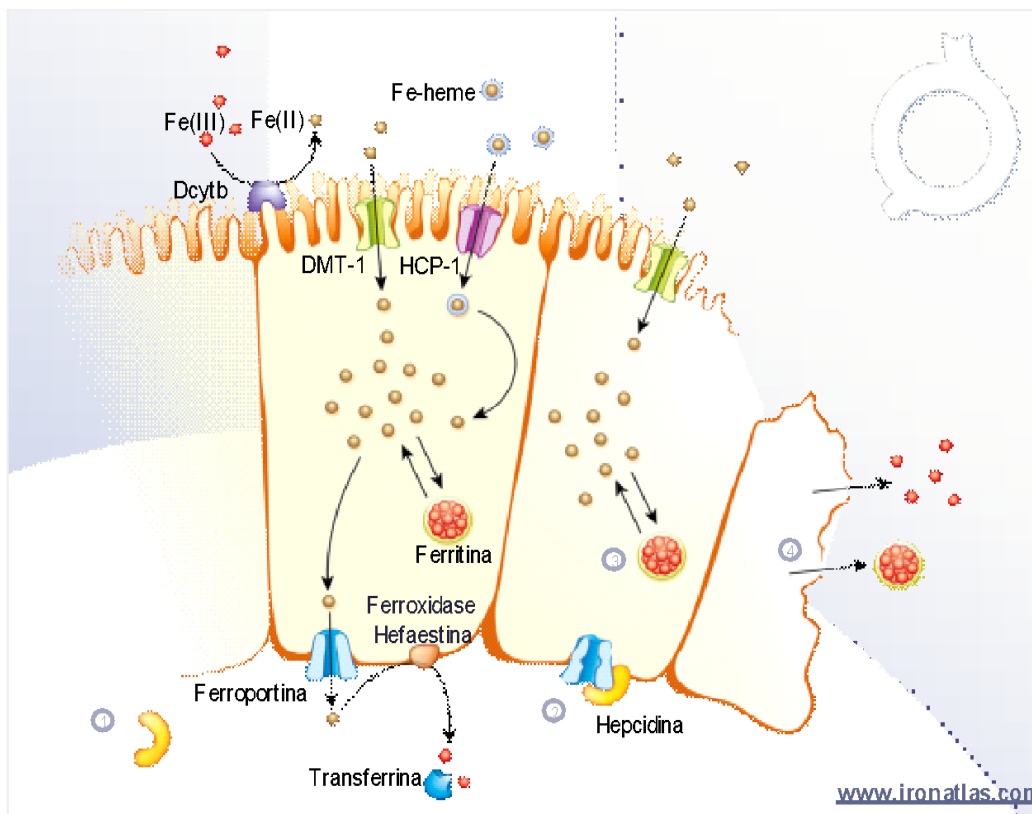


Figura 2: Regulação da absorção do ferro. 1) Redução de Fe^{+3} em Fe^{+2} ; 2) Entrada do Fe^{+2} nos enterócitos; 3) Armazenamento na ferritina; 4) Absorção para a corrente sanguínea pela ferroportina; 5) Conversão de Fe^{+2} em Fe^{+3} pela hefaestina; 6) transporte do Fe^{+3} na corrente sanguínea pela transferrina. Modificado a partir de www.ironatlas.com.

Na membrana basolateral do enterócito, o Fe^{+2} é oxidado em Fe^{+3} , pela ação oxidativa da ferroxidase hefaestina. A transferrina, uma proteína plasmática, se acopla com até dois íons de ferro férrico e permite a distribuição e a entrada do metal nas células que possuem os receptores de transferrina (TfR), por meio de endocitose. Dentro das células o ferro pode ser utilizado de acordo com sua finalidade, já descrita anteriormente (DEV; BABITT, 2017; GROTTTO, 2008; 2010; MUÑOZ; VILLAR; GARCÍA-ERCE, 2009).

Sabe-se que não existem meios ativos para a excreção deste elemento no corpo, seu balanço é mantido pela regulação da absorção do ferro no intestino mediado pela ação da hepcidina, hormônio secretado pelo fígado quando há níveis aumentados de ferro (VANOAIKA et al., 2010), pelos elementos reguladores de ferro (IRE) a nível celular (DEV; BABITT, 2017) e, nas mulheres também, através da menstruação, (GROTTO, 2010; KUSHNER et al., 2001).

Quando os níveis de ferro aumentam na corrente sanguínea, os hepatócitos detectam esse crescimento, logo produzem e secretam o principal hormônio regulador negativo do ferro, a hepcidina (Figura 3). Estes, que por sua vez são direcionados aos enterócitos e interagem com ferroportina. Esse complexo hepcidina-ferroportina é endocitado e a proteína ferroportina é degradada. Conseqüentemente há um bloqueio na liberação do ferro para a circulação, aumentando o ferro intracelular nos enterócitos, resultando na diminuição da absorção do metal. O ferro retido no epitélio duodenal será posteriormente eliminado nas fezes entre 1 e 2 dias, devido a renovação fisiológica dos enterócitos (DEV; BABITT, 2017; GROTTO, 2010; KUSHNER et al., 2001; LEMOS et al. 2010).

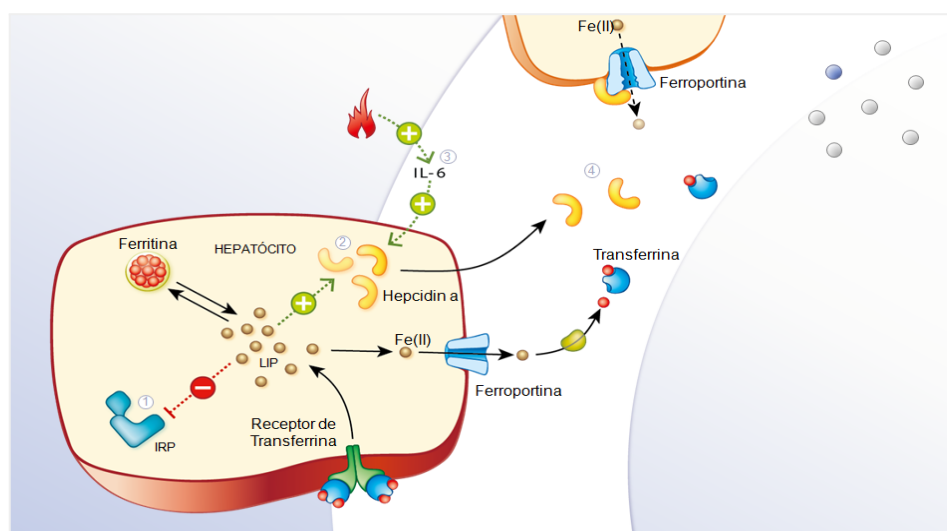


Figura 3: Regulação da concentração do ferro. 1) Receptores de transferrina recebem o Fe no hepatócitos; 2) Detecção do aumento da concentração de Fe; 3) Liberação de hepcidina na corrente sanguínea; 4) hepcidina ligada a ferroportina. Modificado a partir de www.ironatlas.com.

1.1.1 Sobrecarga de ferro

Quando não há o equilíbrio entre a absorção, utilização e excreção do ferro no corpo e, os mecanismos que geram uma carga excessiva de ferro no organismo não podem ser adequadamente balanceados pelos processos naturais de sua excreção, há uma saturação das proteínas transportadoras, aumento da porção de ferro livre na circulação e, dessa forma, o acúmulo deste metal nos tecidos. Esta situação se denomina sobrecarga de ferro, que pode decorrer tanto por uma dose única e excessiva de ferro, quanto por acúmulo crônico proveniente de hiperabsorção a partir da dieta, do uso inadequado de sais de ferro ou de transfusões sanguíneas repetidas (FIBACH & RACHMILEWITZ, 2017; PIERRE, 2018)

Existem várias doenças e condições em que se notam sinais e sintomas relacionados aos danos celulares decorrentes do excesso de ferro, e inclusive algumas causas genéticas foram identificadas. Dentre essas, a melhor compreendida atualmente é a Hemocromatose Hereditária (HH) (GOLFEYZ; LEWIS; WEISBERG, 2018; GUPTA; MUSALLAM; TAHER; RIVELLA, 2018).

A HH é uma doença genética autossômica recessiva caracterizada por hiperabsorção de ferro pela dieta (FEDER et al., 1996; MERRYWEATHER-CLARKE et al., 1998). Já foram identificados alguns polimorfismos em genes que codificam importantes elementos relacionados ao metabolismo do ferro (HFE, HJV, HAMP e TFR2), como subjacentes e essa causa genética (primária) de sobrecarga de ferro (GRIFFITHS, 2021; NIEDERKOFER; SALIE; ARBER, 2005). O acúmulo de ferro no organismo atinge as células parenquimatosas manifestando-se por fadiga, depressão, pigmentação da pele e artralgia, mas também doença hepática com progressão para cirrose, com maior risco de carcinoma hepatocelular, diabetes, cardiopatias e arritmias, hipogonadismo, impotência, entre outros (KROOT et al., 2011; SWINKELS & FLEMING, 2011; ZHANG; ZHABYEYEV; WANG; OUDIT, 2018; PELUS, 2016). Na verdade, no coração a sobrecarga de ferro da HH causa cardiomiopatia com arritmias e disfunção ventricular, levando à insuficiência cardíaca e representando a maior causa

de morte nesses pacientes (BRANDHAGEN et al., 2002).

Além dessa causa primária associada à sobrecarga de ferro, em que há uma exacerbação do processo absorptivo de ferro proveniente da dieta devido a defeitos genéticos; as formas secundárias, algumas vezes denominadas hemossideroses, também podem conduzir a morbimortalidade importante e estão normalmente associadas a outras doenças (GUPTA; MUSALLAM; TAHER; RIVELLA, 2018). As sobrecargas secundárias estão relacionadas principalmente às doenças hepáticas, hemolíticas, e outras condições associadas à transfusão periódica de concentrado de hemácias, levando à sobrecarga crônica de ferro. Devido às repetidas transfusões de sangue, esses pacientes podem acumular ferro a uma taxa alta de 0,3-0,5 mg/kg por dia. Em uma pessoa de 60 kg, isso significa uma adição de aproximadamente 10 g de ferro por ano, enquanto são realizadas transfusões, o que gera uma carga crescente que permanecerá pelo resto de sua vida. Entre as doenças mais frequentemente associadas à sobrecarga transfusional, a talassemia beta maior se destaca (KUSHNER et al., 2001). A talassemia beta maior é um tipo de hemoglobinopatia de cunho hereditário em que se observa um prejuízo total ou parcial na síntese de globina beta, sendo um tipo de anemia hemolítica que culmina na necessidade de repetidas transfusões de sangue ao longo da vida (VICHINSKY, 2005). De acordo com o Ministério da Saúde, não há dados sobre a incidência de sobrecarga de ferro transfusional no Brasil, mas em vez disso, pode-se estimar a população que demanda transfusões frequentes e, conseqüentemente, têm risco de sobrecarga de ferro. As doenças falciformes são hemoglobinopatias com prevalência elevada da região da bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio, subcontinente indiano, Ásia Central, Extremo Oriente e no Continente Africano (BRASIL, 2002; 2015; CAO A; GALANELLO, 2010; JESUS, 2018; MELONI et al., 2022). A beta talassemia apresenta incidência de quase 3% na população mundial (JALIL et al., 2019), já a anemia falciforme é uma doença autossômica recessiva comum no Continente Africano, e estima-se que, em algumas partes da África, a incidência de pessoas com traços da doença chegue a 25% (BRASIL, 2015). Devido aos movimentos migratórios forçados dos escravos, as doenças falciformes chegaram ao Brasil. 2% da população brasileira é portadora dos traços da doença e entre os negros esse valor se eleva a 6-10% (BRASIL, 2001; 2015).

São mais de 8000 casos confirmados no Brasil, com estimativa de 700 a 1000 crianças nascidas com a doença anualmente, afetando principalmente a população de negros e pardos (BRASIL, 2015).

Na literatura, há décadas, existem trabalhos publicados com modelos animais que induzem a sobrecarga de ferro em humanos. Iacun, em 1988, analisou experimentos animais de sobrecarga de ferro, com o intuito de encontrar o melhor modelo que pudesse simular a sobrecarga de ferro. Foi possível observar que os estudos iniciais com microscopia que utilizavam injeções intraperitoneais de ferro-dextrano ou ferro-sorbitol-ácido-cítrico podiam induzir uma sobrecarga de ferro hepática. Da mesma forma animais tratados com ferro-dextrano ou hemácias homólogas desnaturadas provocaram alterações na biópsia fígado semelhante ao encontrado em bebês com beta talassemia. De fato não existe apenas um único modelo experimental utilizado, que mimetize todos os sinais e sintomas da sobrecarga de ferro, mas os modelos citados foram importantes para a elucidação do mecanismo de toxicidade da sobrecarga de ferro (IACUN, 1988).

Em 1964 e 1979 foram publicados os dois primeiros artigos descrevendo as cardiomiopatia e insuficiência das sobrecargas de ferro primária e secundária em humanos (ENGLE, 1964; LEON, 1979). Modelos experimentais com sobrecarga de ferro em animais corroboram com os dados anteriores de comprometimento cardiovascular (ÁVILA et al., 2016b; BERTOLI et al., 2018; MARQUES et al., 2016 e 2019; RIBEIRO Jr et al., 2017). Prasnicka et al (2019) realizaram um protocolo de 8 injeções intraperitoneais em dias alternados de ferro para avaliar o funcionamento hepático. Entre os resultados foi constatado a diminuição da produção e excreção de ácidos biliares do fígado. Em 1980 Richter apresentou um modelo onde injetou em ratas adultas ferro-dextrano por via intraperitoneal e, por meio de microscopia eletrônica, constatou nefropatia, com lesões nos glomérulos e túbulos proximais. Lu e colaboradores, em 1991, induziram a sobrecarga de ferro em ratos wistar com Fe³⁺-NTA, via intraperitoneal e observaram o aumento do depósito de ferro nas células beta pancreática. Ross et al (2015) apresentou em seus resultados alterações no eixo hipotálamo-hipófise-gônada quando os animais foram submetidos a intoxicação de

ferro das doses de 250 mg/kg, 500 mg/kg e 1000 mg/kg. Na literatura pouco se encontra acerca dos efeitos do ferro sobre o sistema endócrino, ainda mais seletivos os estudos a respeito do sistema reprodutor feminino e a reprodução.

1.1.2 Efeitos da sobrecarga de ferro sobre os sistemas orgânicos

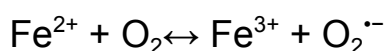
Estudos apontam os efeitos que a sobrecarga de ferro desempenham sobre os sistemas há décadas. Sinais e sintomas característicos são descritos em modelos experimentais com ratos e camundongos, e no modelo clínicos. Como já elucidado, o ferro não apresenta mecanismo de excreção apropriado e o excesso do mineral no organismo pode acumular nos tecidos, conhecido como hemossiderose. a hiperpigmentação causada por acúmulo de ferro na camada basal da epiderme é o sinal mais comum nos modelos estudados (SIDDIQUE; KOWDLEY, 2012).

Sabe-se que o fígado é o principal órgão responsável por metabolizar o ferro no corpo (ANDERSON; SHAH, 2013). Alterações morfológicas e funcionais no sistema hepático são frequentemente descritas nos trabalhos analisados em modelo de sobrecarga de ferro (ANDERSON; SHAH, 2013; KRIEGER; PEREIRA, 2012; SANTOS et al., 2012; SIDDIQUE; KOWDLEY, 2012). O depósito de ferro e o aumento do órgão são observados em sua grande totalidade (BACON; BRITTON, 1990; DI BISCEGLIE et al., 1992). Outros estudos apontam ainda que a sobrecarga pode levar a fibrose e a cirrose (ANDERSON; SHAH, 2013).

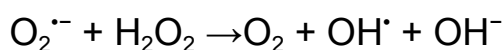
Ainda o acúmulo de ferro vem sendo associado a doenças neurodegenerativa, aumentando o risco para carcinoma hepatocelular, acúmulo de ferro nos rins e problemas osteoarticulares (DEV; BABITT, 2017).

O sistema cardiovascular também é afetado com a sobrecarga de ferro. Ao longo dos últimos anos, nosso grupo tem demonstrado em modelos animais que a sobrecarga de ferro, por si só, é capaz de causar alterações cardiovasculares importantes incluindo depressão da contração cardíaca (ARTMAN et al., 1982; 1984a;

1984b; ÁVILA et al., 2016b), disfunção da reatividade vascular da aorta (MARQUES et al., 2016 e 2019), leito mesentérico (RIBEIRO Jr et al., 2017) e artéria pulmonar (BERTOLI et al., 2018). Todos esses efeitos são, em grande parte, decorrentes e mediados por estresse oxidativo. De fato, o ferro livre no organismo deve ser mantido em baixas concentrações, pois possui fácil inter-conversão entre Fe^{2+} e Fe^{3+} , o que o torna bastante reativo em processos de redução-oxidação (PIERRE & FONTECAVE, 1999; GUDJONCIK, 2014), por exemplo, convertendo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em radical hidroxila (OH^\bullet), pela reação de Fenton, que é altamente danosa a moléculas essenciais à homeostase celular tais como lipídios de membrana, proteínas e ácidos nucleicos, tal como RNA e DNA (EDISON et al., 2008).



Reação de Fenton



Reação de Haber-Weiss

O sistema endócrino também é afetado pela sobrecarga de ferro. O comprometimento do fígado, pâncreas e hipófise pelo acúmulo do metal já é bem estabelecido (SIDDIQUE & KOWDLEY, 2012). Estudos relatam que a inflamação causada pelo depósito de ferro no pâncreas pode diminuir a secreção de insulina pelas células beta (SIDDIQUE & KOWDLEY, 2012). Na literatura também é mencionado disfunções tireoidianas (EDWARDS et al., 1983), além de efeitos deletérios sobre o sistema endócrino-reprodutor feminino como hipogonadismo (ROSSI et al., 2015; SIMINOSKI et al., 1990).

1.1.3 Impactos sobre o sistema reprodutor feminino

Como já explanado, a sobrecarga de ferro têm um grande impacto negativo

sobre vários sistemas (hepático, cardiocirculatório, pulmonar, pancreático, ósseo, endócrino). Estudos anteriores indicam que o sistema reprodutor também é afetado em situações de intoxicação por ferro. Paciente com hemocromatose e doenças falciformes (DF) apresentam sinais e sintomas característico da exposição ao metal.

Atualmente são feitos estudos utilizando a ressonância magnética (RM) em pacientes com hemocromatose ou em pacientes que necessitam de múltiplas transfusões sanguíneas, como é o caso da beta talassemia, para identificar a sobrecarga de ferro e pontos de hemossiderina em órgãos alvos (BHALLA, 2021; LABRANCHE et al., 2018; WOOND et al., 2016). Esse recurso também é utilizado para detectar o acúmulo de ferro na pituitária. Gillardin et al (2013) e Manara et al (2019), detectaram o aumento do teor de ferro em estruturas cerebrais de pacientes com hemocromatose e com beta talassemia, respectivamente. Estudos com esse equipamento indicaram que é possível detectar o depósito de ferro em paciente com beta talassemia maior na primeira infância em 25% dos casos (NOETZLI et al., 2011). Outros estudos, realizados recentemente, demonstraram, por RM, a redução da hipófise em pacientes que precisam fazer transfusões de sangue repetidas (BERLINER et al 2022).

O hipogonadismo é uma alteração gonadal encontrada nos modelos experimentais com roedores fêmeas (ROSSI et al., 2016; QIN et al., 2021). Em seres humanos também foi observado o hipogonadismo em homens (SALENAVE et al., 2012; DE SANCTIS et al., 2017) e em mulheres (HAGAG, 2016) com sobrecarga primária e secundária. Outras modificações testiculares, danos material genético de célula reprodutora masculina (DORESWAMY, 2005; LUCESOLI et al., 1995; 1999; WELLEJUS et al., 2000) e alterações ovarianas (SKORDIS et al., 2004; UYSAL et al., 2017). Sabendo de todas essas alterações, a incapacidade reprodutiva também foi um parâmetro mencionado, na literatura, em humanos condicionados ao aumento de ferro corpóreo (CASTALDI, 2016).

1.2 O Sistema Reprodutor Feminino

A reprodução é um ato biológico fundamental à vida, e a partir dela permite-se o crescimento populacional e o compartilhamento genético (CURI, 2009; MARTINI et al., 2009; WILLIAMS, 2012). O sistema reprodutor corresponde a conexão dos órgãos responsáveis pelas funções sexuais e reprodutivas, que nas mulheres é composto por dois ovários, dois oviductos (ou tubas uterinas), o útero, o canal vaginal - estes se localizam na cavidade abdominal inferior - e pela vulva (ou genitália externa) - localizada na região externa (figura 4).

O desenvolvimento desses órgãos está incompleto até o início da puberdade, marcado pelo aumento da produção dos hormônios gonadotróficos estimulado pelo hipotálamo e secretados pela hipófise (CURI, 2009; GUYTON & HALL, 1996; 2011; LESLIE et al., 2007; WILLIAMS, 2012). Neste período da adolescência os gametas, os espermatozóides e os óvulos, masculinos e femininos respectivamente, são maturados (MARTINI et al., 2009; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2017; WILLIAMS, 2012).

Mulheres em período fértil, em sua grande maioria mensalmente, iniciam suscetíveis alterações morfofuncionais em seu sistema reprodutor por intermédio das variações hormonais, conhecido como ciclo menstrual. No córtex ovariano de uma mulher saudável, ao longo do ciclo, ocorre a produção do óvulo, derivadas dos folículos ováricos (LESLIE et al., 2007; WILLIAMS 2012; JUNQUEIRA e CARNEIRO 2017). Semelhantemente, há variações de tamanho das camadas do útero devido o aumento da concentração de hormônios estrógenos e a privação do mesmo promove o descamamento do endométrio (CURI, 2009; (MARTINS, 2009; WILLIAMS, 2012; MOORE, 2016; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2017). Já no canal vaginal o ciclo menstrual modifica o conteúdo celular da vagina. Sabe-se que certa quantidade de leucócitos e neutrófilos são residentes neste tubo e em determinadas fases do ciclo menstrual eles invadem o lúmen alterando as células. Nos roedores, o conteúdo do canal vaginal é coletado para análise do ciclo estral JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2017; SILVERTHORN 2017).

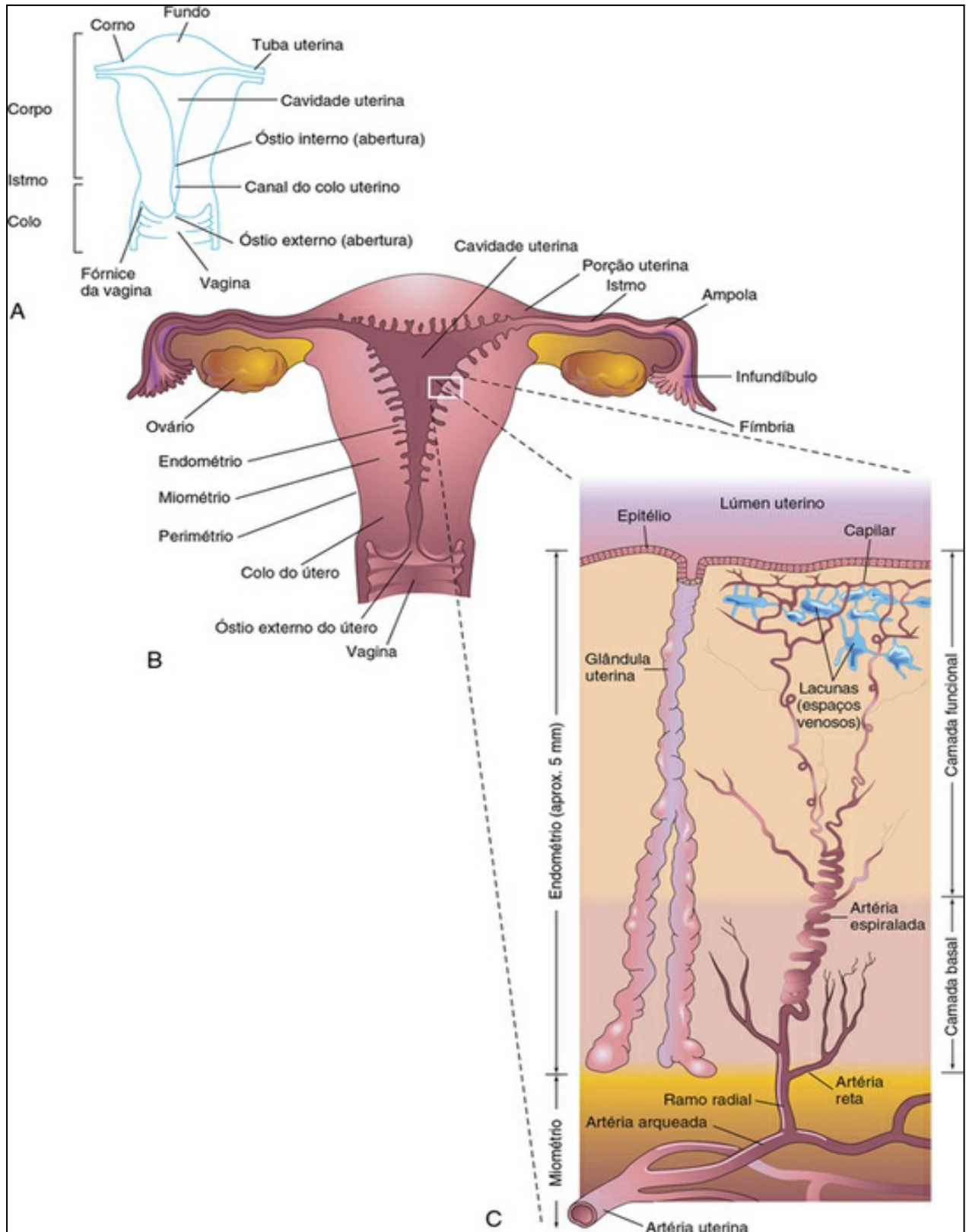


Figura 4: Representação do Sistema Reprodutor feminino. Adaptadas de Moore et al. 2016 - Embriologia Clínica

1.3 Ciclo reprodutivo de roedores

Nos roedores o ciclo reprodutivo chama-se ciclo estral. Pode ser analisado a partir da coleta de células coletadas do canal vaginal, pois o epitélio vaginal reage às variações dos hormônios ovarianos. Com duração de 4 a 5 dias, o ciclo apresenta 4 fases: **proestro, estro, metaestro e diestro**.

O ciclo “inicia-se” pela fase de **proestro**, que apresenta duração de 12-14 horas, esta fase é conhecida como fase folicular ou pré-ovulatória nas mulheres. Neste momento há um aumento nos níveis de estradiol que, conseqüentemente, estimulam a produção de GnRH pelo hipotálamo. Por sua vez, estimula a secreção de LH e de FSH na circulação. Os ovários são incitados a concluírem a produção do gameta e promover a ovulação. É visível a presença de células nucleadas no esfregaço vaginal. Na fase ovulatória, **estro**, os níveis de estrogênio diminuem levemente e, no esfregaço, é possível ver a presença de células irregulares e anucleadas cornificadas por um período de duração de 25-27 horas. Durando de 6-8 horas, a próxima é a fase de **metaestro**, que coincide com o início da produção do corpo lúteo. Há a elevação dos níveis de progesterona e a parede vaginal está mais delgada. Na coleta vaginal é possível detectar a presença de leucócitos, porém como esta é uma fase de transição, todas as outras células também são visualizadas (células nucleadas, células irregulares e anucleadas cornificadas). Por fim a fase mais longa, **diestro**, durando em média 55-57 horas. Quando não há fecundação o corpo lúteo começa a regredir e os níveis de progesterona também diminuem. No esfregaço há a predominância de leucócitos (HUBSCHER et al., 2005; WESTWOOD, 2008).

1.4 Eixo Hipotálamo - Hipófise - Gônada (HHG)

O GnRH, Hormônio Liberador de Gonadotrofina, produzido na porção basal medial do hipotálamo, por neurônios parvocelulares localizado nos núcleos arqueados do hipotálamo, é responsável pelo desenvolvimento e manutenção corporal e celular (WILLIAMS). É secretado no sistema porta hipotalâmico-hipofisário e atua sobre os

receptores acoplados à proteína G na hipófise, estimulando as células gonadotróficas da porção anterior da pituitária, que por sua vez, secreta o hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) na circulação sobre as gônadas de ambos os sexos (ovário e testículos) (ASIMAKOPOULOS, 2012; MOORE et al., 2013; FILICORI et al, 1986; MAGIAKOU et al, 1997).

Nas gônadas femininas os hormônios hipofisários estimulam as células a produzirem os gametas. Os ovários também funcionam como glândulas que secretam hormônios como a progesterona e o estrogênio, como já elucidado. Estas sinalizam para os neurônios no hipotálamo produtores de GnRH, como forma de feedback. O eixo desempenha um papel importante em toda a vida reprodutiva sobre o trato reprodutor (ASIMAKOPOULOS, 2012; MOORE et al., 2013).

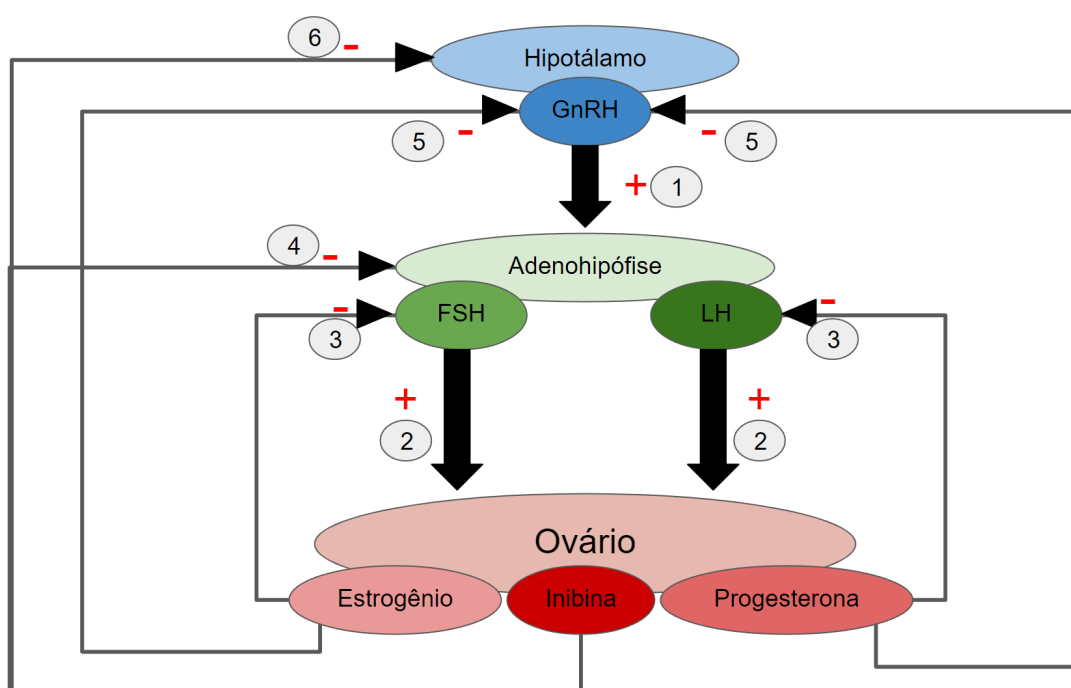


Figura 5: Esquemática da liberação hormonal do Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonadal. 1- GnRh estimulando a hipófise; 2- FSH e LH estimulando a gônada; 3- Progesterona e Estrogênio inibindo a hipófise; 4- Inibina inibindo a hipófise; 5- Progesterona e Estrogênio inibindo o hipotálamo; 6- Inibina inibindo o hipotálamo.

1.5 Justificativa e Hipótese

Os danos causados pelo sobrecarregado de ferro, primária e secundária, muitas vezes são irreversíveis. Estudos comprovam que pacientes com excesso de ferro apresentam aumento do estresse oxidativo, cardiopatias, problemas circulatórios, insuficiência renal e hepática, modificações das células beta pancreáticas, além de alterações no eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal. Porém ainda está pouco esclarecido na literatura quais são os impactos da sobrecarga de ferro crônica sobre o sistema reprodutor e a capacidade reprodutiva dos indivíduos do sexo feminino. Deste modo, apresentando a hipótese de que exposição crônica ao ferro modifique a histologia dos órgãos do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal, reduzindo a capacidade reprodutiva de camundongos fêmeas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre o sistema reprodutor e a taxa reprodutiva de camundongos fêmeas

2.2 Objetivo Específico

- Constatar as alterações associadas a sobrecarga de ferro nos órgãos do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal-uterino e nos níveis séricos;
- Identificar os impactos da sobrecarga crônica de ferro sobre o ciclo estral de camundongos;
- Avaliar os efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre a histomorfologia do tecido ovariano e uterino de camundongos;
- Avaliar o impacto da sobrecarga crônica de ferro sobre taxa de reprodução de camundongos fêmeas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais utilizados

Foram utilizados camundongos C57BL/6 fêmeas em idade adulta (5 meses de idade, entre 22-30g), cedidos pelo Laboratório de Fisiologia Translacional da UFES. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas sob condições controladas de temperatura de aproximadamente 25°C e um ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água tratada e à ração especial para roedores. O projeto e os protocolos estão de acordo com os princípios éticos da Diretriz Brasileira para Cuidado e Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos estabelecidos pelo CONCEA em 2016, e aprovados pela comissão de ética para Experimentação e Uso de Animais (86/2015 CEUA-UFES).

3.2 Protocolos experimentais

3.2.1 Exposição crônica ao ferro

Os camundongos fêmeas C57BL/6 foram divididos aleatoriamente em dois grupos: controle (Ct, n=20) e com sobrecarga crônica de ferro (Fe, n=20). Para estabelecer o quadro de sobrecarga de ferro, os animais foram submetidos à exposição crônica ao metal, por meio de injeções no quadrante inferior direito do abdômen (via intraperitoneal, i.p) de ferro dextrano (Ferrodex®, 10%, Fabiani Saúde Animal Ltda, São Paulo, Brasil). O protocolo foi constituído de doses diárias de 10 mg Fe/camundongo, 5 vezes na semana, com intervalo de pausa de 2 dias, por um período de 4 semanas, totalizando 20 injeções por camundongo conforme o desenho experimental ilustrado na figura 6.

Os animais do grupo controle foram expostos às mesmas condições ambientais do grupo Fe, porém, substituindo do protocolo de exposição ao ferro por injeções intraperitoneais de solução salina (NaCl 0,9%) com o mesmo volume.

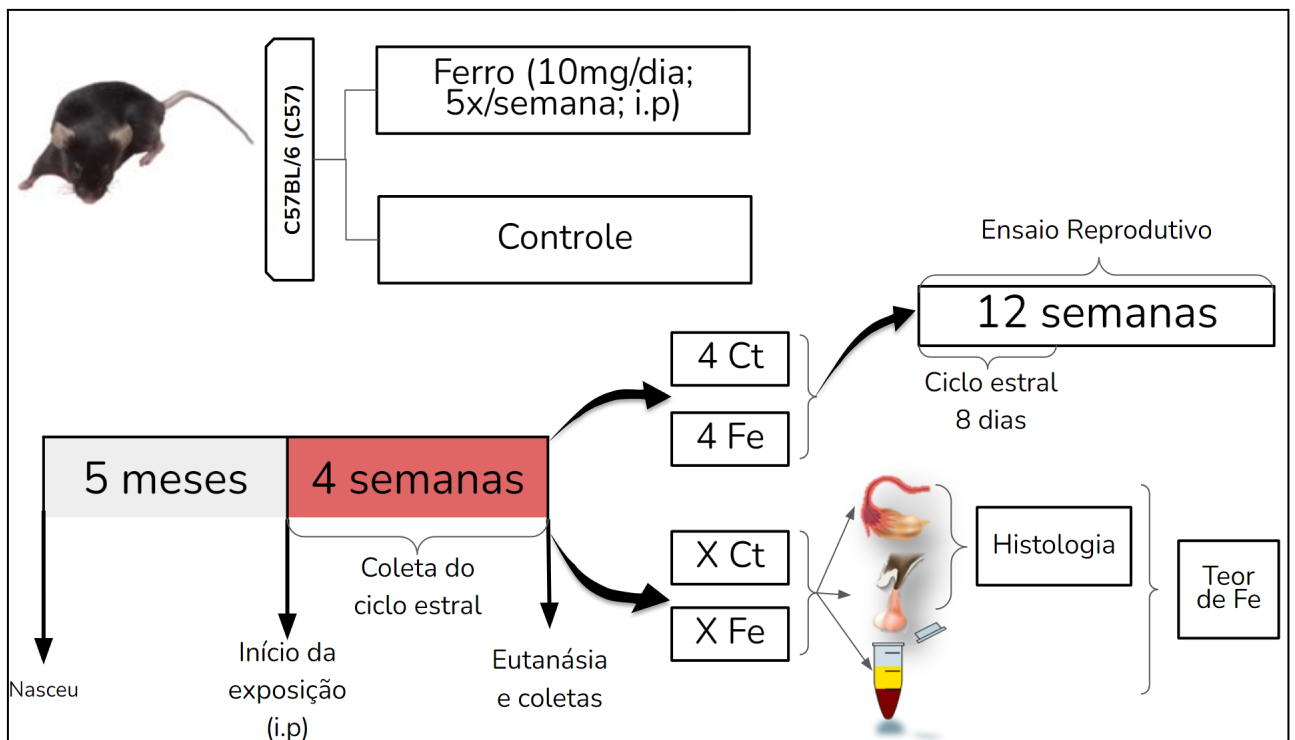


Figura 6: Representação do Modelo Experimental.

3.3 Análise do ciclo estral

No primeiro dia de exposição dos animais aos respectivos protocolos (sobrecarga de ferro ou injeção de solução salina) o muco vaginal foi coletado em sala reservada e ambiente calmo, antes das 10 horas da manhã. Para a coleta, as fêmeas foram mobilizadas, e com o auxílio de uma pipeta automática de 20 µl, era introduzido nas limitações externas do canal vaginal um volume de 10 µl de solução salina a 0,9% em temperatura ambiente, permitindo a completa penetração do líquido pelo canal vaginal. Com movimentos de "vai e vem" o muco vaginal foi extraído e aplicado em uma lâmina para microscópio, com ponta fosca, devidamente identificada, em sistema de duplicata. Quando necessário, nos casos onde o volume vaginal estava diminuído, a solução salina era reaplicada.

Após finalizado o procedimento, as lâminas foram analisadas a fresco em microscópio óptico, e se a contagem de células estivesse baixa, o protocolo de coleta poderia ser repetido. As lâminas foram fixadas em álcool a 70%, e após garantir que estavam secas, passaram pelo processo de coloração

hematoxilina-eosina. Por fim foram analisadas mais uma vez em microscopia óptica e a fase do ciclo estral foi identificada. A análise do ciclo foi realizada 1 vez ao dia ao longo das 4 semanas do protocolo de exposição.

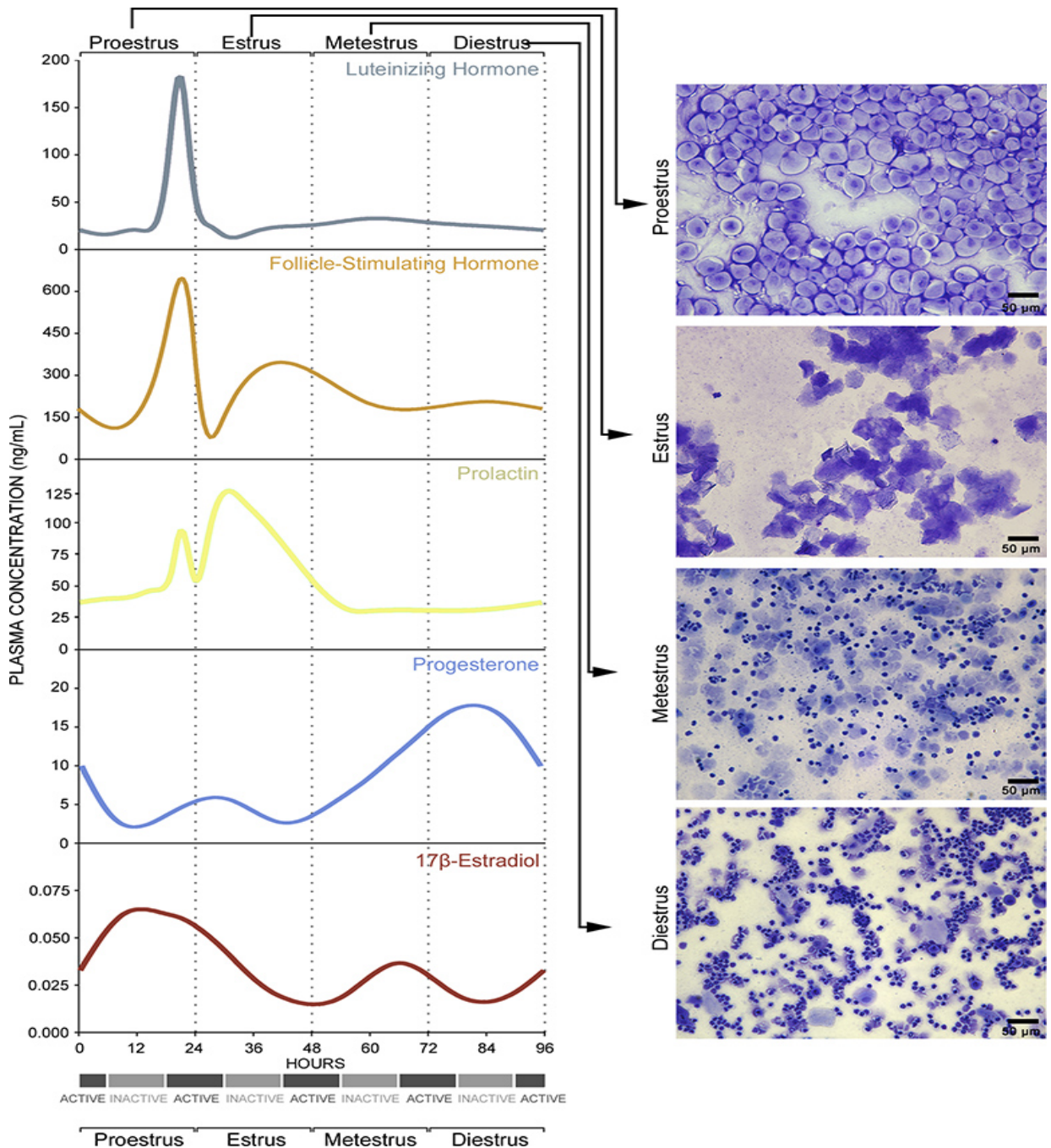


Figura 7: Caracterização das fases do ciclo estral mediante alterações hormonais. PLASMA CONCENTRATION - Concentração plasmática; HOURS - Horas; Proestrus - Proestro; Estrus - Estro; Metaestrus - Metaestro; Diestrus - Diestro. Adaptada de MCLEAN, 2012.

Após a exposição dos grupos às correspondentes soluções, os animais receberam, no dia da experimentação, dose de 80 mg/kg (i.p.) de cetamina e 10 mg/kg (i.p.) de xilazina. Atestados os efeitos do anestésico, por meio de estímulos dolorosos, os animais foram submetidos a técnicas cirúrgicas para a coleta de sangue e órgãos (hipófise, hipotálamo, útero e ovário) para as análises descritas a seguir.

3.4 Análise dos níveis de ferro circulante e tecidual

A concentração sérica e tecidual de ferro foi determinada para garantir a eficácia da exposição e identificação dos possíveis depósitos do metal no organismo, correlacionando alterações no eixo HHG a sobrecarga de ferro. Para isso, ao final dos protocolos, o soro e as amostras de fígado, baço, tecido uterino, ovariano, hipofisário e hipotalâmico foram coletados e congelados em -20°C . Os teores de ferro tecidual foram medidos por um espectrofotômetro de absorção atômica (modelo: AAS5 EA com forno de grafite, Carl Zeiss, Alemanha) no Centro de Ciências Exatas – Departamento de Química (Universidade Federal do Espírito Santo), com a colaboração da Prof^a. Dra. Maria Tereza Weitzel Dias Carneiro.

Para o preparo das amostras de baço e fígado, os tecidos foram pesados em tubos de polipropileno, onde foram adicionados 500 μL de H_2O_2 30% v/v e 1 mL de HNO_3 concentrado. Os frascos com a mistura foram deixados em banho ultrassônico a 60°C até a decomposição completa. Após a decomposição ácida, o volume foi aferido para 5 mL. As amostras já decompostas foram diluídas 1 ou 100 vezes e analisadas por Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES). A determinação de ferro foi realizada usando equipamento de ICP-OES (Optima 7000DV - Perkin Elmer, USA). A calibração do método foi realizada por padronização interna (Sc) em meio de ácido nítrico 2% v/v, e os limites de quantificação foram hipófise = 5,359 mg/kg, útero = 1,082 mg/kg, ovário = 10,89 mg/kg, fígado = 0,3076 mg/kg, baço = 0,3365 mg/kg.

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). Neste método, o ferro é liberado da transferrina em meio ácido (ácido succínico) e reduzido ao seu estado ferroso pela ação da hidroxilamina. Posteriormente, ele reage com ferrozina levando à formação de um complexo violáceo. Os resultados da análise de absorvância em Leitora de Microplaca para Absorvância ELx808 (Biosystems) a 540 nm foram expressos em $\mu\text{g/dL}$.

3.5 Histologia

As amostras de tecidos foram armazenadas em formalina a 4% no dia da coleta de órgãos. Após 72h, as amostras foram fixadas no álcool a 70% por um período mínimo de 48h. Por fim foram processadas, embebidas na parafina a 58 °C e fixadas em blocos para os cortes. Com o auxílio de um micrômetro, os blocos foram seccionados com espessura de 5 μm e montados em lâminas gelatinizadas que foram armazenadas até o momento da coloração. Para a análise morfológica a coloração realizada foi a com o corante eosina e hematoxilina (H&E).

Iniciando o protocolo, as lâminas foram desparafinizadas em três banhos seguidos, contendo apenas xilol, e um banho contendo partes iguais de xilol e álcool. Depois foram hidratadas em 3 banhos consecutivos de álcool a 100% (nos 2 primeiros) e 96% (no 3° banho). Todos os banhos tiveram duração de 3 minutos. As lâminas foram, então, lavadas com água destilada e corada com solução contendo hematoxilina por 5 minutos, mais uma vez foram lavadas com água destilada e contra corado com um banho contendo eosina por 1 minuto. Por fim, seguindo o protocolo de pós colocação, com o processo inverso da desparafinização (3 banhos de álcool por 1 minuto, o primeiro a 96% e os outros dois a 100%, 1 banho de álcool com xilol por 3 minutos, e 3 banhos de xilol por 3 minutos) e montagem das lâminas com lamínulas.

Para a análise histológica do ovário, os folículos ovarianos e os corpos lúteos foram quantificados e expressos por folículos/campo de luz (mm^2). Os

folículos ovarianos foram classificados como **primordiais** (presença de oócito envolto por uma camada de células granulosa pavimentosas), **folículos primários** (presença de uma camada única de células granulosa pavimentosas), **pré-antrais** (presença de 2-4 camada de células granulosa pavimentosas, sem espaço antral), **folículos antrais** (presença de 3 ou mais camada de células granulosa pavimentosas, com um espaço antral definido) (MYERS et al., 2004), **folículos ovarianos atresícos** e os **císticos** (SHI et al., 2009). As áreas do endométrio (End), do miométrio (MYO), espessura do miométrio, estroma, epitélios luminal e as glândulas uterinas endometriais (GE) foram analisadas nos cortes transversais uterinos endometriais (RICHARDS et al., 1980).

Os tecidos foram analisados em múltiplas secções em todo o órgão com microscópio Olympus com aumento final de 100x (AX70; Center Valley, PA; até 50 µm de distância entre as secções). Todas as imagens fotografadas foram obtidas com câmera AxioCam que emitem fotos de alta resolução (2048×1536 pixels) e exportadas para o AxioVision Software (software 4.8).

3.6 Ensaio reprodutivo

Para o ensaio reprodutivo, quatro animais de cada grupo (Ct e Fe) foram submetidos ao protocolo de intoxicação, como descrito anteriormente. Encerradas as 4 semanas, os animais foram organizados individualmente em caixas apropriadas para roedores. O ciclo estral foi analisado e em cada caixa um macho C57BL/6 controle foi incorporado ao ninho no oitavo dia. Durante a introdução do macho avaliamos o período da cópula e por um período de doze semanas seguintes foram avaliados os quantitativos de filhotes por ninhada de cada fêmea, tal como ilustrado abaixo (figura 8).

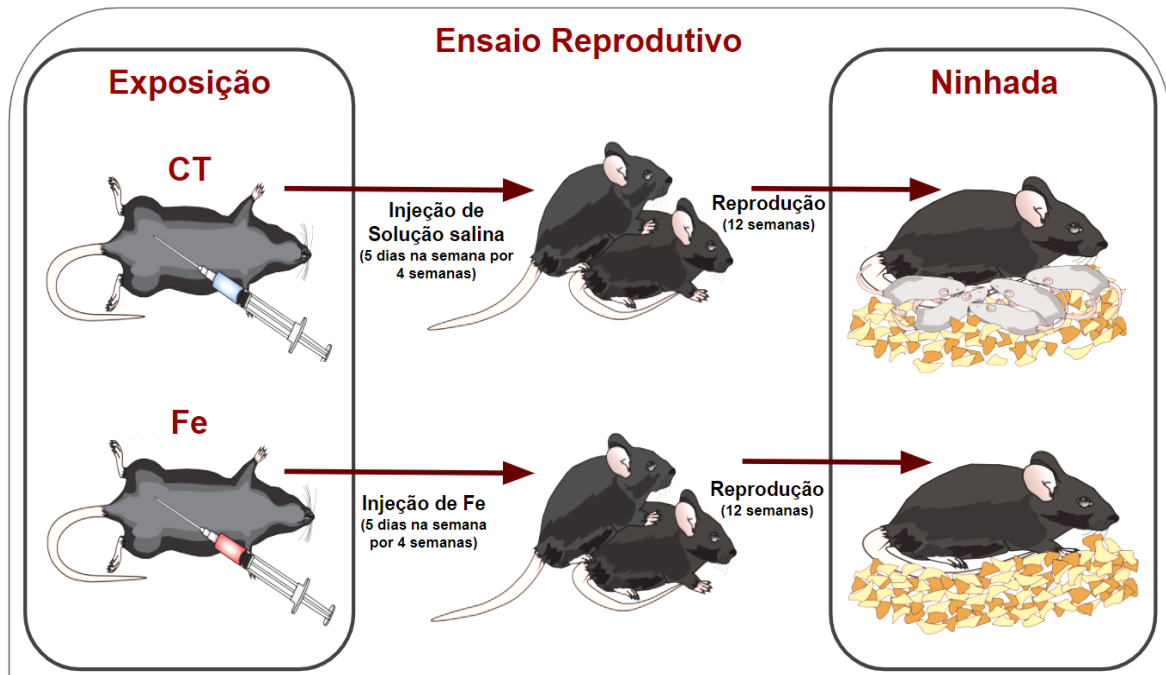


Figura 8: Imagem representativa do Ensaio Reprodutivo.

3.7 Análise Estatística

Todas as amostras foram submetidas a teste prévio de normalidade, o utilizado foi o D'Agostino e Pearson omnibus. Os resultados foram avaliados por estatística descritiva analisando média \pm erro padrão da média (EPM). Foi utilizada para as análises comparativas realizadas entre os grupos o teste estatísticos t-Student. O nível de significância foi estabelecido quando $*P < 0,05$. Utilizou-se em todas as análises estatísticas realizadas o programa Graph Prism Software 6 (San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre o peso do animal e dos órgãos do eixo hipotálamo-hipófise-gônada

Um leve aumento do peso corporal das camundongas tratadas com ferro foi observado, mas não estatisticamente significativo. Os órgãos do sistema reprodutor dos animais intoxicados cronicamente com ferro - ovário (Ct: $0,396 \pm 0,031$, $n=8$; Fe: $0,268 \pm 0,058$, $n=8$; figura 9B e D) e útero (Ct: $3,1 \pm 0,3$, $n=7$; Fe: $1,63 \pm 0,26$, $n=7$; figura 9C e E) - apresentaram redução do peso e do tamanho total. Igualmente detectou-se diminuição do peso da hipófise (Ct: $0,073 \pm 0,005$, $n=8$; Fe: $0,053 \pm 0,001$, $n=9$; figura 9F), embora o hipotálamo (Ct: $1,65 \pm 0,29$, $n=9$; Fe: $1,78 \pm 0,36$, $n=9$; figura 9G) se manteve igual entre os grupos.

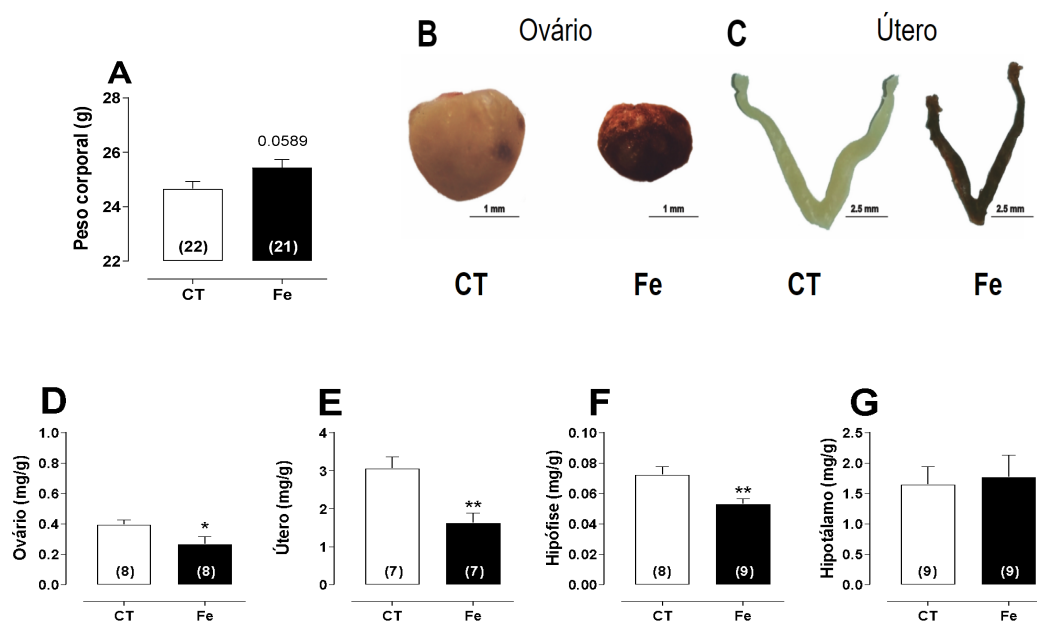


Figura 9: Efeito da sobrecarga de ferro sobre o peso corporal (A), ovariano (D), uterino (E), hipofisário (F) e hipotalâmico (G). (B) e (C) imagens comparativas do ovário e útero respectivamente. Número amostral: (A) Ct - $n = 21$ e Fe - $n = 22$; (D) $n = 8$ nos dois grupos; (E) Ct - $n = 7$ e Fe - $n = 8$; (F) $n = 9$ nos dois grupos. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $P \leq 0,05$ Fe vs Ct pelo teste t de Student.

4.2 O teor de ferro no soro e nos órgãos

Comprovando nosso modelo experimental, os níveis de ferro sérico dos animais submetidos ao protocolo de sobrecarga estavam muito elevados quando comparados aos animais controle (Ct: 98 ± 19 ; Fe: 5824 ± 511 ; $n=7$). Seguindo esse resultado, todos os órgãos avaliados dos animais do grupo ferro tiveram significante acúmulo deste elemento nos tecidos: fígado (Ct: 805 ± 54 , $n=8$; Fe: 45543 ± 3759 , $n=8$; figura 10A); baço (Ct: 9911 ± 824 , $n=7$; Fe: 54915 ± 4962 , $n=8$; figura 10B); hipotálamo (Ct: $48 \pm 4,1$; Fe: $267 \pm 9,5$; figura 10C); hipófise (Ct: $0,073 \pm 0,005$; Fe: $0,053 \pm 0,001$; figura 10D); ovários (Ct: 349 ± 60 , $n=7$ Fe: 17997 ± 2127 $n=8$ figura 10E) e útero (Ct: 79 ± 12 , $n=7$; Fe: 17178 ± 2429 , $n=7$; figura 10F).

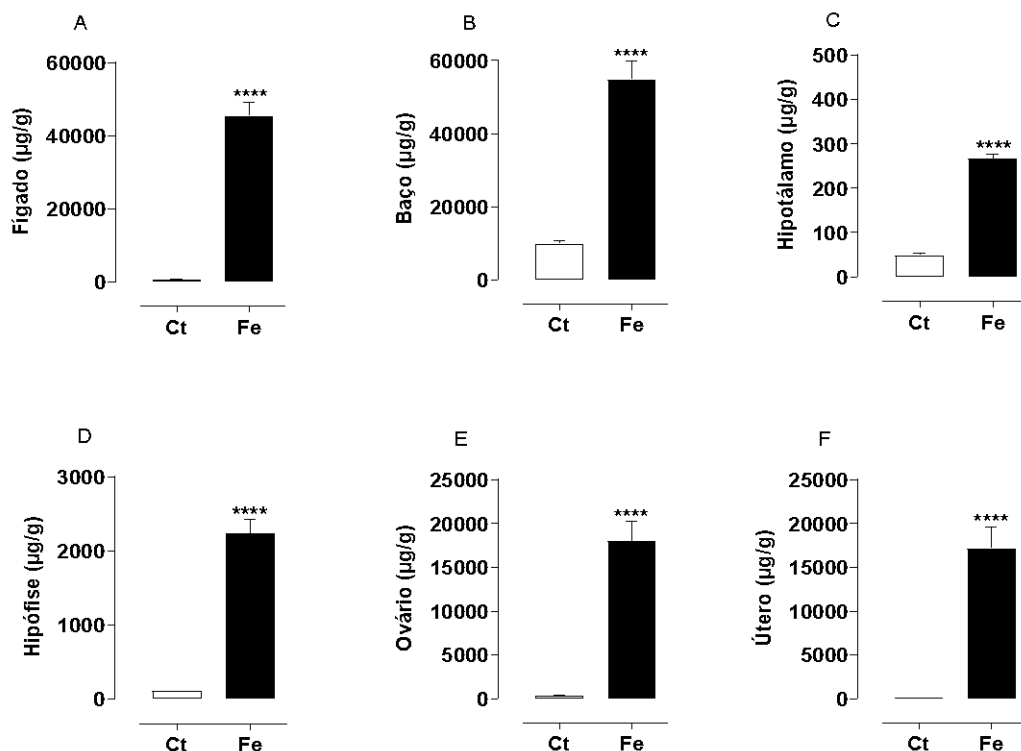


Figura 10: Níveis de ferro tecidual. A) Fígado; B) Baço; C) Hipófise; D) Hipotálamo; E) Ovário; F) Útero. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $P \leq 0,05$ Fe vs Ct pelo teste t de Student.

4.3 Efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre o ciclo estral das camundongas

Em consequência à exposição crônica ao ferro houve uma evidente alteração do comportamento do ciclo reprodutivo dos animais expostos ao excesso deste metal. Enquanto as camundongas controle apresentaram um padrão de ciclagem muito semelhante ao descrito na literatura (figura 11A), os animais com sobrecarga não apresentavam o mesmo desempenho (figura 11B). Observando a figura 11C pode-se notar que o ciclo das fêmeas intoxicadas se tornou mais longo principalmente devido ao grande prolongamento nas fases de metaestro e diestro.

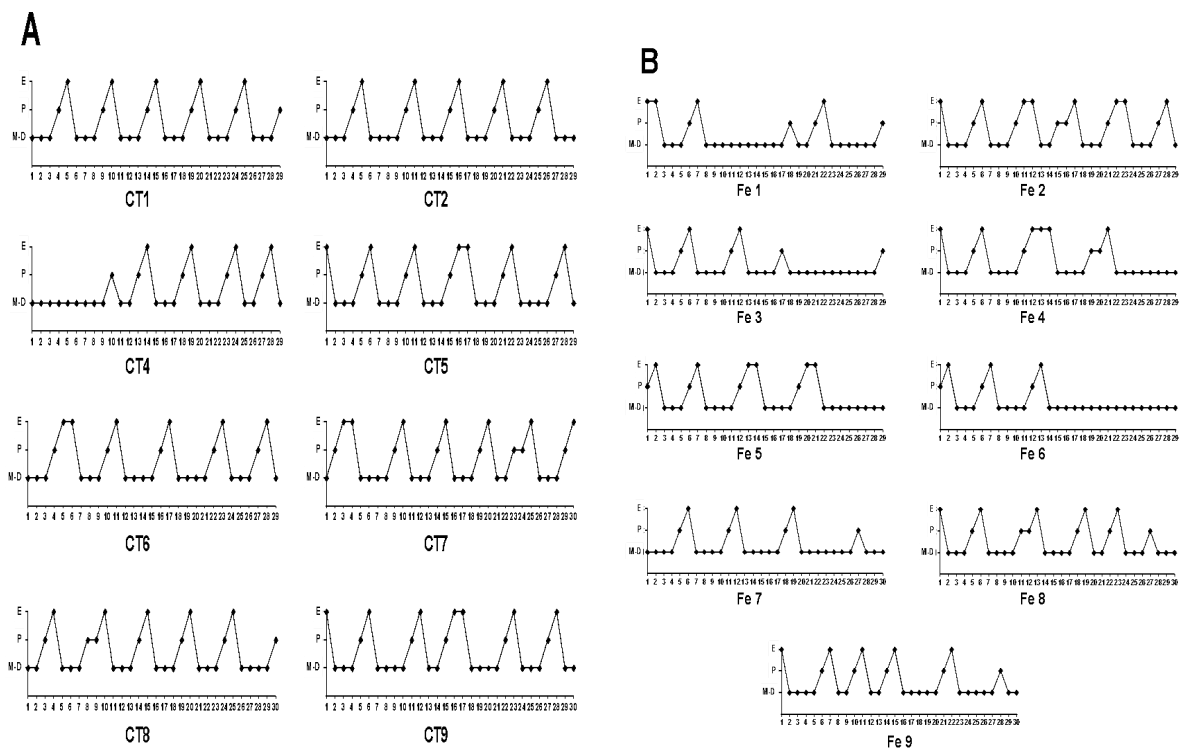
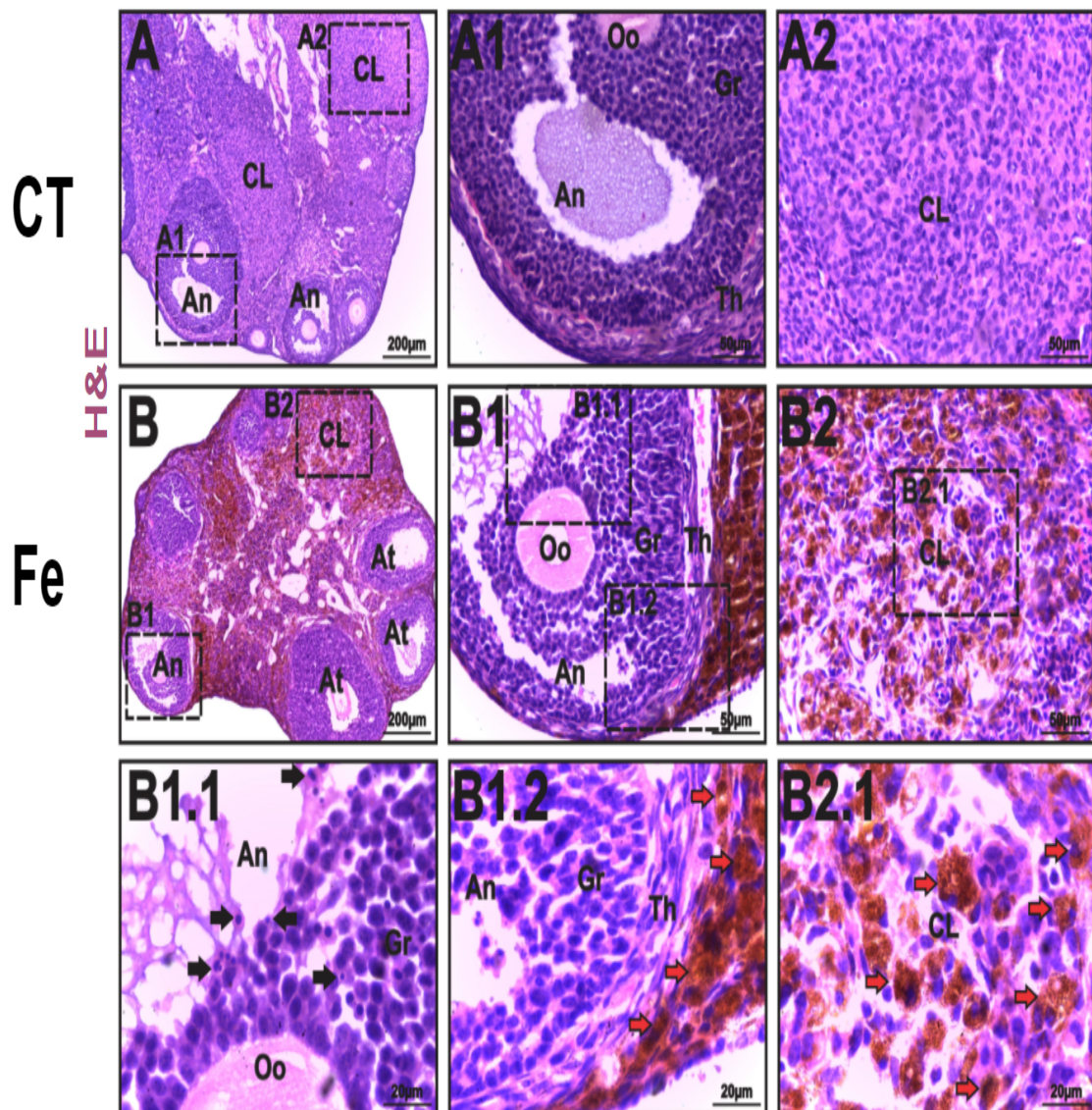


Figura 11: Análise do ciclo2 estral. A) Animais do grupo controle; B) Animais do grupo ferro; C) Duração das fases do ciclo estral. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $P \leq 0,05$ Fe vs Ct pelo teste t de Student.

4.4 Efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre a morfologia dos ovários

Houve alterações morfológicas significantes nos ovários do grupo ferro em comparação com os ovários dos animais do grupo controle. Os folículos pré-antrais (Ct: $1,59 \pm 0,22$; Fe: $1,61 \pm 0,31$; $n=12$; figura 12A) e antrais (Ct: $1,43 \pm 0,21$; Fe: $1,16 \pm 0,29$; $n=12$; figura 12B) das gônadas de ambos os grupos manifestaram aspectos estruturais semelhantes. Porém a intoxicação ao metal reduziu o quantitativo de corpo lúteo (Ct: $2,82 \pm 0,27$; Fe: $1,62 \pm 0,18$; $n=12$; figura 12C) e aumentou o número dos folículos atrésicos (Ct: $0,68 \pm 0,19$; Fe: $3,24 \pm 0,35$; $n=12$; figura 12D).



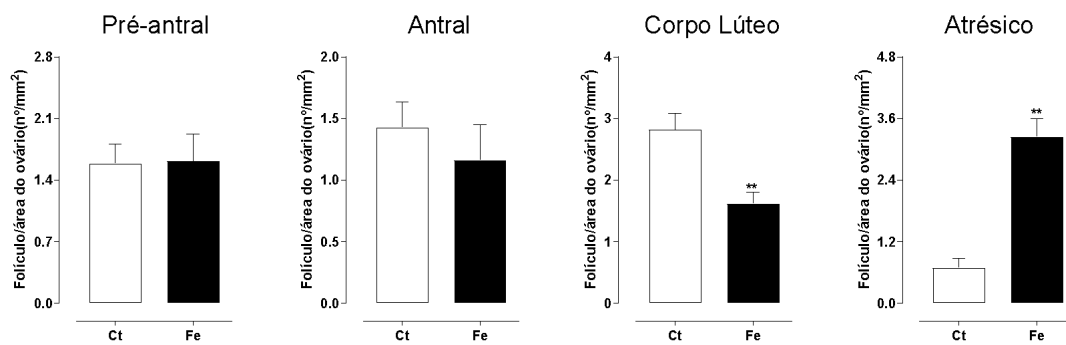


Figura 12: Efeitos da sobrecarga crônica sobre a histomorfologia ovariana. Fotografias microscópicas representativas de ovários corados com H&E. A) Ct; B) Fe; C) Folículo Pré-antral; D) Folículo antral; E) Corpo Lúteo; F) Folículo atrésico. B1.1) Presença de folículos císticos (setas pretas). B2.1) Presença de células apoptóticas na área central do CL (seta vermelha). Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $P \leq 0,05$ Fe vs Ct pelo teste t de Student.

4.5 Efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre a morfologia uterina

No útero também foi possível observar variações histológicas importantes entre o grupo controle e o grupo ferro. A sobrecarga de ferro diminuiu a espessura do miométrio (Ct: 131 ± 5 ; Fe: $94 \pm 2,8$; $n=12$; figura 13A), do endométrio (Ct: 414 ± 25 ; Fe: 313 ± 20 ; $n=12$; figura 13B) e o quantitativo de glândulas uterinas endometriais (Ct: 68 ± 5 ; Fe: $37,2 \pm 3,6$; $n=12$; figura 13C).

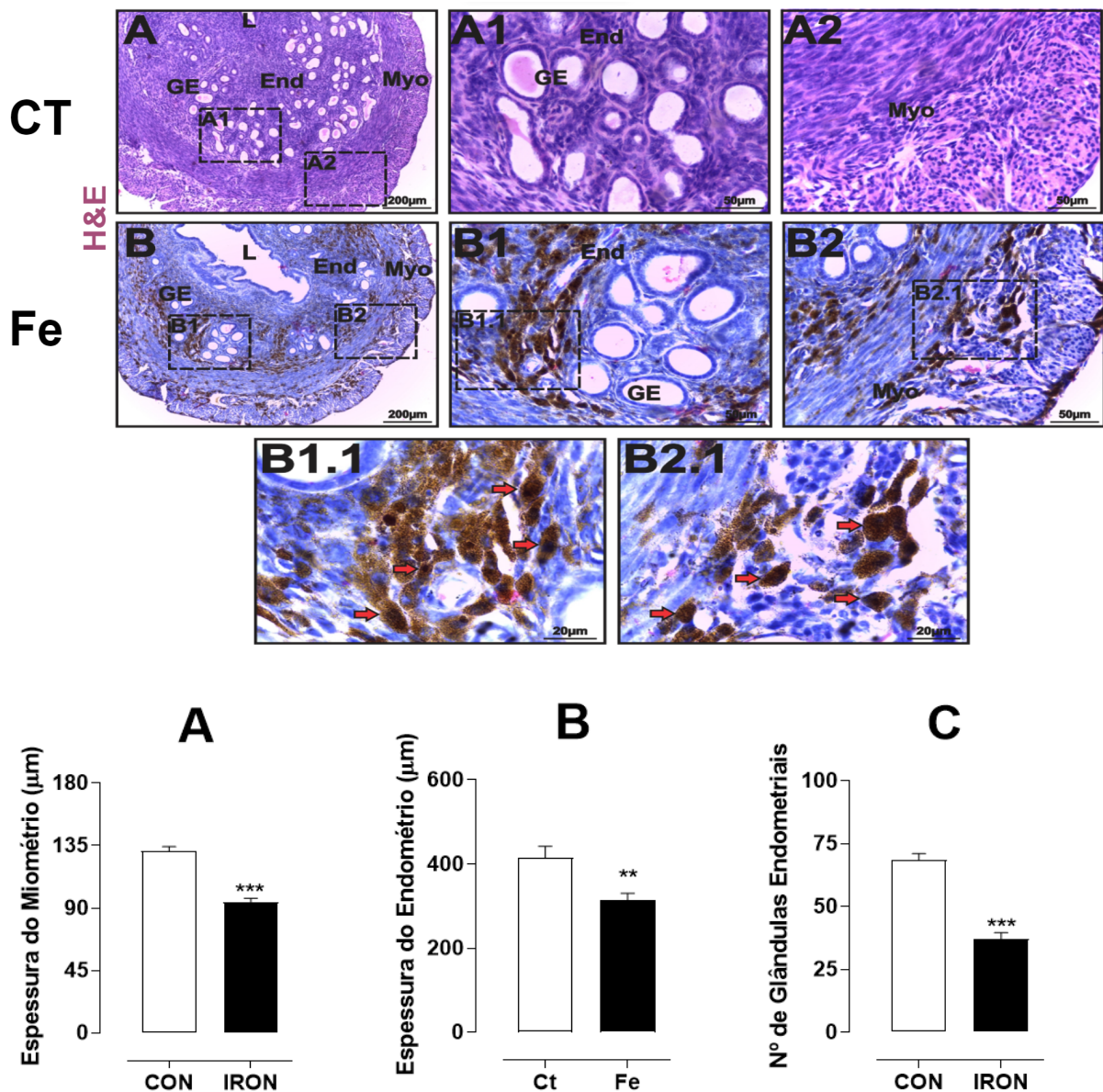


Figura 13: Efeitos da sobrecarga crônica sobre a histomorfologia uterina. Fotografias microscópicas representativas do útero corados com H&E. A) Ct; B) Fe; C) Miométrio; D) Endométrio; E) Glândulas Uterinas Endometriais. Os resultados estão expressos como média ± EPM. * $P \leq 0,05$ e *** $P \leq 0,0001$ Fe vs Ct pelo teste t de Student.

4.6 Efeitos da sobrecarga crônica de ferro sobre a reprodutividade - ensaio de reprodução

Avaliamos o ensaio reprodutivo por meio do ciclo estral das camundongas para avaliar o período da incorporação do macho no ninho. Também foi analisado o canal vaginal (plug) para garantir a cópula (figura 14). Contrapondo os dois grupos, mesmo não sendo estatisticamente significativo, o tempo para a cópula nos animais com

sobrecarga crônica de ferro apresentou uma tendência ao aumento (figura 13).

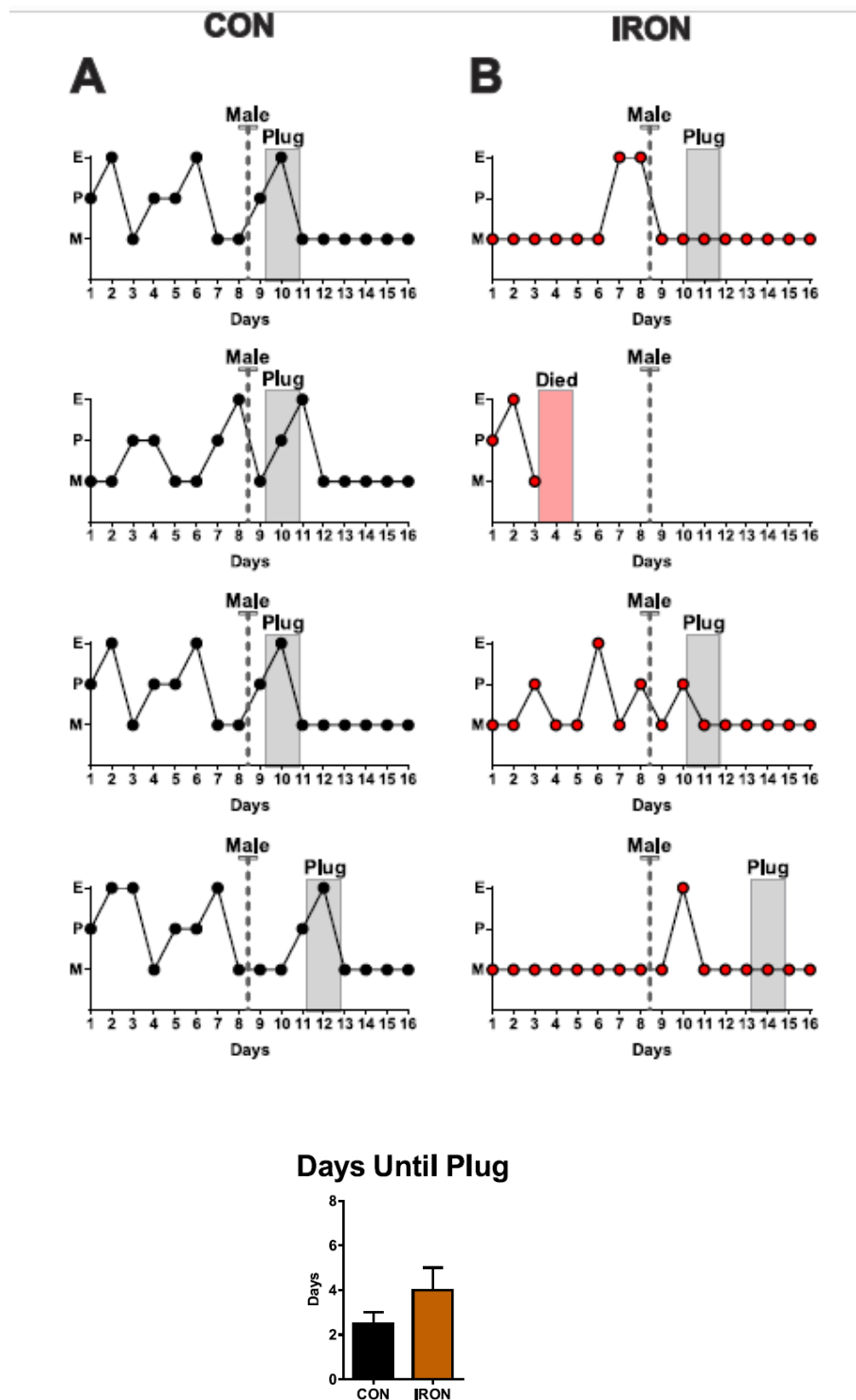


Figura 14: Avaliação do ciclo estral. Confirmação da copulação. A) Controle; B) Ferro; C) Dias para a copulação. CON - Controle; IRON - Ferro; Male - Macho; Plug - Copulação; Died - Faleceu; Days - Dias; Days Until Plug - Dias até a copulação. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $P \leq 0,05$ Fe vs Ct pelo teste t de Student.

Quanto à ninhada, as quatro fêmeas Ct totalizaram 70 filhotes (Figura 15A), enquanto que, nas fêmeas com sobrecarga de ferro, não foi observado o nascimento de nenhum filhote neste período de 90 dias de análise (Figura 15B).

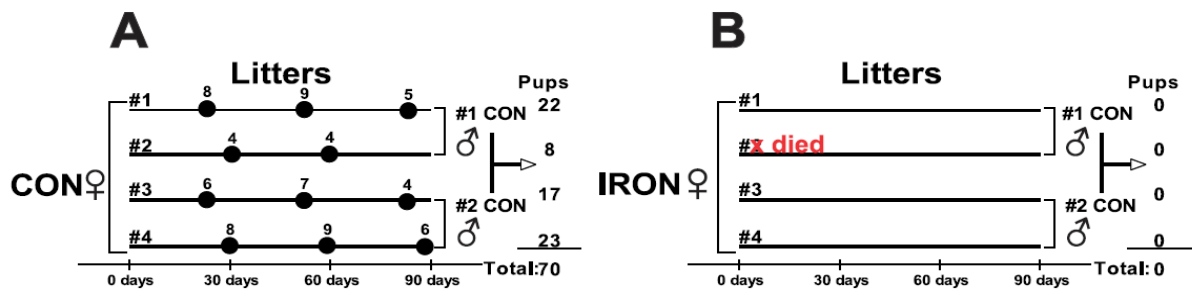


Figura 15: Representação gráfica da avaliação reprodutiva de camundongos fêmeas Ct e Fe. Quantitativo de filhotes por animais. A) Controle; B) Ferro. CON - Ct; IRON - Fe; Litters - Filhotes; Died - Faleceu.

5. DISCUSSÃO

No nosso estudo investigamos os efeitos da sobrecarga de ferro sobre os órgãos do sistema reprodutor e a capacidade reprodutiva de camundongos fêmeas. Dividimos os animais em grupo controle - Ct e grupo ferro - Fe. Utilizamos como protocolo o modelo de exposição com dose de 10 mg/kg/dia de ferro dextrano em animais camundongos fêmeas, via i.p, e para garantir a eficácia da sobrecarga, quantificamos o nível de ferro sérico, e por espectrometria, mensuramos os níveis de ferro no fígado, no baço e nos órgãos do eixo HHG (hipotálamo, hipófise, ovário e útero). Esse modelo foi utilizado pois mimetiza a sobrecarga de ferro secundária, representado por pacientes que precisam submeter-se à consecutivas transfusões de sangue, como é o caso da beta talassemia maior e a anemia falciforme (GALLEANO; PINTARULO, 1994).

A beta talassemia é classificada como uma doença hereditária recessiva que promove anemias devido a ausência ou a diminuição da produção do gene de beta globina (HbB) no cromossomo 11 (NEEDS, 2021; ORIGA, 2017). Dentre os diversos tipos da doença, estão os mais comuns: a beta talassemia menor, quando o indivíduo carrega apenas os traços; a beta talassemia intermediária, apresentando a forma mais leve da doença, onde raramente necessita de transfusões de sangue; e a beta talassemia major, essa representa a forma mais grave da doenças, sendo necessário a transfusões de sangue com regularidades (GALANELLO; ORIGA, 2010). A beta talassemia major apresenta eritropoiese ineficaz, devido ao dano oxidativo e a apoptose prematura do precursores de eritrócitos, resultando na necessidade de transfusões sanguíneas rotineiras (ORIGA, 2017). Devido às alterações da medula óssea, causadas pela hiperplasia eritróide, a via da proteína morfogenética óssea (BMP) é ativada, que, por sua vez, inibe a produção do hormônio hepcidina, aumentando as chances de sobrecarga de ferro (NEEDS, 2021).

Quando comparamos os valores de ferro sérico dos grupos (Ct x Fe) comprovou o cenário de sobrecarga, os animais tratados com o metal apresentaram elevadas concentrações de ferro na circulação. Nestas circunstâncias, a espectrometria detectou um aumento significativo do metal em todos os órgãos coletados dos animais

do grupo Fe, sendo o fígado e o baço os órgãos com níveis mais discrepantes, quando comparamos ao Ct, fortalecendo, assim, os resultados de outras pesquisas com modelos de exposição em animais (BARTFAY & BARTFAY, 2000b; CARDOSO et al., 2005; CRACKOWER et al., 2002; DAY et al., 2003; LOU et al., 2009; OUDIT et al., 2003; OUDIT et al., 2004; WHITTAKER, 1996). Chen et al em 2020 demonstraram em seu estudo experimental com células que, os hepatócitos tratados com cloreto de ferro (FeCl_3) apresentaram capacidade aumentada de absorver o ferro, devido ao aumento da expressão dos genes, ou de redutases da membrana (Dctyb e Steap4) ou dos receptores de transferrina (Tfrc). Arelado a esses condicionamento resultante, os hepatócitos sofreram ferropitose (CHEN et al, 2020). Sabe-se que em condições de sobrecarga de ferro, os hepatócitos aumentam a secreção da hepcidina, hormônio que regula a absorção de ferro, principalmente no enterócito, promovendo a endocitose do complexo hepcidina-ferroportina e degradando o dentro da célula (DUNN et al., 2007; GANZ, 2013; TJALSMA et al., 2017; CANANI et al., 2017)

Foi possível demonstrar a interferência da sobrecarga de Fe sobre a anatomia dos ovários e útero, representados na figura 8 B e C, com visível alteração dos aspectos de coloração e tamanho. A porção ovariana e uterina dos camundongos intoxicados com Fe apresentaram hiperpigmentação (escurecimento), resultante do depósito de ferro sobre esses tecidos, característica comuns de indivíduos, humanos e roedores, com excesso de ferro na circulação (Au et al, 2009). À análise ponderal, não foi detectado diferença entre o peso corporal da população com sobrecarga de ferro comparada ao Ct. Em contrapartida, houve uma redução da massa ovariana, uterino e hipofisária. Por meio de ressonância magnética (RM) em pacientes com sobrecarga de ferro, foi possível identificar as alterações morfofuncionais da hipófise, e foi visualizado a diminuição do volume hipofisário (FRANIEL et al., 2006; BERLINER et al., 2022). Em aspectos fisiológicos, sabe-se que pituitária apresenta sensibilidade aumentada ao ferro, altas concentrações tem sido associada a disfunções no desenvolvimento devido ao aumento de espécies reativas de oxigênio e, deste modo, correlacionada ao hipopituitarismo (KARADAG et al., 2020; ROSSI et al., 2016).

O eixo HHG é um importante regulador sobre o sistema reprodutor do indivíduo, variações das taxas hormonais podem ser associadas à infertilidade. Modificações hipotalâmicas e/ou hipofisárias em pacientes em situações de sobrecarga

de ferro apresenta prevalência de hipogonadismo em 50-80% dos casos (BERLINER et al 2022). Sabe-se que, concomitante ao ciclo menstrual, acontece o ciclo ovariano. Quando nascemos, os ovários possuem cerca de 2 milhões de oócitos primários. Até o início da puberdade esses folículos sofrem um processo natural denominado de atresia, produzindo folículos atrésicos que são inviáveis, reduzem os oócitos a cerca de 400.000 neste período. Na puberdade, o ciclo ovariano começa com o aumento do hormônio folículo estimulante (FSH), onde mensalmente um folículo primordial é maturado e liberado em direção ao útero (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2017; SILVERTHORN 2017).

Por intermédio do FSH, os folículos primordiais são maturados em folículos secundários ou pré-antrais. Esses folículos sofrem transformação de folículos secundários em folículos terciário, devido a formação de antro. Com esse desenvolvimento, a produção do líquido folicular também aumenta. Composto pelo principal hormônio ovariano, estradiol, e enzimas, essa substância é armazenada em pequenas bolsas conhecida como antro, que também aumentam de tamanho para a nutrição dos oócitos, permitindo a ovulação. Com todo o desenvolvimento folicular, as células granulosas, que produzem o estradiol, também passam a produzir a progesterona. Em resposta ao aumento de estradiol na circulação, a hipófise secreta um volume maior de LH (hormônio luteinizante), conhecido como pico de LH. Em determinada fase há uma ruptura da parede e o ovócito é liberado deste envoltório em direção a tuba uterina. Com a ovulação, o folículo que expeliu o ovócito se organiza formando o corpo lúteo, que funciona como uma glândula endócrina temporária, produzindo estrogênio e progesterona, importante para a manutenção do ovócito. Com a inviabilidade do óvulo, quando não há fecundação, o corpo lúteo sofre apoptose e os níveis dos hormônios secretados por ele diminuem. Como consequência a descamação uterina é desencadeada e o óvulo é eliminado juntamente na menstruação (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2017; SILVERTHORN 2017).

A análise histológica ovariana dos nossos animais expostos ao ferro apresentou alterações citológicas importantes. Houve uma diminuição do quantitativo do corpo lúteo e, em contrapartida, um aumento dos folículos atrésico. Esses dados são sugestivos de uma disfunção ovariana consistente, atrelado a deposição de ferro já relatado nesta pesquisa. Asano, 2012, sugere que a sobrecarga de ferro em

camundongos promove acúmulo tecidual e que, conseqüentemente, há uma ativação das reações redox, ocasionando a peroxidação lipídica, potencializada pelo estresse oxidativo ovariano. Qin et al, 2021, em seu modelo exposição com a dose mais elevada, onde injetava via i.p 1g/kg de ferro dextrano uma vez por semana, por um período de dois meses, também apresentou redução ovariana, diminuição do quantitativo de corpo lúteo e o aumento dos folículos atrésicos. Da mesma forma, também foi detectado a diminuição do hormônio estradiol, correlacionando todos esses resultados ao hipogonadismo. Rossi et al apresentou um trabalho de exposição ao ferro aguda em doses elevadas. Detectaram em seus resultados o acúmulo de ferro nos ovários. Em análises histológicas identificaram o aumento numérico de folículos atrésicos e folículos císticos (células inviáveis à fecundação), diminuição do quantitativo de corpo lúteo, além da presença de células apoptóticas junto às células granulosas, no espaço antral e próximo ao corpo lúteo, semelhante ao encontrado em nossos estudos. Justificando, Rossi et al (2016) correlacionou os resultados ao aumento da produção de estresse oxidativo promovido pela sobrecarga de ferro, que, por sua vez, causou o envelhecimento precoce dos folículos ovarianos com a presença de radicais livres. Nossos resultados são compatíveis ao descrito na literatura. Sabe-se que os folículos atrésicos e císticos estão em degeneração, portanto não são viáveis para a fecundação. O ovário possui um quantitativo predeterminado de folículo, logo o aumento da formação de folículos atrésicos podem implicar na redução de células viáveis para a fecundação, reduzindo a taxa reprodutiva dos indivíduos. A diminuição da produção do corpo lúteo pode sugerir um desequilíbrio na fertilidade, pois o mesmo é necessário para a manutenção do ovócito. Da mesma forma, em modelos humanos, foi observado a diminuição da reserva ovariana em mulheres com doenças falciformes (DF) (KOPEIKA et al, 2019).

Também foi detectado acúmulo do ferro nas células uterinas, e quando investigado a morfohistologia uterina foi possível observar a atrofia nos animais tratados com ferro, com diminuição do miométrio, endométrio e redução das glândulas endometriais. A diminuição desses órgãos pode ser proveniente da redução dos hormônios ovarianos que promovem a manutenção desta região. Pesquisas emparelham a sobrecarga de ferro a anormalidades uterinas e aos casos de endometriose (van Langendonck et al, 2002; Rossou et al, 2012). De todo modo, as

condições uterinas mencionadas sugerem um desenvolvimento prejudicado, conhecido como útero infantil. Essas condições podem dificultar a progressão do período gestacional, impedindo desde o processo de nidação, o desenvolvimento celular até a formação do feto, pois o órgão não apresenta estrutura apropriada para a manutenção e suporte neste período. Combinado ao prejuízo ovariano, essas condições podem inviabilizar a continuidade de uma possível gestação ou até mesmo impedir que inicie o estado gravídico.

Quanto ao ciclo estral das camundongas, detectamos variações na padronagem. Os camundongos do grupo ferro apresentaram alongamento das fases de metaestro e de diestro. A prolongação dos dias de metaestro e diestro sugerem que os animais do ferro apresentam ciclo estral mais longo, e como não houve um aumento da fase de estro, em proporção ao ciclo, a fase ovulatória diminuiu, possivelmente com aspectos disfuncionais durante a fase.

O ensaio reprodutivo nos possibilita visualizar na prática o funcionamento indireto do eixo HHG. Como já atestado nos nossos resultados e discussão, o ferro depositou-se em todos os órgãos dos animais do grupo ferro analisados nessa pesquisa, esse acúmulo acentuado pode promover alterações fisiológicas irreversíveis. Não quantificamos nesse projeto, mas sabemos que o hipotálamo é responsável por liberar o GnRH. Em resposta ao GnRH, a hipófise secreta o FSH e o LH que atuam diretamente sobre as gônadas, mobilizando a liberação da célula reprodutora feminina, no caso das mulheres, que permitirá a secreção do estradiol.

No nosso ensaio não visualizamos a presença de nenhum filhote nas gaiolas dos camundongos intoxicados com ferro, por um período de 90 dias. Em contrapartida, os 4 animais controles geraram uma somatória de 70 filhotes neste mesmo período. Rossi (2016) e Qin (2021) demonstraram que o nível do estradiol apresentou-se diminuídos em roedores tratados com ferro, esse resultado pode ser em resposta a diminuição ou do GnRH, ou dos hormônios hipofisários (FSH e LH), ou ainda da inviabilidade ovariana.

Não sabemos, ao certo, se as fêmeas do grupo ferro não geraram filhotes ou se houveram abortamentos durante o percurso. Porém, esses dados sugerem que, os animais submetidos a protocolo de intoxicação crônica de ferro apresentaram a diminuição ou a inexistência da capacidade reprodutiva.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, sabe-se a importância que o ferro desempenha em todo o sistema humano. Já é consolidado que a deficiência do ferro promove prejuízo funcionais importantes, porém, estudos vêm demonstrando que a sobrecarga de ferro também pode trazer prejuízo irreversíveis. Nosso modelo de exposição crônica ao ferro apresentou eficácia e foi possível detectar alterações morfofuncionais no fígado, no baço e nos órgãos do eixo HHG, corroborando com os dados da literatura. Deste modo, nossas pesquisas sugerem que os animais em situação de sobrecarga crônica de ferro apresentam disfunção no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal resultando em uma baixa ou inexistente capacidade reprodutiva.

Como complementação, entendemos a importância da análise quantitativa dos hormônios (GnRH, FSH, LH e estrógeno) nos nossos animais com sobrecarga crônica, de forma a correlacionar a capacidade reprodutiva da população estudada. Também, como meta futura, está a análise do estresse oxidativo.

Referências

- Anderson, E. R., Shah, Y. M. Iron homeostasis in the liver. *Compr Physiol*. 2013 Jan; 3(1):315-30.
- Andrews N. C. Iron metabolism: iron deficiency and iron overload. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2000; 1: 75-98.
- Artman, M., et al. Acute effects of iron on contractile function in isolated rabbit myocardium. *Developmental pharmacology and therapeutics*. 1984. v. 7, n. 1, p. 50–60.
- Artman, M., Olson, R. D., Boucek, R. J., & Boerth, R. C. Depression of contractility in isolated rabbit myocardium following exposure to iron: Role of free radicals. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1984; 72 (2), 324–332.
- Artman, M., Olson, R. D., Boerth, R. C. Depression of myocardial contractility in acute iron toxicity in rabbits. *Toxicology and applied pharmacology*. 1982. v. 66, n. 3, p. 329–37.
- Asano, Y. Acúmulo relacionado à idade de ferro não-heme férrico e ferroso no estroma ovariano de camundongo visualizado por histoquímica de ferro não-heme sensível. *O jornal de histoquímica e citoquímica: jornal oficial da Sociedade de Histoquímica*. 2012; 60 (3), 229-242.
- Asimakopoulos, B. Hypothalamus-Pituitary-Gonadal Axis: It is Time for Revision. *Human Genetics & Embryology, [s. l.]*, v. 02, n. 01, p. 1, 2012.
- Au, W. Y., Lam, W. W., Chu, W. W., Tam, S., Wong, W. K., Lau, J., Yeung, Y. M., Liu, H. S., Liang, R. Organ-specific hemosiderosis and functional correlation in Chinese patients with thalassemia intermedia and hemoglobin H disease. *Ann Hematol*. 2009 Oct;88(10):947-50.
- Ávila, R. A (a). Efeitos agudos do ferro (II) sobre a contratilidade miocárdica do rato. 2016. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas)- Universidade Federal do Espírito Santo.
- Ávila, R. A. (b), Silva, M. A. S. C., Peixoto, J. V., Kassouf-Silva, I., Fogaça, R. T. H., & dos Santos, L. Mechanisms involved in the in vitro contractile dysfunction induced by different concentrations of ferrous iron in the rat myocardium. *Toxicology in Vitro*, 2016; 36, 38–45.
- BACON, B. R., Britton, R. S. The pathology of hepatic iron overload: A free radical-Mediated Process? *Hepatology*, 1990.
- Bhalla, D., Jana, M. MRI in Pituitary Iron Overload: Current Perspective and Future Directions. *Indian J Pediatr*. 2021 Jul; 88(7):641-642.
- Bartfay, W. J. (b), & Bartfay, E. Systemic oxygen-free radical production in iron-loaded mice. *West J Nurs Res*. 2000; 22, 927-935.
- Berliner, C., Wang, Z. J., Singer, S. T., Grosse, R., McDonough, R. V., Pádua, E.,

- Yuan, Q., Weyhmler, M., James, E., Vichinsky, E., Adam, G., Yamamura, J., Bannas, P., Fischer, R., & Schoennagel, B. P. "Volume da Hipófise Anterior em Pacientes com Anemias Dependentes de Transfusão: Abordagens Volumétricas e Relação com a RM-R2 da Hipófise." *Neurorradiologia clínica*. 2022. vol. 32,1: 259-267.
- Bertoli, S. R., Marques, V. B., Rossi, E. M., Krause, M., Carneiro, M. T. W. D., Simões, M. R., & dos Santos, L. Chronic iron overload induces vascular dysfunction in resistance pulmonary arteries associated with right ventricular remodeling in rats. *Toxicology Letters*, 2018; 295, 296–306.
- Brandhagen, D. J., Fairbanks, V. F., Baldus, W. Recognition and management of hereditary hemochromatosis. *Am Fam Physician*, 2002. v. 1, n. 65, p. 853-860.
- Brasil - Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes. Brasília: ANVISA; 2002.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência. Doença falciforme: diretrizes básicas da linha de cuidado. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.
- Cançado, R. D., Lobo, C., Friedrich, J. R. Sobrecarga e quelação de ferro na anemia falciforme. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2010. vol. 29, n. 3, p. 316-326.
- Canali, S., Zumbrennen-Bullough, K. B., Core, A. B., Wang, C. Y., Nairz, M., Bouley, R., Swirski, F. K., Babitt, J. L. As células endoteliais produzem a proteína morfogenética óssea 6 necessária para a homeostase do ferro em camundongos. *Sangue*. 2017; 129 :405-414.
- Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. *Genet Med*. 2010 Feb; 12(2): 61-76.
- Cardoso, L. M., Pedrosa, M. L., Silva, M. E., Moraes, M. F., Colombari, E., & Chianca, D. A. Jr. Baroreflex function in conscious rats submitted to iron overload. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2005. v. 38, n. 2, p. 205–214.
- Castaldi, M. A., Cobellis, L. Thalassemia and infertility. *Hum Fertil (Camb)*. 2016 Jun;19(2):90-6. doi: 10.1080/14647273.2016.1190869. Epub 2016 Jun 23.
- Chen, H. J., Sugiyama, M., Shimokawa, F., Murakami, M., Hashimoto, O., Matsui, T., Funaba, M. Resposta à sobrecarga de ferro em hepatócitos cultivados. *Rep. Sci.* 3 de dezembro de 2020; 10(1):21184.
- Crackower, M. A., Oudit, G. Y., Koziaradzki, I., Sarao, R., Sun, H., Sasaki, T., Hirsch, E., Suzuki, A., Shioi, T., Irie-Sasaki, J., Sah, R., Cheng, H. Y., Rybin, V. O., Lembo, G., Fratta, L., Oliveira-dos-Santos, A. J., Benovic, J. L., Kahn, C. R., Izumo, S., Steinberg, S. F., Wymann, M. P., Backx, P. H., & Penninger, J. M. Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K- PTEN signaling pathways. 2002 *Cell*. 110, 737-749.
- Day, S. M., Duqaine, D., Mundada, L. V., Menon, R. G., Khan, B. V., Rajagopalan, S.,

- & Fay, W. P. Chronic Iron Administration Increases Vascular Oxidative Stress and Accelerates Arterial Thrombosis. *Circulation* 2003. p. 2601–2606.
- De Sanctis V, Soliman AT, Elsedfy H, Di Maio S, Canatan D, Soliman N, Karimi M, Kattamis C. Gonadal dysfunction in adult male patients with thalassemia major: an update for clinicians caring for thalassemia. *Expert Rev Hematol*. 2017 Dec; 10(12):1095-1106.
- Dev, S., Babitt, J. L. Overview of iron metabolism in health and disease. *Hemodial Int*. 2017 Jun; 21 Suppl 1(Suppl 1):S6-S20.
- Di Bisceglie, A. M. Axiotis, C. A., Hoofnagle, J. H., & Bacon, B. R. Measurements of iron status in patients with chronic hepatitis. *Gastroenterology*, 1992.
- Doreswamy, K., Muralidhara. Genotoxic consequences associated with oxidative damage in testis of mice subjected to iron intoxication. *Toxicology*. 2005 Jan 5;206(1):169-78.
- 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*. 2008. v.81, n.6, p.411-424.
- Edwards, C. Q., Kelly, T. M., Ellwein, G., & Kushner, J. P. Thyroid disease in hemochromatosis. Increased incidence in homozygous men. *Arch Intern Med*. vol 143, p 1890-189, 1983.
- Engle, M. A., Erlandson, M., & Smith, C. H. Complicações Cardíacas Tardias da Anemia Crônica, Grave e Refratária com Hemocromatose. *Circulação*, 1964; 30(5), 698-705.
- Feder, J. N., Gnirke, A, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet*, 1996. v.13, n.4, Aug, p.399-408.
- Fibach, E., & Rachmilewitz, E. A. Sobrecarga de ferro em distúrbios hematológicos. *La Presse Médicale*. 2017; 46(12), e296–e305.
- Franchini, M., Targher, G., Montagnana, M., Lippi, G. Iron and thrombosis. *Anal hematology*. 2008; 87:167–173.
- Franiel, T., Biering, H., Strasburger, C., Klingebiel, R. Vermehrte Eisenspeicherung in der Adenohypophyse im Rahmen einer Hämochromatose--charakteristische Darstellung mittels der Magnetresonanztomographie [Increasing iron accumulation of the adenohypophysis in the framework of a hemochromatosis--characteristic depiction using magnetic resonance tomography]. *Rofo*. 2006 Oct;178(10):1035-6. German.
- Galanello, R., Origa, R. Beta-thalassemia. *Orphanet J Rare Dis*. 2010 May 21;5:11..
- Galleano, M., Puntarulo, S. Mild iron overload effect on rat liver nuclei. *Toxicology*. 93, 125-34, 1994.

- Ganz, T. Systemic Iron Homeostasis. *Physiological Reviews*, v. 93, n. 4, p. 1721–1741, 2013.
- Gillardin, P., De Kock, I., Steel, E., Lemmerling, M. Effect of iron overload on the pituitary gland and associated imaging findings. *J Neurol*. 2013 Sep; 260(9):2403-4.
- Golfeyz, S., Lewis, S., & Weisberg, I. S. Hemocromatose: fisiopatologia, avaliação e manejo da sobrecarga hepática de ferro com foco na ressonância magnética. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* 2018; 12(8), 767–778.
- Griffiths, W. J. H., Besser, M., Bowden, D. J., Kelly, D. A. Juvenile haemochromatosis. *Lancet Child Adolesc Health*. 2021 Jul;5(7):524-530.
- Grotto, H. Z. W. Fisiologia e Metabolismo do Ferro. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2010; 32: 8-17.
- Grotto, H. Z. W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2008 v. 30, n. 5, p. 390-397.
- Gudjoncik, A., Guenancia, C., Zeller, M., Cottin, Y., Vergely, C., & Rochette, L. Iron, oxidative stress, and redox signaling in the cardiovascular system. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2014. v. 58, n. 8, p. 1721–1738.
- Gupta, R., Musallam, K. M., Taher, A. T., Rivella, S. Eritropoiese ineficaz: Anemia e sobrecarga de ferro. *Hematol Oncol Clin North Am* . 2018; 32(2):213-221.
- Hagag, A. A., El-Faragy, M. S., Elrefaey, S., Abo El-enein, A. M. Study of gonadal hormones in Egyptian female children with sickle cell anemia in correlation with iron overload: Single center study. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2016 Mar;9(1):1-7.
- Hubscher, C. H., Brooks, D. L., Johnson, J. R. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotechnic and Histochemistry*, [s.l.], v. 80, n. 2, p. 79-87, 2005.
- Iancu, T. C., & Shiloh, H. Estudos Ultraestruturais Experimentais de Sobrecarga de Ferro. *Anais da Academia de Ciências de Nova York*, 526 (1 Hemocromatos). 1988; 164-178.
- Izzy, M., Kamath, P. S. Severe Iron Overload. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019 Dec; 17(13):A28.
- Jalil, T., Yousafzai, Y. M., Rashid, I., Ahmed, S., Ali, A., Fatima, S., Ahmed, J. Mutational Analysis Of Beta Thalassaemia By Multiplex Arms-Pcr In Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2019 Jan-Mar; 31(1):98-103.
- Jesus, A., Konstantyner, T., Lôbo, I., & Braga, J. Características socioeconômicas e nutricionais de crianças e adolescentes com anemia falciforme: uma revisão sistemática. *características socioeconômicas e nutricionais de crianças e*

- adolescentes com anemia falciforme: uma revisão sistemática. *Revista paulista de pediatria: organização oficial da Sociedade de Pediatria de São Paulo*. 2018; 36 (4), 491–499.
- Karadag, S. I. K., Karakas, Z., Yilmaz, Y., Gul, N., Demir, A. A., Bayramoglu, Z., Darendeliler, F., Dursun, M. Pituitary Iron Deposition and Endocrine Complications in Patients with β -Thalassemia: From Childhood to Adulthood. *Hemoglobin*. 2020 Sep; 44(5):344-348.
- Kohgo, Y., Ikuta, K., Ohtake, T., Torimoto, Y., & Kato, J. Metabolismo do ferro corporal e fisiopatologia da sobrecarga de ferro. *Revista Internacional de Hematologia*. 2008; 88 (1), 7–15.
- Kopeika, J., Oyewo, A., Punnialingam, S., Reddy, N., Khalaf, Y., Howard, J., Mononen, S., & Oteng-Ntim, E. Reserva ovariana em mulheres com doença falciforme. *PloS um*. 2019; 14 (2), e0213024.
- Kronenberg, H. M., et al. *Williams - Tratado de Endocrinologia Clínica - 11ª edição*, cdam cidade editora ano Williams 11 capítulo 16, páginas 455 a 584
- Kroot, J. J., Tjalsma, H., Fleming, R. E., Swinkels, D. W. Heparin in human iron disorders: diagnostic implications. *Clin Chem*, 2011. v.57, n.12, p.1650-69.
- Kushner, J. P., Porter, J. P., Olivieri, N. F. Secondary iron overload. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2001; 47-61.
- Labranche, R., Gilbert, G., Cerny, M., Vu, K. N., Soulières, D., Olivié, D., Billiard, J. S., Yokoo, T., Tang, A. Liver Iron Quantification with MR Imaging: A Primer for Radiologists. *Radiographics*. 2018 Mar-Apr; 38(2):392-412.
- Lemos, A. R., Ismael, L. A. S., Boato, C. C. M., Borges, M. T. F., Rondó, P. H. C. Heparina como parâmetro bioquímico para avaliação da anemia ferropriva. *Rev Assoc Med Bras*. 2010; 56(5):596-9
- Leon, M. B., Borer, J. S., Bacharach, S. L., Green, M. V., Benz, E. J. Jr., Griffith, P., Nienhuis, A. W. Detection of early cardiac dysfunction in patients with severe beta-thalassemia and chronic iron overload. *N Engl J Med*. 1979 Nov 22; 301(21):1143-8.
- Lou, L. X., Geng, B., Chen, Y., Yu, F., Zhao, J., & Tang, C. S. Endoplasmic reticulum stress involved in heart and liver injury in iron-loaded rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2009. v. 36, n. 7, p. 612–618.
- Lu, J., Hayashi, K., Okada, S., & Awai, M. Receptores de Transferrina e Deposição Seletiva de Ferro em Células B Pancreáticas de Ratos Sobrecarregados de Ferro. *Pathology International*. 1991; 41(9), 647-652.
- Lucesoli, F., Caligiuri, M., Roberti, M. F., Perazzo, J. C., Fraga, C. G. Dose-dependent increase of oxidative damage in the testes of rats subjected to acute iron overload. *Arch Biochem Biophys*. 1999 Dec 1;372(1):37-43.
- Lucesoli, F., Fraga, C. G. Oxidative damage to lipids and DNA concurrent with

- decrease of antioxidants in rat testes after acute iron intoxication. *Arch Biochem Biophys.* 1995 Jan 10;316(1):567-71.
- Manara, R., Ponticorvo, S., Tartaglione, I., Femina, G., Elefante, A., Russo, C., Carafa, PA, Cirillo, M., Casale, M., Ciancio, A., Di Concilio, R., De Michele, E., Weiskopf, N., Di Salle, F., Perrotta, S., & Esposito, F. Conteúdo de ferro cerebral na sobrecarga sistêmica de ferro: um estudo quantitativo de ressonância magnética beta-talassemia. *NeuroImagem. Clínica.* 2019; 24, 102058.
- Marques, V. B., Nascimento, T. B., Ribeiro, R. F. Jr., Broseghini-Filho, G. B., Rossi, E. M., Graceli, J. B., dos Santos, L. Chronic iron overload in rats increases vascular reactivity by increasing oxidative stress and reducing nitric oxide bioavailability. *Life Sci.* 2015; 15;143:89-97.
- McLean, A. C., Valenzuela, N., FAI, S., Bennett, S. A. L. Performing Vaginal Lavage, Crystal Violet Staining, and Vaginal Cytological Evaluation for Mouse Estrous Cycle Staging Identification. *Journal of Visualized Experiments.* 2012. [s. l.], n. 67, p. 4 9, 2012.
- Meloni, A., Pistoia, L., Ricchi, P., Putti, M. C., Gamberini, M. R., Cuccia, L., Messina, G., Massei, F., Facchini, E., Righi, R., Renne, S., Peritore, G., Positano, V., & Cademartiri, F.m. Ligação entre genótipo e ferro multiorgânico e complicações em crianças com talassemia dependente de transfusão. *Jornal de medicina personalizada.* 2022; 12 (3), 400.
- Meng, W., Paunel-Görgülü, A., Flohé, S., Hoffmann, A., Witte, I., MacKenzie, C., Baldus, S. E., Windolf, J., Lögters, T. T. Merryweather-Clarke, A. T., M. Worwood, et al. The effect of HFE mutations on serum ferritin and transferrin saturation in the Jersey population. *Br J Haematol.* 1998. v.101, n.2, May, p.369-73.
- Merryweather-Clarke, A. T. M., Worwood, et al. The effect of HFE mutations on serum ferritin and transferrin saturation in the Jersey population. *Br J Haematol,* 1998. v.101, n.2, May, p.369-73.
- Moore, A. M., Prescott, M., Campbell, R. E. Estradiol negative and positive feedback in a prenatal androgen-induced mouse model of polycystic
- Muñoz, M., Villar, I., García-Erce, J. A. An update on iron physiology. *World J Gastroenterol.* 2009; 15. 4617-4626.
- Myers, M., Britt, K. L., Wreford, N. G. M., Ebling, F. J. P., & Kerr, J. B. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reproduction.* 2004; 127(5), 569–580.
- Needs, T., Gonzalez-Mosquera, L. F., Lynch, D. T. Beta Thalassemia. 2021 Oct 17. In: *StatPearls [Internet].* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–.
- Niederkofler, V., Salie, R., Arber, S. Hemojuvelin is essential for dietary iron sensing, and its mutation leads to severe iron overload. *J Clin Invest.* 2005 Aug;115(8):2180-6.
- Noetzli, L. J., Panigrahy, A., Mittelman, S. D., Hyderi, A., Dongelyan, A., Coates, T.

- D., & Wood, J. C. Pituitary iron and volume predict hypogonadism in transfusional iron overload. *American Journal of Hematology*. 2011; 87(2), 167–171.
- Oliveira, F., Rocha, S., Fernandes, R. Iron Metabolism: From Health to Disease. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2014; 00: 1–9.
- Origa R. β -Thalassemia. *Genet Med*. 2017 Jun;19(6):609-619.
- Oudit, G. Y., Sun, H., Trivieri, M. G., Koch, S. E., Dawood, F., Ackerley, C., Yazdanpanah, M., Wilson, G. J., Schwartz, A., Liu, P. P., & Backx, P. H. L-type Ca^{2+} channels provide a major pathway for iron entry into cardiomyocytes in iron-overload cardiomyopathy. *Nature Medicine*. 2003 v. 9, n. 9, p. 1187–1194.
- Oudit, G. Y., Trivieri, M. G., Khaper, N., Husain, T., Wilson, G. J., Liu, P., Sole, M. J., & Backx, P. H. Taurine Supplementation Reduces Oxidative Stress and Improves Cardiovascular Function in an Iron-Overload Murine Model. *Circulation*, v. 109, n. 15, p. 1877–1885, 2004.
- Pelusi, C., Gasparini, D. I., Bianchi, N., & Pasquali, R. Endocrine dysfunction in hereditary hemochromatosis. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2016; 39(8), 837–847. doi:10.1007/s40618-016-0451-7
- Prasnicka, A., Lastuvkova, H., Alaei Faradonbeh, F., Cermanova, J., Hroch, M., Mokry, J., Dolezelova E, Pavek, P., Zizalova, K., Vitek, L., Nachtigal, P., Micuda, S. Iron overload reduces synthesis and elimination of bile acids in rat liver. *Sci Rep*. 2019 Jul 5; 9(1):9780.
- Pierre, B., Marie-Bérençère, T., Olivier, L., & Eolia, B. Fisiopatologia e Classificação das doenças de sobrecarga de ferro; atualização 2018. *Transfusion Clinique et Biologique*. 2018.
- Pierre, J. L., M. Fontecave. Iron and activated oxygen species in biology: The basic chemistry. *Biometals*, 1999. v.12, n.3, p.195-199.
- Qin, X., Liang, D., Hu, M., Lv, Z., Duan, Z., Liu, X., Tang, L. Chronic overload of concentration-dependent iron exerts different effects on ovarian function in C57BL/6J mice†. *Biol Reprod*. 2021 Jun 4; 104(6):1347-1359.
- Ribeiro, Júnior. R. F., Marques, V. B., Nunes, D. O., Stefanon, I., Dos Santos, L. Chronic iron overload induces functional and structural vascular changes in small resistance arteries via NADPH oxidase-dependent O_2^- production. *Toxicol Lett*. 2017 Jul; 9;279:43-52.
- Richards, J. S., Jonassen, J. A., & Kersey, K. A. Evidence that changes in tonic luteinizing hormone secretion determine the growth of preovulatory follicles in the rat. *Endocrinology*. 1980; 107(3), 641–648.
- Richter, G. W. Nefropatia por sobrecarga de ferro em ratos. *Patologia - Pesquisa e Prática*. 1980; 168(1-3), 84-106.
- Rossi, E. M., Marques, V. B., Nunes, Dde. O., Carneiro, M. T., Podratz, P. L., Merlo,

- E., dos Santos, L., Graceli JB. Acute iron overload leads to hypothalamic-pituitary-gonadal axis abnormalities in female rats. *Toxicol Lett.* 2016 Jan 5; 240(1):196-213.
- Roussou, P., Tsagarakis, N. J., Kountouras, D., Livadas, S., Diamanti-Kandarakis, E.. Beta-Thalassemia Major and Female Fertility: The Role of Iron and Iron-Induced Oxidative Stress. Hindawi Publishing Corporation *Anemia*. 2013, 617204.
- Salenave. S., Trabado, S., Maione, L., Brailly-Tabard, S., Young, J. Male acquired hypogonadotropic hypogonadism: diagnosis and treatment. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2012 Apr; 73(2):141-6.
- 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.
- Shi, D., Dyck, M. K., Uwiera, R. R. E., Russell, J. C., Proctor, S. D., & Vine, D. F. A unique rodent model of cardiometabolic risk associated with the metabolic syndrome and polycystic ovary syndrome. *Endocrinology*. 2009; 150(9), 4425–4436. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1612>.
- Siddique, A., Kowdley, K.V. Review article: the iron overload syndromes. *Aliment. Pharmacol. Ther* 2012; 35. 876-893.
- 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.
- Skordis, N., Gourni, M., Kanaris, C., Tumba, M., Kleanthous, M., Karatzia, N., Pavlides, N., Angastiniotis, M. The impact of iron overload and genotype on gonadal function in women with thalassaemia major. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2004 Dec;2 Suppl 2:292-5.
- Swinkels, D. W., Fleming, R. E. Novel observations in hereditary hemochromatosis: potential implications for clinical strategies. *Haematologica*, 2011. v.96, n.4, Apr, p.485-8.
- Tjalsma, H., Laarakkers, C. M., van Swelm, R. P., Theurl, M., Theurl, I., Kemna, E. H., van der Burgt, Y. E., Venselaar, H., Dutilh, B. E., Russel, F. G., Weiss, G., Masereeuw, R., Fleming, R. E., & Swinkels, D. W. Análise por espectrometria de massa de peptídeos de hepcidina em modelos experimentais de camundongos. *PloS um.* 2011; 6 (3), e16762.
- Uysal, A., Alkan, G., Kurtoğlu, A., Erol, O., Kurtoğlu, E. Diminished ovarian reserve in women with transfusion-dependent beta-thalassemia major: Is iron gonadotoxic? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2017 Sep;216:69-73.
- van Langendonckt A., Casanas-Roux F., Donnez, J. Oxidative stress and peritoneal endometriosis. *Fertility and Sterility*. 2002 vol. 77, no. 5, pp. 861–870
- Vanoaica, L., Darshan, D., Richman, L., Schümann, K. Intestinal Ferritin H Is

- Required for an Accurate Control of Iron Absorption. *Cell Metabolism*. 2010; 12. 273–282.
- Vichinsky, E. P. Changing patterns of thalassemia worldwide. *Ann N Y Acad Sci. Review* 2005; 1054:18-24.
- Wellejus, A., Poulsen, H. E., Loft, S. Iron-induced oxidative DNA damage in rat sperm cells in vivo and in vitro. *Free Radic Res*. 2000 Jan;32(1):75-83. doi: 10.1080/10715760000300081. PMID: 10625219.
- Westwood, F. R. *The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging*, 2008.
- Whittaker, P., Hines, F. A., Robl, M. G., & Dunkel, V. C. Avaliação histopatológica do fígado, pâncreas, baço e coração de ratos Sprague-Dawley sobrecarregados de ferro. *Patologia toxicológica*. 1996; 24(5), 558-563.
- Wood, J. C., Cohen, A. R., Pressel, S. L., Aygun, B., Imran, H., Luchtman-Jones, L., Thompson, A. A., Fuh, B., Schultz, W. H., Davis, B. R., Ware, R. E., & Investigadores TWITCH. Acúmulo de ferro em órgãos em crianças cronicamente transfundidas com anemia falciforme: resultados basais do estudo TWITCH. *Jornal britânico de hematologia*. 2016; 172 (1), 122-130.
- Zhang, H., Zhabyeyev, P., Wang, S., & Oudit, G. Y. (2018). Papel do metabolismo do ferro na insuficiência cardíaca: da deficiência de ferro à sobrecarga de ferro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Base Molecular da Doença*. 2018.