



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

ANDERSON RAMIRO RANGEL CARNELLI

**EFEITOS AGUDOS DA EXPOSIÇÃO “*in vitro*” AO FERRO (II)
SOBRE A FUNÇÃO ENDOTELIAL DE AORTA DE RATOS**

VITÓRIA, ES

2023

ANDERSON RAMIRO RANGEL CARNELLI

**EFEITOS AGUDOS DA EXPOSIÇÃO “in vitro” AO FERRO (II)
SOBRE A FUNÇÃO ENDOTELIAL DE AORTA DE RATOS**

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

2023

**Aos meus avós, Alfredo e Izaura Ramiro, Conrado e M^a Rosa dos Santos,
Ivanilda Bandeira (*In Memoriam*) com saudades e amor.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, ó meu Salvador

Por sua graça e misericórdia sem fim

Louvo e engrandeço o seu amor

E por nunca me abandonar, agradeço a ti, meu rei

Senhor dos senhores, tua paciência me sustentou

E em todos os dias estiveste presente

Sem tua misericórdia e proteção, jamais teria avançado

A ti dedico este trabalho, em tua honra e glória

Te agradeço, ó Deus, pelas pessoas que enviaste

Cheias de empatia e cuidado, que me cercaram

Que escolheram ser benção em meio à dificuldade

A vida delas entrego a ti, que as abençoe abundantemente

Pai, te agradeço por me proteger em cada jornada

Nas idas e vindas, nas tempestades e madrugadas

Com tua direção, segui em segurança

E por esses livramentos, minha gratidão é imensa

Por aqueles momentos de crise e dúvida

Te agradeço por pessoas que me amaram com paciência

Que me mostraram amor e compreensão

E que foram bálsamo para minha alma aflita

A ti agradeço pelas oportunidades de aprendizado
Por profissionais extraordinários que fazem história
E pela capacidade de inspirar e lecionar
Que tua benção esteja sobre suas vidas, ó Deus

Pelos momentos de alegria e conquista
Agradeço a ti, meu Salvador, por tua misericórdia sem fim
Mesmo quando não merecia, tua graça me alcançou
E em todos os momentos, tu me amaste

Te agradeço por me guiar de volta ao caminho certo
E por aqueles que, infelizmente, partiram antes da vitória
Guardo em memória seus ensinamentos e abraços calorosos
E a saudade aperta, mas a gratidão permanece

Mesmo pelas provações e dificuldades da vida
Te agradeço, ó Deus, por me fazer amadurecer
E por tornar-me um homem ainda mais temente a ti
A ti, glorifico, agradeço e honro, meu Senhor e Salvador.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Apesar de ser um mineral essencial para a homeostase, aumentos excessivos no ganho de ferro no nosso organismo cursa com risco de intoxicação ou sobrecarga, visto que não há processos reguláveis para sua excreção. A intoxicação por via oral, principalmente entre crianças por ingestão acidental; ou por via parenteral, em decorrência de infusões com altas doses, têm taxas elevadas de morbimortalidade. Em excesso, o ferro livre pode danificar órgãos e sistemas, em especial o cardiovascular. Atualmente é bem sabido que não somente a sobrecarga crônica de ferro, mas também a incubação aguda de tecido miocárdico de ratos ao íon ferroso (Fe^{2+}) cursa com disfunção contrátil do músculo cardíaco. Além disso, vários estudos também sugerem uma vasculopatia importante em roedores cronicamente sobrecarregados com ferro, relacionada ao intenso estresse oxidativo gerado. Nesse sentido, é preciso aprimorar a investigação dos efeitos agudos desse metal sobre a vasculatura, pois ainda não foram adequadamente identificados. Assim, devido à vasculopatia já descrita nos modelos de exposição crônica “in vivo”, e ao seu potencial oxidativo, nossa hipótese é que a exposição “in vitro” de segmentos aórticos ao Fe^{2+} seja capaz de alterar a estrutura e função endotelial no seu papel modulatório sobre o tônus vascular. **OBJETIVO:** Avaliar se a exposição “in vitro” a altas concentrações de Fe^{2+} produz alterações morfofuncionais no endotélio vascular de segmentos aórticos de ratos. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foram utilizados anéis isolados de artéria aorta de ratos Wistar machos (250-350g), nos quais foi avaliada a reatividade vascular à fenilefrina após incubação com solução nutriente padrão ou adicionada de sulfato ferroso (FeSO_4 10, 25, 100, 250, e 1000 μM) por 30 minutos. Em outro conjunto de experimentos, foram avaliadas as respostas vasodilatadoras à acetilcolina ou a um doador de óxido nítrico, o nitroprussiato de sódio em anéis previamente pré-contráídos com fenilefrina; além da análise do papel do endotélio nos efeitos do Fe^{2+} 100 e 1000 μM sobre a reatividade vascular, pela lesão mecânica da camada íntima. Ademais, alguns segmentos com endotélio íntegro foram incubados previamente com um inibidor da sintase de óxido nítrico; um inibidor da ciclooxigenase; um “varredor” de radical hidroxila OH^{\cdot} ou uma inativadora do peróxido de hidrogênio (L-NAME, indometacina, DMSO e catalase, respectivamente). Finalmente, amostras de segmentos aórticos também foram analisadas por microscopia eletrônica por varredura e espectroscopia por energia dispersiva para avaliação da morfologia e mapeamento elementar da superfície endotelial; além da extração do tecido vascular para análise de produtos de oxidação avançada de proteínas (AOPP) e do principal produto de peroxidação lipídica, malondialdeído (MDA). **RESULTADOS:** A exposição ao Fe^{2+} aumentou a reatividade vascular à fenilefrina após 30 minutos, a partir de 25 μM , sendo mais significativos os efeitos quando a exposição foi nas concentrações de 100, 250 e 1000 μM . Por essa razão, a fim de simplificar os estudos seguintes, somente foram utilizadas as concentrações de 100 e 1000 μM incubadas por 30 minutos. Nas curvas de ACh, concentrações de Fe^{2+} 100 e Fe 1000 μM , tiveram uma menor resposta vasodilatadora enquanto na presença de NPS não houve diferença na vasodilatação independente do endotélio, inferindo que o prejuízo na modulação está relacionado a função endotelial. A retirada do endotélio e a incubação com L-NAME aumentaram a resposta vasoconstrictora em todos os anéis. Porém, a magnitude desse aumento foi menor naqueles expostos ao Fe^{2+} , corroborando a redução na modulação endotelial e

sugerindo menor participação do óxido nítrico, confirmada com DAF que indicou biodisponibilidade de NO reduzida nas incubações com ferro. Na presença de indometacina, a vasoconstrição dos anéis incubados com Fe^{2+} 1000 μM reduziu, sugerindo papel da via AA-COX para a hipercontratilidade em altas concentrações de Fe^{2+} . Nas incubações prévias com catalase e DMSO, houve diminuição da resposta contrátil dos segmentos expostos ao Fe^{2+} , indicando também um papel das espécies reativas do oxigênio (EROs) nesse efeito. Apesar disso, não houve diferença significativa no AOPP ou MDA nos anéis incubados com Fe^{2+} , sugerindo que, apesar do efeito sobre a reatividade vascular, o aumento de EROs aos 30 minutos deve ocorrer em níveis ainda incapazes de serem detectados pelas técnicas utilizadas e que não causam danos suficiente. A espectroscopia de microanálise qualitativa evidenciou baixa ou nenhuma presença de ferro no grupo controle, enquanto os grupos incubados com Fe^{2+} apresentaram um aumento considerável. **CONCLUSÃO:** A incubação “in vitro” com Fe^{2+} foi suficiente para causar danos nas células endoteliais de maneira concentração-dependente, acarretando em prejuízo na modulação endotelial. Os mecanismos parecem estar relacionados à exacerbação de vias contráteis derivadas da COX, e diminuição da biodisponibilidade de NO em associação a produção de EROs.

Palavras-chave: Hemocromatose, anemia, politransfusões, ferro-heme, estresse oxidativo, radicais livres, endotélio, reatividade vascular.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Although iron is an essential mineral for homeostasis, excessive iron accumulation in our body can lead to intoxication or overload, since there are not regulated processes for its excretion. Oral intoxication, mainly by children due to accidental ingestion, or parenteral administration, due to high-dose infusions, exhibit high morbidity and mortality rates. In excess, free iron can damage organs and systems, especially the cardiovascular system. It is currently well known that not only chronic iron overload, but also acute incubation of rat myocardial tissue with ferrous ion (Fe^{2+}) result in contractile dysfunction of the cardiac muscle. In addition, several studies also suggest significant vasculopathy in rats chronically overloaded with iron, related to intense oxidative stress. However, the "in vitro" effects of this metal on the vasculature have not been identified. Thus, due to the vasculopathy already described in chronic exposure "in vivo" models, and its oxidative potential, the hypothesis is that "in vitro" exposure of aortic segments to Fe^{2+} is capable of altering the endothelial structure and function, in its modulatory role on vascular tone. **OBJECTIVE:** To evaluate whether "in vitro" exposure to high concentrations of Fe^{2+} induce morphofunctional changes in the vascular endothelium of rat aortic segments. **MATERIAL AND METHODS:** Aortic rings isolated from male Wistar rats (250-350g) were used to evaluate the vascular reactivity to phenylephrine after incubation with a standard nutrient solution added with ferrous sulfate (FeSO_4 10, 25, 100, 250, and 1000 μM) for 30 minutes. The vasodilatory responses to acetylcholine or a nitric oxide donor, sodium nitroprusside, were evaluated in rings previously pre-contracted with phenylephrine. In addition, the role of the endothelium in the effects of Fe^{2+} 100 and 1000 μM on vascular reactivity was analyzed by mechanical injury of the intimal layer. Furthermore, some segments with intact endothelium were pre-incubated with an inhibitor of nitric oxide synthase, a cyclooxygenase inhibitor, a hydroxyl radical scavenger, and a hydrogen peroxide inactivator (L-NAME, indomethacin, DMSO and catalase, respectively). Finally, samples of aortic segments were analyzed by scanning electron microscopy and energy-dispersive spectroscopy for evaluation of the morphology and elemental mapping of the endothelial surface; in addition to the extraction of vascular tissue for analysis of advanced protein oxidation products and the main product of lipid peroxidation, malondialdehyde. **RESULTS:** "In vitro" exposure to Fe^{2+} increased vascular reactivity to phenylephrine after 30 minutes, from 25 μM , with more significant effects observed after exposure to concentrations of 100, 250, and 1000 μM . In the acetylcholine curves, aortic rings exposed to high Fe^{2+} had a lower vasodilatory response, while the response sodium nitroprusside was preserved, suggesting an impairment in endothelial function. Removal

of the endothelium and incubation with L-NAME increased vasoconstrictive response in all rings. However, the magnitude of this increase was lower in those arterial segments exposed to Fe^{2+} , indicating a reduction in endothelial modulation and participation of nitric oxide, which was confirmed with DAF fluorescence that evidenced reduced NO bioavailability in samples incubated with Fe^{2+} . In the presence of indomethacin, vasoconstriction of aortic rings exposed to Fe^{2+} 1000 μ M decreased, suggesting a role of the AA-COX pathway in hypercontractility at higher concentration of Fe^{2+} . After incubation with catalase and DMSO, there was a decrease in the contractile response of segments exposed to Fe^{2+} , indicating a role of reactive oxygen species (ROS) in this effect. Despite this, there was no significant difference in AOPP or MDA in the rings incubated with Fe^{2+} , suggesting that, despite the effect on vascular reactivity, the increase in ROS at 30 minutes should occur at levels still undetectable by the techniques used and do not cause sufficient damage. Qualitative microanalysis spectroscopy showed significant variations in iron concentration among the studied groups. The control group had low or no presence of iron, while the Fe-incubated groups showed a considerable and even greater increase.. **CONCLUSION:** "In vitro" incubation with high concentrations of Fe^{2+} is sufficient to damage to endothelial cells, resulting in impaired endothelial modulation. The mechanisms appear to be related to the exacerbation of contractile pathways derived from COX and a decrease in the bioavailability of NO in association with the production of ROS

KEYWORDS: Hemochromatosis, anemia, poly-transfusion, heme iron, oxidative Stress, free radicals, endothelium, vascular reactivity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Internalização de Fe no enterócito	18
Figura 2 - Ação da hepcidina no metabolismo do Fe.....	20
Figura 3 - Reação de Fenton	22
Figura 4 - Reação de Haber-Weiss.....	22
Figura 5 - Aorta torácica imersa em uma placa de Petri.....	35
Figura 6 - A Cuba.	35
Figura 7 - Teste da viabilidade do músculo liso vascular e função endotelial	37
Figura 8- Imagens de microscopia eletrônica de varredura das artérias da aorta	41
Figura 9- Fe ²⁺ sobre a reatividade vascular à fenilefrina (PE).....	46
Figura 10 - A exposição in vitro ao Fe ²⁺ altera a função vasodilatadora	48
Figura 11- Remoção do endotélio sobre a reatividade vascular à fenilefrina.....	49
Figura 12 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	50
Figura 13 - Espectro dos elementos presentes na amostra	51
Figura 14 - Efeito da inibição da produção de NO a partir de L-NAME	52
Figura 15 - Efeito da inibição da via da COX utilizando indometacina. Erro! Indicador não definido.	
Figura 16 – DAF.	54
Figura 17 – H ₂ O ₂ na modulação através da inativação por catalase.....	55
Figura 18 – Modulação do OH• na hiper-reatividade através do “varredor” DMSO	56
Figura 19 - Medida de substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela de casos de intoxicação por ferro.....	25
Tabela 2 – Exposição ao Fe^{2+} por 30 minutos	47
Tabela 3 – Análise $R_{\text{máx}}$ pD2 das curvas concentração-resposta	48
Tabela 4 - Tabela de porcentagem de elementos	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

% - Porcentagem

μL – Microlitros

μm – Micrômetro

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ – Concentração de cálcio intracelular

ApoE - Apolipoproteína E

ANOVA - Análise de variância

ATP - Adenosina Trifosfato

$\text{OH}\cdot$ - Radical hidroxila

Cat – Catalase

CEUA - Comissão de Ética em Uso de Animais

CMLV - Células da musculatura lisa vascular

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

COX - Via da ciclooxigenase

Dctyb - Citocromo b redutase 1

DMT1 - Transportador de metal divalente 1

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EPM - Erro padrão da média

EROs - Espécies reativas de oxigênio

ETs - Endotelinas

ET-1 – Endotelina-1

ET-2 – Endotelina-2

ET-3 – Endotelina-3

Fe - Ferro

Fe²⁺ - Ferro ferroso

Fe³⁺ - Ferro férrico

GSH - Glutathiona reduzida

GSSG - Glutathiona oxidada

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HCP1 - Proteína transportadora heme-1

HFE – Gene da hemocromatose hereditária

HH – Hemocromatose hereditária

HDE - Hiperpolarização derivada do endotélio.

I.p – Intraperitoneal

MDA – Malondialdeído

MLC - Miosina de cadeia leve

MLCK - Quinase de cadeia leve da miosina

NaCl - Cloreto de sódio

NO - Óxido nítrico

O₂⁻ - Ânion superóxido

PGI₂ - Prostaciclina

Redox - Reações de oxidação-redução

SERCA: Calcio ATPase do retículo sarcoplasmático

Tf - Transferrina

TfR - Receptor da transferrina

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Ferro	16
1.1.1	Cinética do ferro no organismo.....	17
1.1.2	Ferro e o estresse oxidativo	21
1.2	A sobrecarga de ferro no organismo	23
1.2.1	Modelos de sobrecarga de ferro e efeitos sobre o sistema cardiovascular	26
1.2.2	Efeito da sobrecarga crônica de ferro sobre o leito vascular	27
1.3	Papel do Endotélio no controle do tônus vascular	28
1.5	Justificativa e Hipótese	32
2	OBJETIVOS	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	Animais Experimentais.....	34
3.2	Modelo “in vitro” de exposição ao Fe ²⁺	34
3.2.1	Obtenção dos anéis de aorta e montagem da preparação	34
3.3	Estudo da reatividade vascular	35
3.3.1	Teste de viabilidade das preparações.....	35
3.3.2	Exposição a diferentes concentrações de Fe ²⁺ sobre a reatividade vasoconstrictora.....	36
3.3.3	Análise da função endotelial e fatores envolvidos nas alterações de reatividade vascular	37
3.3.3.2	Modulação endotelial sobre a reatividade vasoconstrictora.....	38
3.3.3.3	Óxido nítrico e prostaciclina na modulação do tônus	38
3.3.3.4	Radical hidroxila e peróxido de hidrogênio sobre a reatividade vacular	39
3.4	Avaliação do estresse oxidativo no tecido vascular	39
3.4.1	Análise de peroxidação lipídica nos segmentos de aorta	39
3.4.2	Análise de oxidação avançada de proteínas nos segmentos de aorta.....	39
3.5	Detecção da produção local de óxido nítrico nos anéis aórticos	40
3.6	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDS)	41
3.7	Expressão dos resultados e análise estatística	42
3.8	Fármacos e reagentes	44
4	RESULTADOS	46
4.1	Exposição ao Fe ²⁺ , em diferentes concentrações	46
4.2	Fe ²⁺ sobre a integridade endotelial e fatores envolvidos na reatividade	47
4.2.1	A exposição de Fe ²⁺ prejudica a vasodilatação dependente do endotélio ..	47
4.2.2	Fe ²⁺ reduz a modulação endotelial sobre a reatividade vasomotora	49
4.2.3	Ferro sobre a morfologia da superfície endotelial em aorta.....	50

4.2.4 Fe ²⁺ altera o papel do NO e de produtos da COX nos anéis aórticos	52
4.2.5 Fe ²⁺ reduz a biodisponibilidade de NO na aorta	54
4.3 EROs sobre a hiper-reatividade induzida pela exposição in vitro ao Fe ²⁺	54
4.4 Fe ²⁺ sobre a peroxidação lipídica e oxidação de proteínas	57
5 DISCUSSÃO	58
6 Conclusão	66
7. REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ferro

Desde os primórdios da formação da terra, os seres vivos têm uma relação importante com o ferro (Fe): sugere-se que o O₂ liberado pelos primeiros seres (fotossintetizantes) auxiliou a transformação de Fe²⁺ em Fe³⁺ e a interação do Fe e enxofre, gerando o FeS₂, sendo um propulsor energético para a redução de CO₂, tornando assim a atmosfera compatível com a vida terrestre. O Fe está relacionado a respiração de quase todos os organismos vivos e é um mineral essencial para homeostase celular, participando de diversos mecanismos fisiológicos importantes, dentre eles a ligação e transporte de oxigênio através da hemoglobina e mioglobina, síntese do ácido desoxirribonucleico e ação como cofator enzimático na cadeia respiratória mitocondrial (Muñoz; Villar; García-Erce, 2009).

O Fe apresenta duas formas principais, o Fe orgânico e inorgânico, respectivamente, ferro heme e ferro não heme. O ferro heme tem mais facilidade de absorção e está presente na composição de células nucleadas; é sintetizado no citosol e mitocôndrias celulares; e sua presença em carnes vermelhas é mais abundante do que em ovos e laticínios. Essa apresentação química facilita a absorção e utilização do ferro contido no ferro heme. O Fe inorgânico pode ser encontrado em vegetais e grãos e tem uma absorção dependente de um processo de redução onde Fe³⁺ é transformado em Fe²⁺ para então ser absorvido pelo enterócito (Gudjoncik et al., 2014).

O Fe heme é uma estrutura orgânica complexa em forma de anel, denominado protoporfirina, que está ligado a um ion Fe²⁺. A manutenção deste estado é realizada pelos átomos de nitrogênio, que evitam a transformação do Fe²⁺ em Fe³⁺, o que o impediria de se ligar reversivelmente ao oxigênio. Algumas moléculas, como o NO e CO possuem uma afinidade maior por ferro heme do que o O₂. Por causa dessa maior afinidade na presença de CO, O₂ é liberado. (Nelson, 2014).

1.1.1 Cinética do ferro no organismo

Considerando a dieta padrão americana, são consumidos de 10 a 15 mg de Fe/dia em suas diferentes formas, entretanto apenas 5 a 10% são absorvidos, o que pode ser aumentado em caso de privação de ferro ou na gravidez, e por efeito da presença de solubilizantes como açúcares e a acidez, que facilitam a absorção do Fe no intestino delgado (Hoffbrand; Moss, 2011).

Na porção apical do enterócito existem duas formas de entradas para os tipos diferentes de ferro: a proteína transportadora do heme-1 (HCP1) e o transportador de metais divalentes 1 (DMT-1), respectivamente internalizam Fe heme e Fe não heme, na forma Fe^{2+} (Figura 1). A HCP1 transporta ferro heme intacto (Weintraub; Conrad; Crosby, 1965; Wheby; Spyker, 1981), utilizando-se um processo ativo (Vaghefi et al., 2000). O HCP1 é um transportador de membrana na microvilosidade do enterócito duodenal, com a maior expressão de absorção de ferro heme (Shayeghi et al., 2005). No citoplasma, o ferro heme passa pela ação da hemeoxigenase (HO) liberando Fe^{2+} para o *pool* de Fe citoplasmático. Estudos também descreveram a presença de um receptor heme na borda de escova (Gräsbeck et al., 1979; Roberts; Henderson; Young, 1993) que internaliza ferro heme através de um processo endocitótico (Galbraith, 1990; Gräsbeck et al., 1979; Majuri; Gräsbeck, 1987; Roberts; Henderson; Young, 1993). No interior lisossomal, a HO libera Fe^{2+} do heme endocitado, e através de DMT-1, o mesmo vai se somar ao ferro citoplasmático (Oates; West, 2006; Parmley et al., 1981; Wyllie; Kaufman, 1982).

O Fe proveniente da alimentação pode ser encontrado na forma férrica (Fe^{3+}) ou não heme em alimentos como vegetais e grãos, e na forma ferrosa (Fe^{2+}) em alimentos de origem animal, como carnes e derivados. Enquanto aquele presente nos medicamentos e suplementações, na Fe^{2+} . A forma Fe^{3+} deve passar pela ação da enzima redutase citocromo b duodenal (Dcytb) para ser então internalizada por sua transportadora equivalente. O Fe então passa a ser divalente e suscetível a internalização pelo DMT-1. O Fe^{2+} internalizado pode seguir dois caminhos, a depender da necessidade do organismo: ou este se liga à ferritina e permanece no interior do enterócito ou é transportado pela membrana basolateral do enterócito e posteriormente levado ao sangue. A ferroportina (FPN), uma proteína de membrana localizada na porção basolateral

do enterócito é a principal via de saída de Fe^{2+} para o meio extracelular (Figura 1). (Pantopoulos et al., 2012).

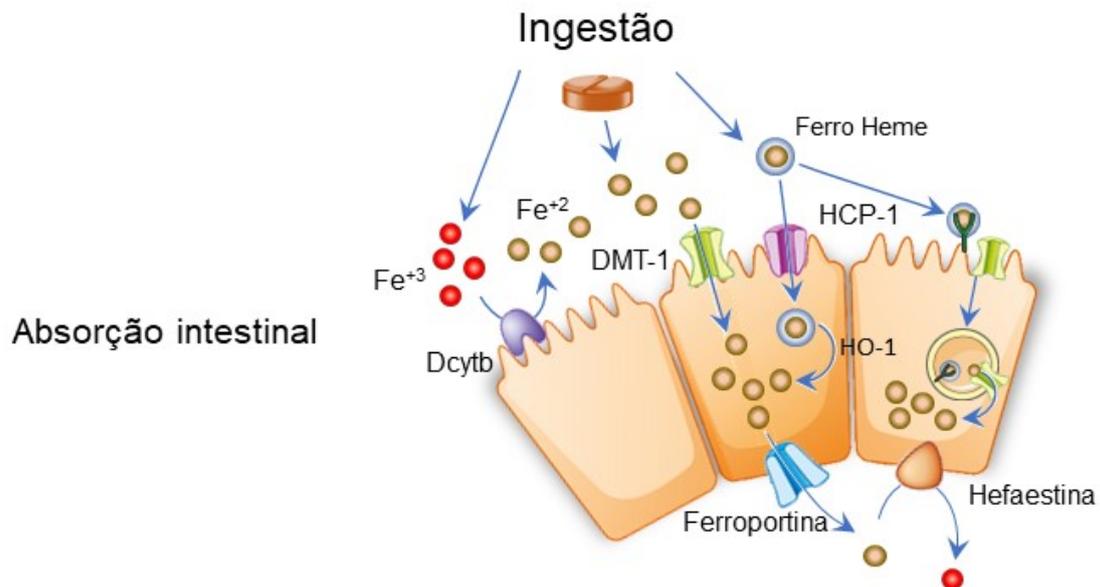


Figura 1 - Internalização das diferentes formas químicas do Fe no enterócito e suas modificações para o transporte até o interstício das vilosidades. Fonte: Adaptado de DOS SANTOS et al.,(2022)

A maior porção de Fe está envolvido com funções de hemoproteínas, e a própria hemoglobina se torna uma fonte endógena deste metal. Assim, aproximadamente de 25 a 30 mg/dia de Fe é reciclado pelo corpo, enquanto 1 a 2 mg é absorvido da alimentação (Chifman; Laubenbacher; Torti, 2014; Muñoz; Villar; García-Erce, 2009). As hemácias perduram 120 dias em média, e ao se tornarem senescentes, recebem uma marca bioquímica (peroxidação de lipoproteínas da membrana plasmática, perdas de ácido siálico e a geração de neoantígenos) (Lutz et al., 2006). Os macrófagos do baço, da medula óssea e do fígado, ao reconhecerem essa marcação, realizam a eriptose. Essas hemácias serão internalizadas e então degradadas. O grupamento heme será catabolizado e resultará em Fe^{2+} (existem outros produtos envolvidos neste processo, entretanto, não envolve a temática deste trabalho). Por sua vez, o Fe^{2+} retido dentro do macrófago se ligará a ferritina ou será exteriorizado pela FPN (Hoffbrand; Moss, 2011)

Dessa forma, o Fe pode ser encontrado em grande quantidade nas células hepáticas, no baço e medula óssea. Apoferritina possui massa molecular de 46.000 Da, pode abrigar até 4500 átomos de Fe (porém dificilmente se alcança a saturação máxima) e ao se associar a um íon ferroso torna-se ferritina.

Essa associação impede que o Fe forme agregados deletérios de precipitados tóxicos, a conjugação destes formam cadeias leves (chamadas básicas) e cadeias pesadas (chamadas ácidas), e a proporção entre as cadeias determina a acidez da isoferritina.

Na corrente sanguínea, o Fe normalmente está associado a proteínas de transporte, sendo a transferrina (Tf) sérica a principal condutora de Fe no organismo. A Tf tem predileção por Fe^{3+} , embora tanto no enterócito quanto no macrófago a exteriorização do Fe pela FPN é em Fe^{2+} . Para ligar-se à Tf deve ocorrer a oxidação do Fe^{2+} em Fe^{3+} pela hefaestina da membrana basolateral no enterócito, enquanto no macrófago, semelhantemente a ceruloplasmina exerce essa função de oxidação (Pantopoulos et al., 2012). A Tf é sintetizada pelo fígado e outros órgãos e quando se encontra em pH neutro pode carregar dois Fe^{3+} . A Tf solubiliza e facilita a sua obtenção pelas células. Fisiologicamente, tem a capacidade de transportar até 12 mg do íon, porém raramente ela se encontra em sua capacidade máxima, e em torno de apenas 3 mg estão ligados a Tf em circulação. O receptor de Tf (TfR) presente na maioria das células, se complexa com a Tf e a interação Tf-TfR ocorre pela facilidade promovida pelo pH de 7,4 fora da célula. O Tf-TfR complexado com HFE (proteína da hemocromatose) é internalizado por endocitose, e dentro do endossomo o pH é reduzido através da ação da bomba de prótons dependente de ATP (adenosina trifosfática), liberando o Fe da Tf, enquanto o complexo Tf-TfR é reaproveitado. O íon ferro dentro do endossomo está na forma de Fe^{3+} e para ser translocado para o citoplasma precisa passar pela DMT-1 presente na membrana do endossomo. Nesse momento há a ação de uma ferredutase denominada steap 3 que realiza a redução de Fe^{3+} para Fe^{2+} (Fleming et al., 1998; Pantopoulos et al., 2012).

O controle do equilíbrio entre absorção, utilização e manutenção do estoque, é realizado majoritariamente por um hormônio peptídico circulante com função regulatória, a hepcidina. Esse hormônio tem origem a partir de um propeptídeo com 84 aminoácidos sintetizado no fígado e liberado no plasma sanguíneo em resposta a alguns estímulos específicos. Quando a hepcidina se liga à FPN (além de facilitar a externalização do Fe, este também atua como receptor de hepcidina), o complexo FPN-Hepcidina é internalizado e degradado no interior dos macrófagos, hepatócitos e enterócitos. Dessa forma, o Fe não consegue ser retirado, aumentando os níveis intracelulares e estocados como

ferritina, ao mesmo tempo que reduz os níveis circulantes deste metal (Figura 2).

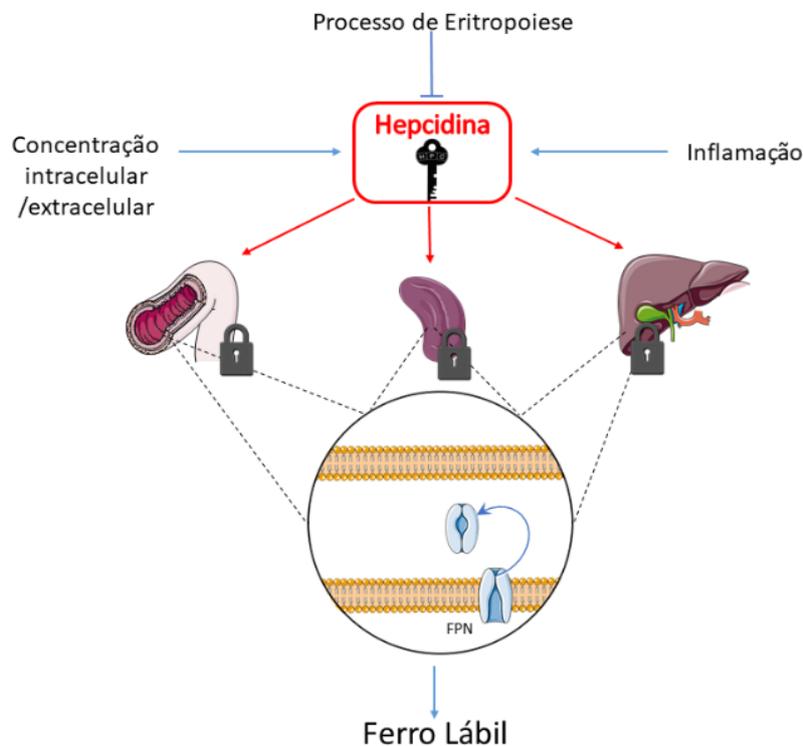


Figura 2 - Principais mecanismos de liberação da hepcidina pelo fígado e sua ação sobre o metabolismo do Fe (Fonte: o Autor)

O aumento de ferro circulante e inflamação (IL-6) aumenta a expressão de hepcidina enquanto a hipóxia, deficiência de ferro ou sinais de disfunção eritropoética reduzem esta expressão (Pantopoulos et al., 2012).

Em relação ao processo de excreção de Fe do nosso organismo, não é conhecido até o momento qualquer mecanismo fisiológico específico e regulável para tal. Assim, o ferro é eliminado pela sudorese, passivamente pela descamação da pele e do epitélio intestinal onde a ferritina está depositada, ou em sangramentos ocasionais (ou regulares, no caso do ciclo menstrual, que leva a perdas maiores de Fe pelo organismo). Quando ocorre aumentos excessivos no ganho de Fe pelo organismo e a Tf está totalmente saturada, o Fe circula livremente pelo plasma na forma não ligada a Tf (*Non-Transferrin Bound Iron*, NTBI), podendo participar de reações químicas geradoras de espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs), além de se acumular em órgãos e tecidos causando danos celulares nos casos de sobrecarga.

1.1.2 Ferro e o estresse oxidativo

Radical livre é um átomo ou molécula que contém um valor ímpar de elétrons na última camada eletrônica, tornando-o altamente reativo o que justifica a denominação “espécie reativa”. Os radicais livres se formam a partir de reações de oxidação (perda de elétron) e redução (ganho de elétron), deste modo, provocando ou resultando de reações de óxido-redução. (Halliwell, 1992; Halliwell; Gutteridge, 1990). Na maioria das vezes são resultados da metabolização do O_2 e por esse motivo o termo espécie reativa de oxigênio (ERO) é utilizado. A ação Redox (reação oxido-redução) é um acontecimento fisiológico na maioria dos seres vivos de metabolismo aeróbio e o O_2 passa por redução com a introdução de quatro elétrons que originam H_2O . Ao perpassar a esse processo são originados outros subprodutos reativos intermediários como por exemplo o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) radical hidroxila (OH^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Cohen, 1989).

As EROs são produzidas em diferentes quantidades e têm também ações diferentes no organismo. O $O_2^{\cdot-}$. Tem sua origem após a redução do O_2 e está presente em quase toda a totalidade das células aeróbicas. Tem seu ápice de produção durante a atividade de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (Halliwell; Gutteridge, 1986, 1990). Tem grande capacidade lesiva secundaria em conjuntos produtores de $O_2^{\cdot-}$ apesar de baixa eficiência em soluções aquosas (Ferreira, A.L.A; Matsubara, 1997). O radical OH^{\cdot} é uma ERO altamente reativa que pode se combinar rapidamente com metais ou outros radicais gerados no mesmo local. Se essa reação ocorrer perto do DNA, e estiver ligado a um metal, pode haver alterações nas bases purínicas e pirimídicas do DNA, resultando em inativação ou alteração do material genético. Além disso o OH^{\cdot} pode interferir e inativar proteínas ao oxidar sulfidrilas e pontes dissulfeto e iniciar o processo de oxidação de ácidos graxos poli-insaturados de membranas celulares, processo conhecido como lipoperoxidação (Ferreira, A.L.A; Matsubara, 1997; Halliwell, 1992; Halliwell; Gutteridge, 1990). O OH^{\cdot} é reconhecido como a ERO mais significativa da lipoperoxidação (Gutteridge, 1988), estando o Fe com papel determinante para o início deste processo, (Horton; Rice-evans; Fuller, 1989; Minotti; Aust, 1987).

O H₂O₂ apesar de não possuir elétron desemparelhado, e por esse motivo não ser um radical, é resultado do metabolismo do O₂ que causa danos, pois participa da reação que produz OH[•]. O H₂O₂ é um metabólito deletério e tem uma longa duração, transpassa pela barreira lipídica e pode interagir com a membrana de eritrócitos e proteínas relacionadas ao Fe²⁺ (Scott et al., 1991)

Assim, é natural reconhecer que a fração de Fe livre deve ser mantida baixa, pois esta possui fácil interconversão entre Fe²⁺ e Fe³⁺, o que o torna bastante reativo em processos de redução-oxidação (Pierre; Fontecave, 1999) convertendo o H₂O₂ em OH[•], pela reação de Fenton (figura 3) e Haber-Weiss (figura 4), que é altamente danoso a lipídios de membrana, ácidos nucleicos e proteínas (Edison et al., 2008) como já mencionado anteriormente.

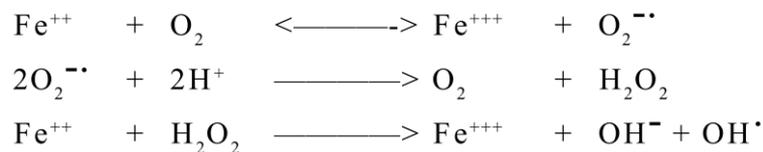


Figura 3 - Reação de Fenton

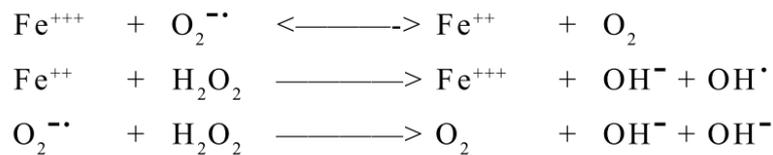


Figura 4 - Reação de Haber-Weiss

Quanto à ação das EROs, todo o conteúdo celular é susceptível aos efeitos deletérios, entretanto, a membrana lipídica é o alvo com maior prejuízo com alterações na integridade estrutural e na função, ou seja, na permeabilidade das membranas celulares (Mello Filho; Hoffmann; Meneghini, 1984). Com a perda da função seletiva da membrana, ocorre a liberação do conteúdo lisossomal e a formação de produtos citotóxicos, como o malondialdeído, resultando em morte celular. (Ferreira, A.L.A; Matsubara, 1997). A lipoperoxidação pode estar associada a mecanismos de envelhecimento, surgimento de câncer e liberação de xenobióticos, (Shan; AW; Jones, 1990). Por outro lado, a formação de EROs e os processos que envolvem a lipoperoxidação, nem sempre são apenas deletérios, pois alguns desses processos corroboram em reações de cascata do

ácido araquidônico (significativo para a geração de prostaglandinas) e consequentemente na resposta inflamatória (Halliwell; Gutteridge, 1990). Além disso, as EROs também influenciam a transcrição genica, produzindo mediadores pró-inflamatórios (Haddad, 2002); modulam proteínas quinases (Kamata; Hirata, 1999); formam prostaglandinas a partir de isoprostanos independente da via da ciclooxigenase (COX) (Rokach et al., 2004); e estão envolvidas no mecanismo de defesa contra microrganismos através da ação de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (Ferreira, A.L.A; Matsubara, 1997; Flannagan; Heit; Heinrichs, 2015).

Para o perfeito equilíbrio do funcionamento fisiológico a concentração de EROs deve estar dentro de padrões funcionais, ou seja, deve haver equilíbrio, entre os atores óxido-redutores e os antioxidantes. Para a proteção da integridade celular, esta possui duas linhas de proteção que atua como detoxificação com ação preventiva (ou seja, antes da lesão) e é constituída por glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. Outra linha de defesa, pós lesão, tem o papel de restaurar a lesão sendo constituída pelo ácido ascórbico, glutathiona-redutase (GSH-Rd) e GSH-Px (Hebbel, 1986).

A caracterização do estresse oxidativo se dá quando, a relação entre a produção de EROs *versus* a ação antioxidante está desequilibrada. Normalmente a ação deletéria se dá com o aumento de EROs e consequentes danos causados a estrutura celular. Havendo, então o desequilíbrio entre a oxidação de glutathiona reduzida (GSH) e a produção de glutathiona oxidada (GSSG) (Gilbert, 1990; Halliwell, 1993; Shan; AW; Jones, 1990).

1.2 A sobrecarga de ferro no organismo

“no entanto, muito de uma coisa boa pode ser ainda pior...”
Ponka (2000)

Apesar da necessidade da manutenção de um equilíbrio dos níveis séricos de Fe, algumas situações podem acarretar elevações suprafisiológicas, o que caracteriza uma sobrecarga. Como já mencionado, por uma ausência de um mecanismo específico de eliminação que possa ser recrutado, o organismo pode desenvolver sobrecarga de ferro devido a elevações no ganho deste

elemento tanto por desordens primárias (quando surgem em consequência de doenças genéticas que envolvem elementos responsivos ao Fe como no caso da Hemocromatose hereditária - HH), quanto por origens secundárias (se relacionam a doenças adquiridas, hemólise excessiva ou administrações repetidas). Vale ressaltar que a politransfusão de sangue ou concentrado de hemácias é um importante causador da sobrecarga independente da doença de base. Além de doenças hematológicas outras doenças podem desencadear a sobrecarga de ferro como hepatite C (Di Bisceglie *et al.*, 1992; Sebastiani *et al.*, 2006) e aceruloplasminemia (Harris *et al.*, 1998). Independente da causa, a sobrecarga de ferro tem um índice alto de morbidade e mortalidade com disfunção dos órgãos em que o Fe se deposita, incluindo o sistema cardiovascular.

Além da sobrecarga crônica, as intoxicações agudas com esse metal também têm importância em saúde. O Fe pode ser encontrado em muitos polivitamínicos, e esses por muitas vezes são acessados sem prescrição médica, tornando sua disponibilidade algo comum e fácil. É possível sofrer intoxicação por ferro em caso de superdosagem desses comprimidos, sobretudo em crianças pequenas. De fato, a ingestão destes preparados pode pôr em risco a saúde de crianças e adultos; sendo em crianças a intoxicação por ferro a forma mais comum em menores de 6 anos por ingestão acidental, enquanto em adultos está associada na maior parte das vezes à tentativa de suicídio (Fine, 2000). As apresentações de Fe mais populares são sulfato ferroso (325 mg, 20% de Fe), gluconato ferroso (300 mg, 12% de Fe) e fumarato ferroso (100 mg, 33% de Fe). No acompanhamento pré-natal, ainda pode ser encontrado em prescrições que podem conter de 60 até 90 mg de Fe a cada comprimido. Incluindo gestantes ou não gestantes com anemia ou hipoferritinemia severas, também são prescritas infusões parenterais de soluções contendo ferro em altas doses. A dosagem inicialmente tóxica é partir de 20 a 60 mg (moderado), e acima disso é considerada alta toxicidade e pode levar a morbidades e ao óbito (Yuen; Becker, 2022). Uma característica do sulfato ferroso para uso oral é a sua apresentação ser semelhante a doces ou pequenas balas ou gotas de chocolates de uso comum na infância (Disqueti®, M&M's™, etc), o que chama a atenção de crianças (Ponka, 2000). Em dados do ano de 2019 (tabela 1) do *Annual Report of the American Association of Poison Control Centers (AAPCC)*, excluindo-se

vitaminas com ferro, houve 6.608 intoxicações por Fe, 2.130 casos em crianças menores de 5 anos, 1.240 casos em adultos, e 695 internações.

Casos	Idade				INt		Desfecho			
	≤5	6-12	13-19	≥20	Nenhum	Menor	Moderado	Maior	Óbito	
6608	2130	190	1682	1240	695	998	674	142	12	0

Tabela 1 - Annual Report of the American Association of Poison Control Centers (AAPCC). Tabela de casos de intoxicação por Ferro, excluindo vitaminas que contenham ferro em sua formulação, casos 6608; crianças entre zero e cinco anos 2130; seis e doze anos 190; treze e dezenove anos 1682; maiores de vinte anos 1240; Internações (INt) 695; desfechos: nenhum 998; menor 674; moderado 142; maior 12; óbito 0 no ano de 2019. (Gummin et al., 2020)

Além da via oral, a via parenteral também pode ser a responsável pela intoxicação. De fato, a injeção intravenosa de ferro é indicada em anemias ferroprivas muito graves, quando a administração oral não é tolerada, em pacientes gastrectomizados ou em pacientes com grandes perdas como doentes renais em hemodiálise e em doenças hemolíticas.

Apesar dessas utilidades do ferro por via oral ou parenteral, deve-se manter a preocupação com a segurança tanto a curto quanto a longo prazo, em relação ao estresse oxidativo gerado e suas lesões associadas. Nas várias doenças e condições de sobrecarga de Fe, os sinais e sintomas estão relacionados aos seus danos celulares, quase na sua totalidade relacionados ao estresse oxidativo gerado. Uma quantidade excessiva de Fe no organismo está relacionada a alterações em diversos órgãos e sistemas, e o comprometimento hepático é majoritariamente notado por ser este um órgão armazenador de Fe (Santos et al., 2012b; Santos et al., 2012a; Siddique & Kowdley, 2012). A progressão para doenças no sistema endócrino também acomete pacientes com sobrecarga de Fe, como diabetes (70% dos pacientes com cirrose) (Siddique & Kowdley, 2012), hipogonadismo (Siminoski; D'costa; Walfish, 1990), disfunção tireoidiana (Edwards et al., 1983), e doenças osteoarticulares (Valenti et al., 2009), além de alterações na pigmentação da pele. As primeiras complicações cardíacas severas foram relatadas em pacientes com HH (hemocromatose hereditária) (Engle; Erlandson; Smith, 1964) e em pacientes em tratamento de anemias dependentes de transfusões (Leon et al., 1979). Nas décadas

subsequentes, muitos outros estudos clínicos e experimentais relacionam sobrecargas aguda e crônica à disfunção cardíaca (Díez-López, 2018), insuficiência cardíaca e associação ao processo aterosclerótico (Buja; Roberts, 1971; Marques et al., 2019; Murphy; Oudit, 2010; Naito; Masuyama; Ishihara, 2021). Os cardiomiócitos estão expostos a uma quantidade maior de ferro devido à: 1) O ferro não ligado a transferrina tem uma maior absorção em tecidos excitáveis comparado aos tecidos não excitáveis pois exibem uma maior quantidade canal de cálcio tipo L dependente de voltagem (LTCC)(Gujja et al., 2010); 2) Participações de outras vias de entrada de ferro tais como canais de cálcio tipo T (Gujja et al., 2010; Oudit et al., 2003) . As manifestações se caracterizam por rigidez do ventrículo e menor capacidade de relaxamento em decorrência a deposição crescente e gradual de ferro e surgimento de fibrose miocárdica em pacientes com sobrecarga de ferro (Díez-López; Comín-Colet; González-Costello, 2018; Murphy; Oudit, 2010). Outra interação do ferro lábil é a alteração do atividade elétrica e mecânica das células cardíacas através da competição entre Fe^{2+} pelos canais de Ca^{2+} na membrana, transportadores e outros locais que são significantes para a excitação cardíaca além de produzir distúrbios deletérios bioquímicos através da geração de EROs nos cardiomiócitos (Gordan et al., 2018; Gulati et al., 2014; Paterek; Mackiewicz; Mańczewski, 2019; Siri-angkul et al., 2018).

1.2.1 Modelos experimentais de sobrecarga de ferro e seus efeitos sobre o sistema cardiovascular

Os mecanismos moleculares da lesão celular induzida pela sobrecarga de Fe em ratos indicam que o estresse oxidativo tem ação significativa no coração cronicamente e agudamente (Andreu et al., 2009; Lou et al., 2009b). Em relação à função cardíaca, verificou-se diminuição do trabalho e do débito cardíaco e aumento de mortalidade em ratos tratados cronicamente com Fe por injeções intraperitoneais (Kramer et al., 2012; Oudit et al., 2004), o que recapitula a cardiopatia identificada frequentemente nos pacientes com sobrecarga férrica nos tecidos (Demant et al., 2007). Sobre os efeitos agudos, Ávila et al. (2016) demonstrou que o Fe^{2+} reduziu a força contrátil do coração de ratos com forte influência da concentração e do tempo de exposição. Especialmente nos cardiomiócitos, já foi descrito que a internalização do Fe^{2+} pode se fazer por

diversos canais para Ca^{2+} , além do DMT-1 e do complexo Tf-TfR-HFE, e que o efeito cumulativo de radicais livres e consequente estresse oxidativo seriam fruto dessa somatória de vias de entrada (Ávila et al., 2016; Kumfu; Chattipakorn; Chattipakorn, 2017; Oudit et al., 2003).

Apesar disso, tal como recentemente revisado por dos Santos et al (2022b), embora a relação entre excesso de ferro e danos cardíacos tenham sido demonstrada há mais de 60 anos, e apesar de todas as evidências de fortes fatores de risco para disfunção endotelial e doença arterial, a influência da sobrecarga de ferro na função vascular tem sido relativamente negligenciada.

1.2.2 Efeito da sobrecarga crônica de ferro sobre o leito vascular

Como mencionado, quanto à função vascular, o conjunto de informações disponíveis é bem menor. Em estudo com humanos foi demonstrado que a sobrecarga crônica de Fe foi associada de forma significativa à redução da dilatação endotélio-dependente da artéria braquial (Gaenger et al, 2002). Em camundongos injetados cronicamente com Fe verificou-se diminuição do pico de relaxamento induzido pela acetilcolina e redução dos níveis de nitratos e nitritos urinários também sugerindo redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) (Day et al, 2003). Em um estudo realizado em 2015, em ratos administrados cronicamente com Fe por via intraperitoneal, nosso grupo de pesquisa observou diminuição da biodisponibilidade de NO e aumento na produção de EROs com participação provável da NADPH oxidase e xantina oxidase em conjunto com o sistema renina angiotensina (SRA) e a via da COX (Marques et al., 2015). Outro estudo mais recente, também do nosso grupo, demonstrou que a sobrecarga de Fe crônica aumenta o processo de aterosclerose e leva a disfunção do endotélio em camundongos e relaciona esses efeitos ao estresse oxidativo e ao desequilíbrio entre os fatores que favorecem a vasoconstrição e vasorelaxamento (Marques et al., 2019). Rossi et al (2020), descreveu que o benefício cardiovascular caracterizado pelo aumento da produção de NO e redução do estresse oxidativo promovido pelo exercício físico aeróbico em ratos não foi observado quando esses animais eram previamente submetidos a sobrecarga crônica de (Rossi et al., 2020).

Sabe-se que o endotélio vascular é um órgão parácrino e endócrino, responsável por produzir e liberar diversas substâncias vasoativas,

antiagregantes, antiproliferativas e anti-inflamatórias, e dessa maneira controlar não só o tônus vascular e a resistência periférica, mas a homeostase vascular (Brozovich et al., 2016; Huang et al., 2007; Loirand; Pacaud, 2014; Rang et al., 2015; Wojciak-Stothard et al., 2012); sendo assim um alvo importante para os efeitos danosos do excesso de Fe livre.

1.3 Papel do Endotélio no controle do tônus vascular

Propõe-se a divisão da circulação em duas partes. A primeira delas é a circulação pulmonar, responsável por oxigenar o sangue que sai do ventrículo direito através da válvula pulmonar e percorre o tronco pulmonar até os pulmões, onde ocorre a hematose. O sangue oxigenado retorna para as veias pulmonares e segue até o átrio esquerdo. Já a circulação sistêmica é responsável por levar o sangue a todos os órgãos do corpo, nutrindo e difundindo oxigênio para uma enorme quantidade de células através da arborização da rede capilar.(Hall; Guyton, 2017).

Durante as décadas de 1970 e 1980 grandes avanços no conhecimento das funções das células endoteliais vasculares conduziram ao seu reconhecimento como papel central na homeostase vascular. Além de simplesmente servirem como barreira entre o sangue e a parede vascular (ou interstício, no caso dos capilares), Furchgott et al descobriu que as células endoteliais possuem um importante papel na modulação do tônus vascular, comparado vasos aórticos de coelho que passaram por fricção da camada íntima com vasos intactos, e que não mais expressavam uma resposta vasodilatadora (Furchgott; Zawadzki, 1980). Atualmente, é bem reconhecido que o endotélio é fundamental no controle do tônus vascular através da liberação de vários fatores vasodilatadores ou vasoconstritores que, em condições fisiológicas, devem permanecer em certo equilíbrio. Os principais fatores vasodilatadores são: óxido nítrico (NO), a prostaciclina (PGI₂) e hiperpolarização derivada do endotélio (HDE). Dentre os fatores constritores, os principais são endotelina-1 (ET-1), angiotensina II, prostaglandinas H₂ e F_{2α} (PGH₂ e PGF_{2α}), tromboxano A₂ (TXA₂), e espécies reativas como EROs e peroxinitrito (Boron; Boulpaep, 2015; Brozovich et al., 2016; Vanhoutte et al., 2017a).Três isoenzimas NO sintases (NOS) catalisam a produção de NO a partir de L-arginina: NOS neuronal, NOS induzível e a NOS endotelial. A NOS endotelial (eNOS) está localizada nas cavéolas e sua ligação

com a Cav-1 (caveolina-1) resulta em impedimento alostérico. Quando há um aumento nas concentrações citosólicas de cálcio, por meio de vários estímulos, o cálcio se une à calmodulina formando o complexo cálcio-CaM, o que ativa a eNOS e causa a dissociação da Cav-1.(Förstermann; Sessa, 2012; Vanhoutte et al., 2016). A convergência da eNOS para o citosol oferece um meio rico em O₂, substratos, cofatores e fatores de transdução (Fleming, 2010; Förstermann; Sessa, 2012; Michel; Vanhoutte, 2010). A produção de NO a partir de L-arginina pela eNOS conta com cofatores como a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) , mononucleotídeo de flavina (FMN), calmodulina (CaM) e, Fe heme e BH4 (tetrahydrobiopterina) (Förstermann; Sessa, 2012; Michel; Vanhoutte, 2010; Vanhoutte et al., 2017).

O NO é um gás lipofílico com meia vida curta e transloca para fora da célula endotelial. É um grande vasodilatador que assume, também, um papel de inibição da agregação plaquetária e leva a desagregação plaquetária. A força tangencial que age nas células do endotélio por intermédio do fluxo sanguíneo (*shear stress*) também estimula a enzima eNOS para a produção de NO. No interior das CMLV, a guanilato ciclase solúvel, que serve de receptor para NO, converte trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). A proteína quinase dependente de GMPc (PKG) tem o papel de fosforilar quinase de cadeia leve da miosina (MLCK) e a Calcio-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA). A fosforilação inibe a MLCK, o que reduz efetivamente a fosforilação da miosina de cadeia leve (MLC) e uma diminuição na interatividade entre miosina e actina. SERCA é ativada pela fosforilação o que resulta no decréscimo do [Ca²⁺]_i resultando em relaxamento das CMLV acarretando em vasodilatação. (Boron; Boulpaep, 2015; Brozovich et al., 2016)

Como já mencionado, as células endoteliais liberam outros compostos vasoativos como a prostaciclina (PGI₂), endotelinas (ETs), tromboxano A₂, etc. PGI₂ é um vasodilatador metabolizado pela prostaciclina sintase que maneja ácido araquidônico à PGI₂. Um vasoativo de longa duração e relevância significativa são as ETs, na maioria das CMLV, e encontram-se em três isopeptídeos ET-1, ET-2 e ET-3. A célula endotelial converte a pré-proendotelina em pro-endotelina e sequencialmente em endotelina madura, o subtipo de receptor de ET que rege a vasoconstrição é ET_A. Existem, concomitantemente, outros receptores como ET_{B1} que cursa em vasodilatação e ET_{B2} com função

vasoconstritora. Outro vasoativo liberado por células endoteliais o TXA₂ resulta da metabolização do ácido araquidônico pela ciclooxigenase. O TXA₂ atua nos receptores TXA₂/prostaglandina H₂ (TP), abrindo os canais para Ca tipo L elevando o [Ca²⁺]_i. Há uma diminuição do efeito vasodilatador do NO pela ativação de receptores para tromboxano/prostaglandina (TP) que eleva os níveis de O₂^{•-} (Boron; Boulpaep, 2015; Brozovich et al., 2016; Hall; Guyton, 2017)

1.4 Disfunção endotelial mediada por EROs

A disfunção endotelial associada a grande presença de EROs, manifesta principalmente pela redução na biodisponibilidade de NO, levando ao aumento do tônus, imunoestimulante, pro-inflamatório, proativo à proliferação e trombótico (Levine; Punihale; Levine, 2012; Santillo et al., 2015). A redução da biodisponibilidade pode ocorrer pela inativação do NO (reação de O₂^{•-} na produção de ONOO⁻); diminuição na expressão de eNOS; redução de substratos ou cofatores de eNOS; desacoplamento da eNOS ou presença de inibidores endógenos (Levine; Punihale; Levine, 2012). Além disso, a diminuição da biodisponibilidade de NO interfere no desenvolvimento de placas ateroscleróticas, que avançam quando as células endoteliais estão disfuncionais. A aterosclerose é uma condição inflamatória, e o óxido nítrico apresenta propriedades anti-inflamatórias robustas (Marques et al., 2019; Shaito et al., 2022).

O NO, como já visto, interage como vasoativo e em condições normais, na presença de cofatores específicos, incluindo NADPH e BH₄, a eNOS catalisa a L-arginina na produção de NO e L-citrulina (Griendling et al., 2021; Tejero; Shiva; Gladwin, 2019). Porém quando o organismo se encontra em situações de diminuição da capacidade antioxidante ou em condições aumentadas de estresse oxidativo, a eNOS perde um elétron do NADPH para o O₂ formando O₂^{•-} ao invés de NO (Daiber et al., 2019; Griendling et al., 2021). A oxidação de BH₄, a fosforilação da eNOS e a S-glutationilação dão origem a o desacoplamento da NOS. A diminuição de BH₄ por meio de processos que envolvem EROs é o importante fator primordial para o desacoplamento da NOS. O O₂^{•-} oxida o BH₄ a BH₂ na NOS, nas 3 isoformas, na eNOS o triptofano 447 no domínio de ligação de BH₄, desencadeia esse desacoplamento em condições de estresse, desta forma, quando a interação entre BH₄ e eNOS é prejudicada há um aumento preferencial na geração de O₂^{•-} (Benson et al., 2013; Griendling et al., 2021).

Dessa forma, o desacoplamento da NOS, aditado a lipoperoxidação de membranas contribuem para a diminuição da biodisponibilidade de NO produzida nas células endoteliais presente nos vasos (Ferreira, A.L.A; Matsubara, 1997; Griendling et al., 2021).

A geração em excesso EROs por meio da ativação da NADPH oxidase ou de outros sistemas geradores de estresse oxidativo intracelulares, como a monoaminoxidase, xantina oxidase, ciclooxigenase, lipoxigenase ou o metabolismo mitocondrial, pode ocasionar um estado de estresse oxidativo (Griendling et al., 2021). O aumento de EROs acaba resultando na diminuição dos níveis de NO, estimula a invasão de células mononucleares, aumenta a oxidação lipídica, favorece a alteração de fenótipo das células musculares lisas vasculares, desencadeia disfunção endotelial, favorece a inflamação e modifica as respostas e tônus vasculares (Saleh Al-Shehabi; Iratni; EID, 2016; Taniyama; Griendling, 2003; Vokurkova; Xu; Touyz, 2007). De maneira geral, os estudos corroboram enfaticamente o papel do estresse oxidativo na progressão de doenças cardíacas e vasculares, tais como hipertensão, aterosclerose, insuficiência cardíaca, fibrilação atrial, aneurismas aórticos e reestenose vascular (GUZIK et al., 2013; SENONER; DICHTL, 2019; SHAITO et al., 2022; VOKURKOVA; XU; TOUYZ, 2007; ZENG et al., 2009)

A disfunção das células endoteliais desempenha um papel importante na patogênese de várias doenças cardiovasculares, como por exemplo na aterosclerose. A disfunção das células endoteliais facilita a penetração de moléculas de lipoproteína de baixa densidade (LDL) na camada íntima, que se acumulam e oxidam em um mecanismo que depende principalmente de EROs. A LDL oxidada (ox-LDL) então induz a expressão de moléculas de adesão celular, que atraem leucócitos inflamatórios para o espaço subendotelial (TOUYZ et al., 2017). AEssas células inflamatórias liberam substâncias, chamadas interleucinas e outras citocinas que provocam mais inflamação. Isso aumenta a multiplicação e deslocamento de células musculares lisas das paredes arteriais, além de aumentar a deposição de substâncias como matriz e lipídios, o que pode levar à formação de uma placa aterosclerótica (DAVIES et al., 1993; MARTINET et al., 2019; SALEH AL-SHEHABI; IRATNI; EID, 2016; TABAS; WILLIAMS; BORÉN, 2007). Algo importante para ressaltar sobre as placas ateroscleróticas, é a característica de avançarem com mais afinco quando há disfunção endotelial,

ou seja, com comprometimento da produção de NO, o que não é novidade pois a aterosclerose é uma doença inflamatória e oportuniza-se a ausência do fator antiinflamatório que a ausência do gás permite. (SALEH AL-SHEHABI; IRATNI; EID, 2016; TABAS; WILLIAMS; BORÉN, 2007).

Sobre outras importantes doenças cardiovasculares, a insuficiência cardíaca, diversas evidências implicam o estresse oxidativo no seu desenvolvimento. Diferentes estudos, tanto clínicos quanto experimentais, relacionam as EROs à incidência de marcadores de gravidade na insuficiência cardíaca (BELCH et al., 1991; HILL; SINGAL, 1997; JUDKINS et al., 2010; SENONER; DICHTL, 2019).

1.5 Justificativa e Hipótese

Como podemos observar, muito se tem estudado sobre a sobrecarga de Fe e seus efeitos nos cardiomiócitos e mais recentemente no leito vascular, porém, sempre de forma crônica. Entretanto é tão importante quanto, se faz necessário investigar os mecanismos envolvidos na intoxicação aguda de ferro sobre a vasomotricidade, para que futuramente se possa também buscar novas abordagens clínicas ou desenvolver novos fármacos para a melhora ou a recuperação de pacientes em condições agudas.

Devido à vasculopatia já descrita "in vivo" em modelos de exposição crônica e o potencial oxidativo que o Fe pode exercer, o presente trabalho testa a hipótese que a exposição aguda "in vitro" de segmentos aórticos ao Fe²⁺ altera a estrutura e função endotelial, especialmente em seu papel modulador sobre o tônus vascular.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar se a exposição *in vitro* a altas concentrações de Fe^{2+} “*in vitro*” é capaz de induzir alterações morfofuncionais no endotélio vascular de segmentos aórticos de ratos.

2.1.1 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da exposição *in vitro* a diferentes concentrações de Fe^{2+} sobre a reatividade vasoconstrictora de segmentos aórticos.
- Avaliar se a exposição *in vitro* a altas concentrações altera a resposta vasodilatadora dependente e independente do endotélio.
- Avaliar os efeitos das altas concentrações de Fe^{2+} sobre o papel modulatório do endotélio na reatividade vasoconstrictora.
- Avaliar os efeitos das altas concentrações de Fe^{2+} sobre o papel do óxido nítrico na reatividade vasoconstrictora.
- Avaliar se a exposição *in vitro* a altas concentrações de Fe^{2+} altera a biodisponibilidade de óxido nítrico em segmentos aórticos.
- Avaliar se as alterações de reatividade promovidas pelas altas concentrações de Fe^{2+} são dependentes do OH^{\cdot} e H_2O_2 .
- Avaliar se a exposição *in vitro* a altas concentrações de Fe^{2+} altera a morfologia da superfície endotelial dos segmentos aórticos.
- Realizar a microanálise de elementos químicos presente na superfície endotelial dos segmentos aórticos expostos a altas concentrações de ferro.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais Experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus albinus*) (aprox. 3 meses, 250-300g), cedidos pelo biotério do CCS-UFES e mantidos sob condições controladas de temperatura e um ciclo claro-escuro de 12/12 horas, tendo livre acesso à água tratada e à ração especial para roedores. O projeto e protocolos estavam de acordo com os princípios éticos da pesquisa com animais estabelecidos pelo CONCEA e foram aprovados pela Comissão de Ética para Experimentação e Uso de Animais (34/2018 CEUA-UFES).

3.2 Modelo “in vitro” de exposição ao Fe²⁺

3.2.1 Obtenção dos anéis de aorta e montagem da preparação

Os animais foram anestesiados com ketamina/xilazina (80/10 mg/kg, i.p.). Em seguida, foram transferidos para mesa cirúrgica, em decúbito dorsal, com as patas dianteiras e traseiras fixadas abertamente. Através de toracotomia, a aorta torácica foi cuidadosamente removida e imersa rapidamente em uma placa de Petri com solução de Krebs-Henseleit contendo, em mM: NaCl 118, KCl 4,7; NaHCO₃ 23; CaCl₂-2H₂O 2,5; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄-7H₂O 1,2; glicose 11 e EDTA 0,01. Na placa de Petri o tecido conectivo e adiposo foram cuidadosamente removidos e a aorta dividida em segmentos cilíndricos de aproximadamente 4 mm de comprimento (figura 5 A e B). Cada segmento foi montado em banho de órgãos contendo solução Krebs- Henseleit na temperatura de 36,5 ±0,5 °C e gaseificada com 95% de O₂ e 5% de CO₂ (pH 7,4). Dois fios de aço inoxidável, em forma de triângulos, foram passados através do lúmen dos segmentos de forma que fiquem paralelos na luz do vaso. Um triângulo foi fixado na parte inferior do banho e o outro foi conectado verticalmente a um transdutor de força isométrica (TSD125C, CA, USA) em uma cuba (figura 5C).

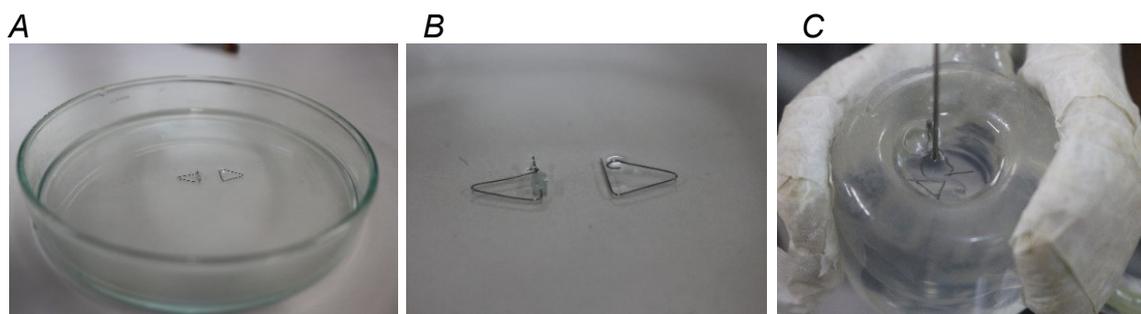


Figura 5 - A e B (em detalhe) segmento de aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, e depois montada na cuba C (fonte: O Autor)

Assim, qualquer alteração do diâmetro do vaso era captada pelo transdutor, que por sua vez estava conectado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems, Inc; Santa Barbara, CA, U.S.A) e este a um computador (Figura 6).

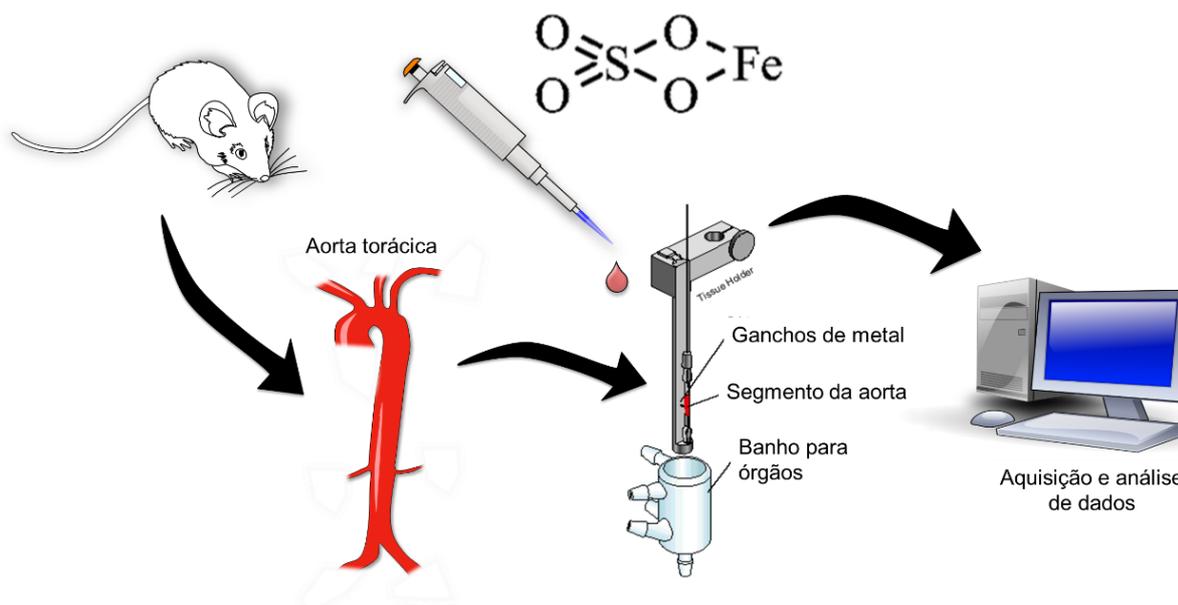


Figura 6 - Esquema sequencial para obtenção de anéis. Fonte Leonardo dos Santos

3.3 Estudo da reatividade vascular

3.3.1 Teste de viabilidade das preparações

Após a montagem, as artérias foram submetidas à tensão de repouso de cerca de 1g, $\pm 0,1g$, sendo reajustada quando necessário. A preparação foi mantida por um período de estabilização de 45 min antes de dar sequência aos protocolos experimentais. A seguir foi administrado ao banho uma solução de cloreto de potássio (KCl) 75 mM para verificar a atividade contrátil do MLV

induzida por despolarização. Após atingirem uma variação de pelo menos 1g de contração, a solução do banho foi substituída pela solução de Krebs-Henseleit padrão até retornar à tensão de repouso. Os anéis que não obtiveram tal contração foram descartados. Após 30 minutos de estabilização, uma nova incubação com de KCl 75 mM foi feita para a aquisição da contração máxima aferida após 30 minutos, tempo necessário para atingir um platô. Após, os anéis foram lavados três vezes com a solução de Krebs-Henseleit padrão para seu retorno ao basal (próximo a 1g) e, após 30 minutos de estabilização, esses anéis foram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio.

A integridade funcional do endotélio foi avaliada pela capacidade da acetilcolina adicionada ao meio (ACh 10^{-5} M) induzir relaxamento em anéis de aorta previamente contraídos com agonista α -adrenérgico fenilefrina (entre 10^{-7} e 10^{-6} M, o suficiente para atingir platô de pré-contração entre 50 a 70% da contração máxima ao KCl). A integridade funcional do endotélio foi documentada por um relaxamento igual ou superior a 80%. Para os anéis que tiveram o endotélio intencionalmente removido, o relaxamento não poderia ultrapassar 10%, sendo comum inclusive certo grau de contração à ACh.

3.3.2 Efeito da exposição a diferentes concentrações de Fe^{2+} sobre a reatividade vasoconstrictora

Após a verificação de viabilidade da preparação e o devido período de estabilização, os anéis foram incubados com diferentes concentrações de sulfato ferroso ($FeSO_4$, Sigma-Aldrich®), a saber: 10, 25, 100, 250 e 1000 μM ; por 30 minutos, conforme Avila et. Al. (2016). Em seguida, foram realizados protocolos de reatividade vasoconstrictora à fenilefrina, como descrito a seguir e ilustrado na figura 7.

A análise da resposta vasoconstrictora foi realizada pela construção de uma curva concentração-resposta à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M) de maneira cumulativa e aguardando-se o platô atingido a cada concentração, sendo representada pelo grau de força obtido em relação à contração máxima ao KCl (% do KCl).

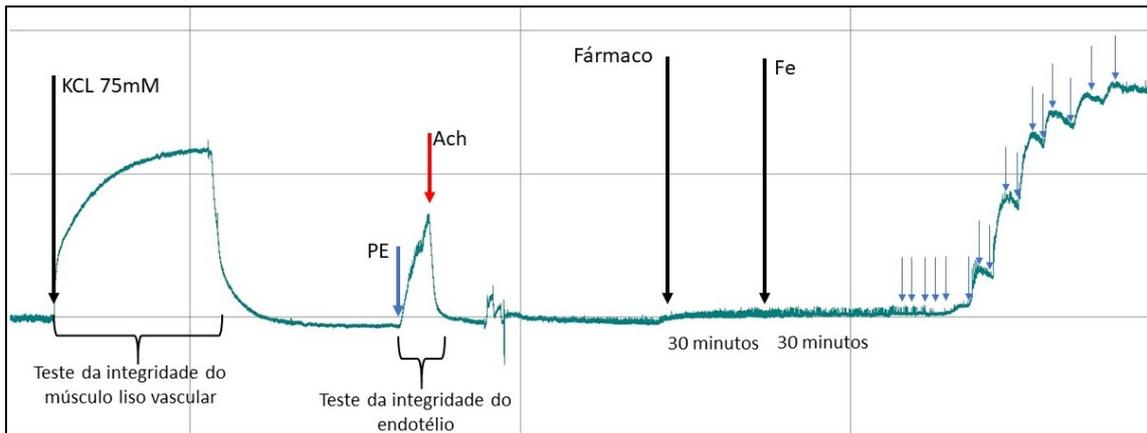


Figura 7 - Esquema representativo dos protocolos das curvas concentração resposta, no miógrafo de arame. Após estabilização de 45 minutos dos segmentos, KCl 75mM era adicionado ao banho de órgãos, até ocorrer a contração máxima por despolarização do musculo liso, a solução era trocada 3x e ajustada novamente para a tensão basal de 1g. Após o período de estabilização (30 minutos) era adicionado PE até o vaso atingir 50-70% da contração ao KCl. Integridade do endotélio era avaliada pela capacidade da ACh causar relaxamento igual ou superior a 80%. Após o teste do endotélio a solução era novamente trocada, aguardado estabilização e adicionado fármaco, após 30 minutos era adicionado as concentrações de ferro, A curva concentração resposta se iniciava após a incubação com ferro por 30 minutos (ACh) Acetilcolina, (PE) Fenilefrina

Para efeito de simplificação do estudo e otimização dos segmentos, todos os protocolos descritos a partir deste momento, foram realizados utilizando-se o modelo de exposição “in vitro” de segmentos aórticos, por 30 minutos, apenas nas concentrações de 100 e 1000 μM de Fe^{2+} em comparação com anéis não incubados com Fe^{2+} . É válido destacar que quantidades superiores a 100 μM , correspondentes a cerca de 400 $\mu\text{g}/\text{dL}$, são encontradas nos modelos de sobrecarga crônica frequentemente mencionados na literatura, os quais constataram prejuízos cardiovasculares.

3.3.3 Análise da função endotelial e fatores envolvidos nas alterações de reatividade vascular

3.3.3.1 Relaxamento dependente e independente do endotélio

Após 30 minutos da adição de Fe^{2+} na solução nutritora, a função vasodilatadora dependente ou independente do endotélio foi avaliada. Para análise do relaxamento dependente do endotélio os anéis de aorta foram previamente contraídos com fenilefrina 10^{-7} M ou, quando necessário, adicionado soluções mais concentradas até atingir de 60 a 70% da contração do KCl. Uma vez obtido o platô, foi realizada uma curva concentração-resposta cumulativa, à ACh (10^{-11} a 10^{-4} M), aguardando-se a devida resposta de cada

passo. Por outro lado, a vasodilatação independente do endotélio foi analisada através do relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS), doador de óxido nítrico. Assim como para ACh, foi feita pré-contracção com fenilefrina até atingir platô com 60-70% da contracção ao KCl, e a seguir, foi realizada curva concentração-resposta ao NPS em concentrações de 10^{-11} a 10^{-4} M.

3.3.3.2 Papel da modulação endotelial sobre a reatividade vasoconstrictora

Com a finalidade de avaliar a capacidade do endotélio em modular a resposta constritora à fenilefrina, foram utilizados anéis de aorta com endotélio íntegro e sem endotélio. Nos últimos, o endotélio vascular era removido mecanicamente através do uso de haste metálica, inserida na luz do vaso e friccionada à camada íntima, ocasionando destruição intencional desta. Este procedimento foi realizado previamente a montagem dos anéis na cuba, e a ausência do endotélio foi confirmada pela incapacidade da ACh (10^{-5} M) induzir o relaxamento, após a pré-contracção com fenilefrina (10^{-7} M). A preparação foi lavada e, após 30 minutos de retorno à tensão basal, foram realizadas curvas concentração-resposta à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M) do mesmo modo já descrito na sessão 3.3.2.

3.3.3.3 Papel do óxido nítrico e da prostaciclina na modulação do tônus

Em alguns anéis com endotélio íntegro, um dos fármacos inibidores ou bloqueadores descritos a seguir foi incubado por 30 minutos, previamente à adição do Fe^{2+} . Com a finalidade de estudar a participação do NO nos efeitos vasculares promovidos pelas altas concentrações de Fe^{2+} , os anéis foram incubados com um inibidor não-seletivo NOS, o N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 μ M). Além disso, buscando averiguar o envolvimento dos produtos derivados da via do AA-COX nos efeitos do Fe^{2+} sobre a resposta contrátil à fenilefrina, os anéis foram incubados com indometacina (10 μ M), inibidor não específico da COX. Logo após, foi realizada uma curva concentração-resposta à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M) e comparada sua resposta com aquela de anéis não incubados com tais fármacos.

3.3.3.4 Participação do radical hidroxila e do peróxido de hidrogênio nos efeitos sobre a reatividade vasoconstrictora

Para investigar a participação do H_2O_2 e da OH^\bullet sobre as alterações promovidas pelas altas concentrações de Fe^{2+} na reatividade vasoconstrictora de anéis de aorta de ratos, os segmentos foram incubados com catalase (200 e 800 U/mL), um “varredor” enzimático de H_2O_2 ; ou dimetilsulfóxido (DMSO 0,1 e 1%), um “varredor” de OH^\bullet , simultaneamente a incubação com Fe^{2+} 100 ou 1000 μM .

3.4 Avaliação do estresse oxidativo no tecido vascular

3.4.1 Análise de peroxidação lipídica nos segmentos de aorta

Para tanto, os anéis aórticos incubados com solução nutritora padrão ou adicionada com Fe^{2+} foram congelados a $-80^\circ C$, até o dia da análise das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os TBARS são produtos de peroxidação lipídica que podem ser mensurados por malondialdeído (MDA), usando um método colorimétrico previamente descrito (Ribeiro, Jr. et al., 2013). Os radicais livres reagem com os ácidos graxos poli-insaturados da membrana celular e lipoproteínas, transformando-os em ácidos graxos peroxidados os quais sofrem redução de sua cadeia lateral liberando MDA, de maneira que sua concentração sérica é proporcional à quantidade de ácidos graxos poli-insaturados oxidados e, portanto, um indicador de peroxidação lipídica.

No dia do experimento, os segmentos previamente coletados foram triturados e homogeneizado ao ácido tricloroacético (20%) em 0.6 M HCl (1:1 vol/vol) e mantidos em gelo por 20 minutos para precipitar seus componentes e evitar possíveis interferências. As amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 1500 x g antes de adicionar o TBA (120 mM em Tris 260 mM, pH 7) ao sobrenadante numa proporção de 1:5 (v/v). Após, a mistura foi aquecida a $97^\circ C$ por 15 minutos e a medida foi realizada através da absorbância usando a comprimento de onda de 535 nanômetros, sendo representada por μM de MDA por mg de proteína no tecido analisado.

3.4.2 Análise de oxidação avançada de proteínas nos segmentos de aorta

Em anéis igualmente processados e congelados como descritos no item anterior, as 20 μL de cada amostra homogeneizada foi diluída a 1:10 em PBS. Após agitação, foram adicionados na microplaca juntamente com 10 μL de iodeto

de potássio (1,16 mol/L, KI) e 20 µL de ácido acético glacial. A fim de comparação e construção da curva padrão, foi adicionados a microplaca diferentes concentrações (5, 10, 30, 60, 75 e 100 µM) de solução padrão de cloramina-T (100 µM), 10 µL de KI e 20 µL de ácido acético glacial. Posteriormente, foi realizada agitação durante seis minutos e leitura em um espectrofotômetro (Epoch 2 Microplate Spectrophotometer – BioTek, Winooski, VT, EUA) a 340 nm contra um branco contendo 200 µL de PBS, 10 µL de KI e 20 µL de ácido acético. O conteúdo de produtos de oxidação avançada de proteínas (AOPP) nas amostras foi determinado conforme a curva linear cloramina-T padrão com coeficiente de correlação maior que 0,95. Os resultados obtidos foram expressos em µmol de cloramina T/mg proteína na amostra, anteriormente quantificada conforme o método de Bradford.

3.5 Detecção da produção local de óxido nítrico nos anéis aórticos

Para investigar os efeitos da exposição “in vitro” ao ferro sobre a disponibilidade do NO, anéis de aorta foram incluídos em meio de congelamento rápido (Killik-OCT Easy Path, Erviegas Ltda, SP, Brasil) para análise da fluorescência com 4,5- diaminofluoresceína (DAF-2). Cada anel foi cortado em criostato em secções de 10 µm de espessura e transferidas para lâminas gelatinizadas e mantidas congeladas. Para o ensaio, as lâminas foram colocadas em estufa a 37 °C por uma hora para retirada do meio de inclusão. A seguir as secções de aorta foram incubadas a 37 °C, por 30 minutos com tampão fosfato (0,1 M) e, em seguida, com 8 µM de DAF-2. Foi incubado L-NAME (100 µM), para avaliar a fluorescência sensível à inibição da NOS. As imagens digitais foram coletadas no microscópio de fluorescência Leica DM 2500 com a objetiva de 40× e câmera Leica DFC 310 X, usando a mesma configuração de imagem para controle e grupo com sobrecarga de ferro. Para quantificação, 5 segmentos da aorta por animal foram utilizados para obter a média amostral. A densidade de fluorescência média foi calculada usando o *software Image J*.

3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia por energia dispersiva de raios X (Energy-dispersive X-ray spectroscopy, EDS)

Igualmente, alguns segmentos de aorta expostos ou não ao Fe^{2+} 100 e 1000 μM por 30 minutos foram abertos longitudinalmente e lavados por 10 min com PBS, e fixados com 2,5% v/v glutaraldeído. Os segmentos foram então pós-fixados em 1% v/v tetróxido de ósmio, 3,8% v/v ferricianeto de potássio e 2,5 mmol/L de CaCl_2 , desidratados em acetona e incorporados em Epon 812. Seções ultrafinas foram examinadas sob um microscópio eletrônico Zeiss EM 10C. Para microscopia eletrônica de varredura (Figura 8), os esferóides foram secos usando o método do ponto crítico e revestido com uma camada de ouro de 20 nm e examinado sob um microscópio Zeiss 940 DSM (dos Santos et al. 2012)

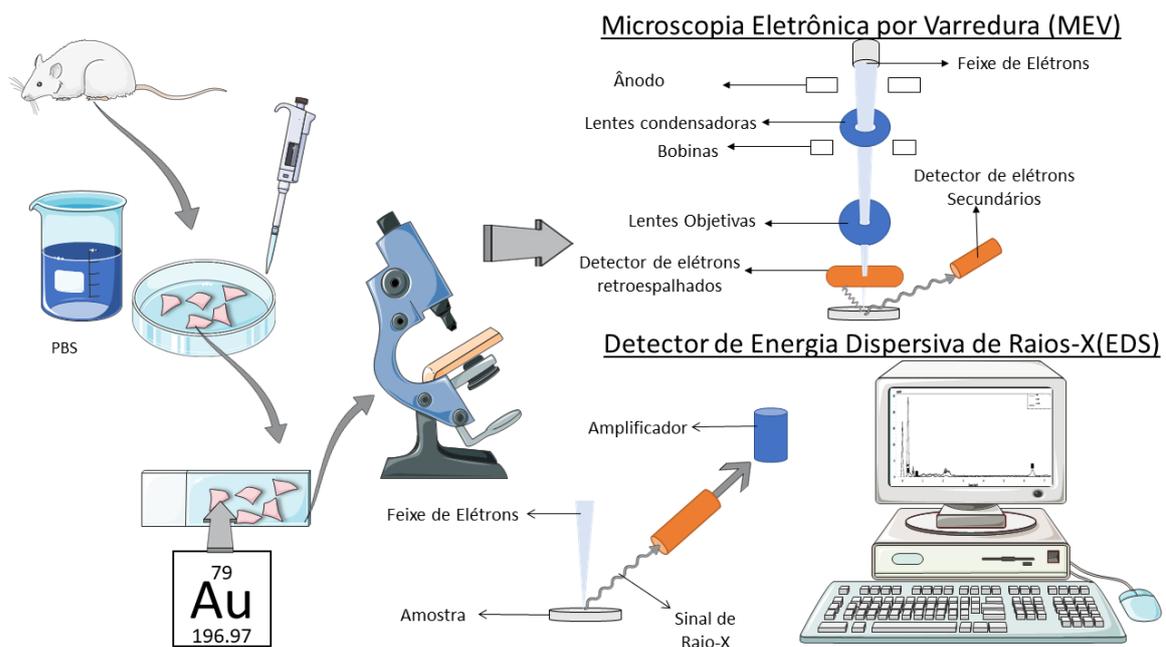


Figura 8- MEV e EDS – Seguintos de aorta foram seccionados e cortados e expostos ou não a Fe^{2+} 100 e 1000 μM por 30 minutos foram emem, e lavados com PBS, e fixados. E então pós-fixados, desidratados em acetona e incorporados em Epon 812. As secções foram examinadas sob um microscópio eletrônico. Para realização de MEV, os esferóides foram secos pelo método do ponto crítico e revestido ouro e examinado sob um microscópio Zeiss 940 DSM. Através de um feixe de elétrons através de lentes eletromagnéticas incidido sobre a amostra os sinais que são apanhados por detectores para gerar o resultado. Através de receptores secundários a micrografia topográfica foi obtida por varredura (MEV) e a obtenção de microanálises elementares através de raios X foi feita por espectroscopia por energia dispersiva (EDS). Fonte: o autor

Através de um feixe de elétrons, gerado por emissão termiônica (filamento de tungstênio) é colimado através de lentes eletromagnéticas presente na coluna

e incidido sobre a amostra gerando os sinais que são apanhados por detectores apropriados para gerar o resultado. Através de receptores secundários a micrografia topográfica foi obtida pela por varredura (MEV) e a obtenção de microanálises elementares através de raios X foi feita por espectroscopia por energia dispersiva (EDS). As análises de MEV foram obtidas para caracterizar a morfologia superficial das artérias; e a análise de EDS sustenta a microanálise semiquantitativa dos elementos químicos presentes na superfície dos segmentos de aorta, com um espectro de alcance do elemento 6 (carbono) ao elemento 92 (urânio.)

3.7 Expressão dos resultados e análise estatística

Todos os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os valores de n significam o número de animais utilizados em cada grupo experimental. As respostas contráteis ao KCl (75mM) foram expressas como tensão desenvolvida pelo anel de aorta, em gramas de contração. As respostas vasoconstritoras induzidas pela fenilefrina foram normalizadas pela contração máxima do KCl do respectivo anel de aorta e expressas em porcentagem desta contração. As respostas vasodilatadoras dependentes e independentes do endotélio foram expressas como porcentagem de relaxamento em relação à contração prévia com fenilefrina. Para algumas situações, a resposta máxima (R_{max}) e a concentração de agonista que produziu metade da R_{max} (EC_{50}) foram calculadas usando análise de regressão não linear (GraphPad Prism 8 Software, San Diego, CA). A sensibilidade dos agonistas foi expressa como $-\log EC_{50}$. Para avaliar a magnitude geral dos efeitos da incubação com os diferentes fármacos ou da retirada do endotélio sobre curva contrátil concentração-resposta à fenilefrina, as áreas sob as curvas (ASC) concentração-resposta à fenilefrina foram calculadas.

Para estatística inferencial, o nível de significância foi estabelecido em 5%. Todos os dados foram previamente submetidos à avaliação da distribuição normal D'Agostino & Pearson, sendo devidamente atestada. A comparação entre dois grupos ou duas condições foi realizada por teste t de Student pareado ou não pareado (dependendo da ocasião), e para comparação entre mais de dois grupos ou condições, foi feita análise de variância uma ou duas vias,

dependendo da ocasião. Quando identificadas diferenças significantes, foi aplicado o teste *post-hoc* de Tukey para localizar essas diferenças.

3.8 Fármacos e reagentes

- 4,5 diaminofluorescein (Sigma)
- Acetilcolina, cloridrato (Sigma)
- Ácido acético glacial (Vetec)
- Ácido aminoacético (Glicina) (Sigma)
- Ácido clorídrico (Sigma)
- Ácido tiobarbitúrico (Merck)
- Ácido tricloro-acético 15% - (Neon)
- Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Merck)
- Bicarbonato de sódio (Vetec)
- Catalase (Sigma)
- Cloramina t (Neon)
- Cloreto de Ca^{2+} dihidratado (Merck)
- Cloreto de potássio (Merck)
- Cloreto de sódio (Merck)
- DAF (Interprise)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma)
- DHE (Sigma) Glicose (Merck)
- HEPES (SIGMA) HEPES (SIGMA)
- Heparina sódica (Cristália)
- Iodeto de potássio (Neon)
- L-Fenilefrina, hidrocloreto (Sigma)
- L-NAME (Sigma)
- Nitroprussiato de sódio dihidratado (Fluka)
- N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Sigma)

- Sulfato ferroso hepta-hidratado (FeSO_4) (Neon)
- Tetramethoxypropane malonaldehyde (Sigma)
- Tris HCl (Sigma)
- Xilazina (Sespo)
- Ketamina (Ceva)

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos agudos da exposição “in vitro” ao Fe^{2+} , em diferentes concentrações, sobre a vasomotricidade em aorta de ratos

Após a randomização dos anéis aos diferentes grupos experimentais, a análise da viabilidade da preparação mostrou que não havia diferenças entre os grupos, sendo a resposta contrátil ao KCl e o relaxamento estimulado pela ACh similares entre os anéis randomizados nos diversos grupos previamente à exposição ao metal ou não.

Entretanto, após a incubação com o FeSO_4 , como demonstrado na figura 9, houve aumento da reatividade vascular à fenilefrina de maneira concentração-dependente, com efeito significativo a partir de $25 \mu\text{M}$ de Fe^{2+} , sendo ainda maior até $1000 \mu\text{M}$ de Fe^{2+} . Na tabela 2, estão demonstrados os valores médios (\pm EPM) de sensibilidade ($-\text{LogEC}_{50}$) e resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) calculados pela regressão não-linear com ajuste sigmoide das curvas concentração-resposta.

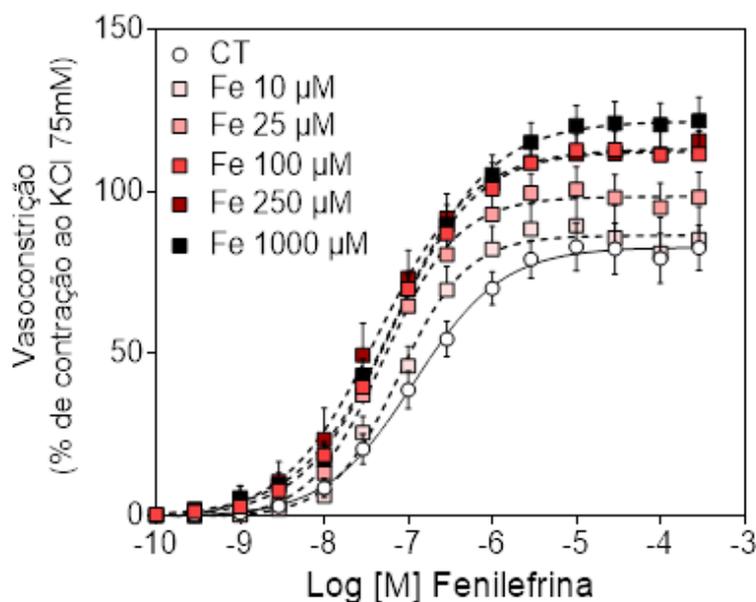


Figura 9- Reatividade vascular à fenilefrina avaliada por curvas concentração-resposta em todos os grupos experimentais: após exposição por 30 minutos ao ferro em diferentes concentrações (Fe 10 a $1000 \mu\text{M}$), ou a solução nutriente padrão (CT). Os dados são expressos em média \pm EPM. Pela ANOVA 2-vias, interação fenilefrina vs. Grupo: $p=0,0049$. Devido ao número de grupos, não foi realizada análise post-hoc ponto-a-ponto.

Tabela 2 –R_{máx} e pD₂ das curvas concentração-resposta

Grupos	-LogEC ₅₀	R _{máx} (%)	N
Ct	6,92±0,10	82,8±2,7	16
Fe 10 µM	7,11±0,11	86,4±3,0	11
Fe 25 µM	7,29±0,08	98,5±2,4*	11
Fe 100 µM	7,22±0,07	112,4±2,4*#	16
Fe 250 µM	7,36±0,10	113,1±3,3*#&	10
Fe 1000 µM	7,15±0,08	121,7±2,7*#&	17

O pD₂ foi calculado por -LogEC₅₀. ANOVA 1-via seguida por teste de Tukey (*p<0,05 vs. Ct, # vs. Fe 10 µM e & vs. Fe 25 µM N = número de animais utilizados).

4.2 Efeitos das altas concentrações de Fe²⁺ sobre a integridade morfofuncional do endotélio e os fatores envolvidos nas alterações de reatividade vascular

4.2.1 A exposição “in vitro” a altas concentrações de Fe²⁺ prejudica a vasodilatação dependente do endotélio

A função vasodilatadora dependente do endotélio foi avaliada através da construção de uma curva concentração-resposta frente a ACh (10⁻¹⁰ a 3×10⁻⁴ M) em anéis previamente contraídos com fenilefrina até cerca de 50 % da contração do KCl (figura 10A). A exposição às concentrações de 100 e 1000 µM de Fe²⁺ no banho de órgãos alterou as respostas vasodilatadoras dos anéis aórticos, com deslocamento das curvas concentração resposta para a direita quando comparados ao grupo controle. Por outro lado, a vasodilatação independente do endotélio, analisada pela capacidade do anel aórtico relaxar em resposta a incubação com o NPS, um doador de oxido nítrico, não foi diferente entre os grupos experimentais (Figura 10B).

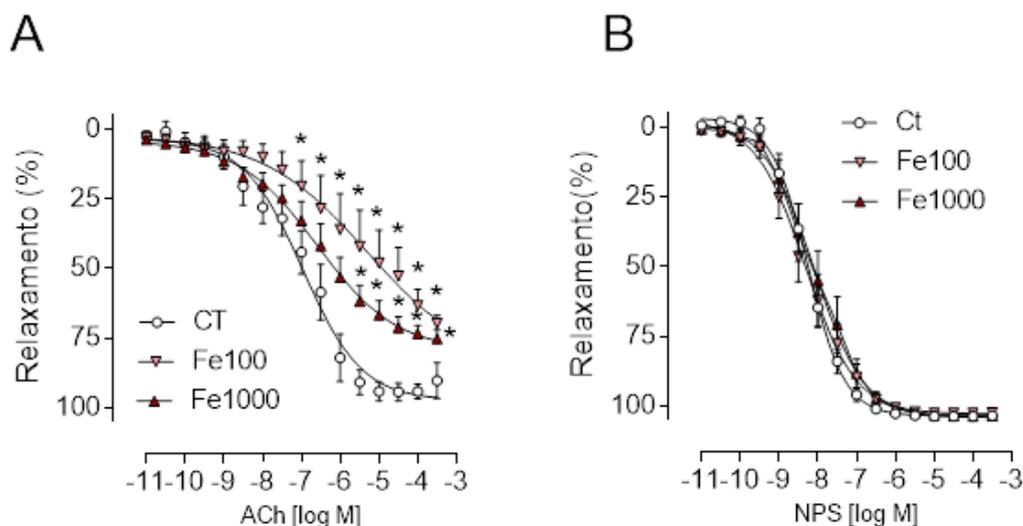


Figura 10 - (A) Relaxamento via endotélio induzido pelo agonista muscarínico acetilcolina (ACh), previamente contraído com fenilefrina. (B) Relaxamento independente do endotélio, através da construção da curva concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio NPS. * $p < 0,05$ vs. Ct pela ANOVA 2-vias seguida de teste de Tukey. Interação acetilcolina vs. grupo: $p = 0,0028$.

Na tabela 3, estão demonstrados os valores médios \pm EPM de sensibilidade ($-\text{LogEC}_{50}$) e resposta máxima ($E_{\text{máx}}$) calculados pela regressão não-linear com ajuste sigmoide das curvas concentração-resposta, evidenciando redução da sensibilidade ($-\text{LogEC}_{50}$) pela exposição ao Fe 100 μM , e da resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) após Fe 100 e 1000 μM na vasodilatação à ACh.

Tabela 3 – $R_{\text{máx}}$ e pD_2 das curvas concentração-resposta com ajuste sigmoide

	Vasodilatação à ACh			Vasodilatação ao NPS		
	$-\text{LogEC}_{50}$	$R_{\text{máx}}$ (%)	N	$-\text{LogEC}_{50}$	$R_{\text{máx}}$ [%]	N
Ct	$6,96 \pm 0,13$	$97,1 \pm 3,0$	(5)	$8,25 \pm 0,05$	$03,5 \pm 1,4$	(16)
Fe 100 μM	$5,30 \pm 1,06^*$	$69,7 \pm 2,3^*$	(6)	$8,31 \pm 0,08$	$02,8 \pm 1,9$	(14)
Fe 1000 μM	$6,60 \pm 0,19$	$75,1 \pm 2,9^*$	(7)	$8,08 \pm 0,09$	$04,1 \pm 2,2$	(9)

O pD_2 foi calculado por $-\text{LogEC}_{50}$. ANOVA 1-va seguida por teste de Tukey (* $p < 0,05$ vs. Ct e # vs. Fe 100 μM) N = número de animais utilizados.

4.2.2A exposição “in vitro” a altas concentrações de Fe^{2+} reduz a modulação endotelial sobre a reatividade vasomotora

Para avaliar a participação da modulação endotelial sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina, foi realizado o mesmo protocolo de exposição ao Fe^{2+} 100 e 1000 μM , porém em anéis em que o endotélio foi intencionalmente removido. Como demonstrado na figura 11, a retirada do endotélio amentou a resposta constritora à fenilefrina em todos os grupos. Porém, este efeito parece ser menor nos anéis incubados com altas concentrações de Fe^{2+} .

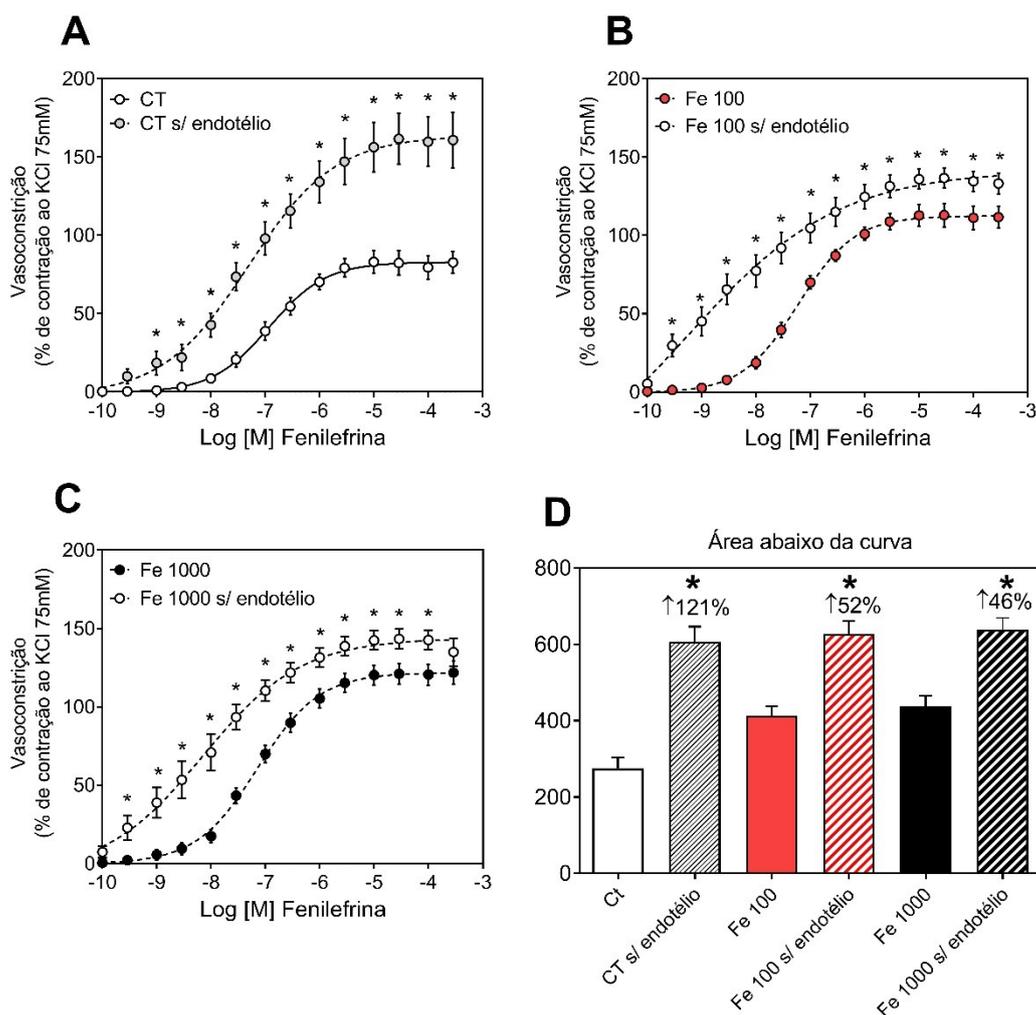


Figura 11- Efeitos da remoção mecânica do endotélio sobre a reatividade vascular à fenilefrina após incubação com Fe^{2+} a 100 e 1000 μM comparados aos anéis CT (sem ferro). Na figura 11A, anéis sem ferro, na figura 11B anéis incubados com ferro 100 μM e na figura 11C, anéis incubados com ferro 1000 μM . * $P < 0,05$ vs. o seu respectivo grupo com endotélio íntegro, pela ANOVA 2-vias seguida de teste de Tukey. Foram utilizados de 7-10 anéis sem endotélio por grupo. Figura 11D, o cálculo das áreas sob as curvas de contração em todos os grupos experimentais.

Devido às perdas de anéis nas composições dos diferentes grupos e incubações, não foi possível obter amostras totalmente pareadas (anel do mesmo animal submetido às diferentes condições) para construção de análise

estatística das diferenças entre as ASC. Dessa forma, apenas uma avaliação da diferença entre as médias foi feita. Como pode-se observar pela comparação entre as médias das ASC dos diferentes grupos (FIGURA 11D), enquanto a remoção do endotélio potencializa a resposta constritora em 121% nos anéis do grupo CT, naqueles incubados com 100 e 1000 μM de Fe^{2+} a remoção do endotélio potencializou a vasoconstricção em apenas 52% e 46%, respectivamente.

4.2.3 Efeitos da sobrecarga “in vitro” de ferro sobre a morfologia da superfície endotelial em aorta

Com o intuito de avaliar a morfologia da superfície endotelial das artérias submetidas a sobrecarga de ferro in vitro, amostras das artérias foram expostas por 30 minutos nos seguintes grupos: Controle, Fe100 e Fe1000 μM e analisadas através de MEV, com um aumento de 3000 \times como descrito anteriormente. As artérias do grupo controle demonstraram topografia de superfície de aspecto escamoso normal com aparência regular das células endoteliais, tal como demonstrado da figura 12A e apontados através das setas amarelas. No grupo Fe100 pode-se verificar alteração no endotélio com presença de células sanguíneas (marcado com estrela amarela), superfície irregular com presença de fibrina e ferro e aspecto levemente contraído (figura 12 B). No grupo Fe1000, as características encontradas no grupo anterior se confirmam e intensificam com presença e acúmulo de células sanguíneas, fibrina e ferro (indicado pelas cerquilhas amarelas) e aumentado aspecto contraído (figura 12C). Em ambos grupos podemos observar a formação do epitélio com aspecto escamoso anormal inferindo desnudamento superficial do endotélio (marcado com asteriscos).

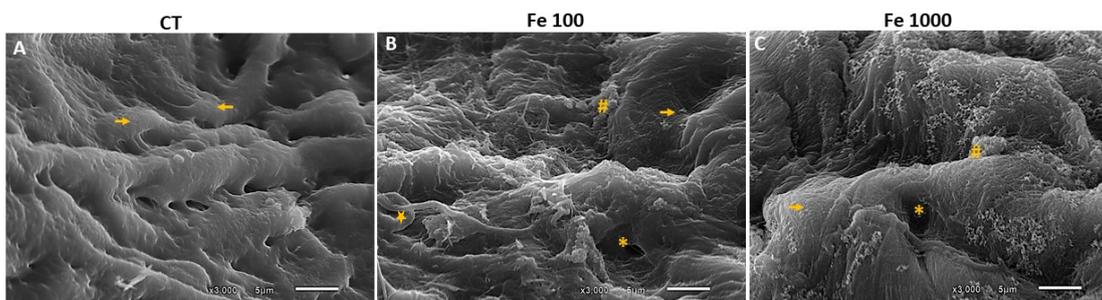


Figura 12 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de aortas expostas a solução padrão ou acrescida de Fe 100 ou 1000 μM por 30 minutos. Símbolos: Pontas de setas = superfície das células endoteliais normais; Asterisco = endotélio de aspecto escamoso anormal, sugerindo desnudamento modesto; Estrela = presença de células sanguíneas aderidas; Cerquilhas = Acúmulo de fibrina/ferro e aspecto contraído do endotélio.

A partir da análise do EDS os elementos contidos na amostra puderam ser identificados, permitindo a observação do carbono ao uranio com limite de massa de 0,05% e um mapeamento químico de até sete elementos. Na microanálise qualitativa (espectro) (figura 13), observa-se pouca ou nenhuma presença de Fe no grupo controle, mas detecção considerável (proporcional ao grau de exposição) nos grupos Fe100 e Fe1000. Ademais, nota-se presença de alguns elementos como ouro (Au), oxigênio (O), e carbono (C).

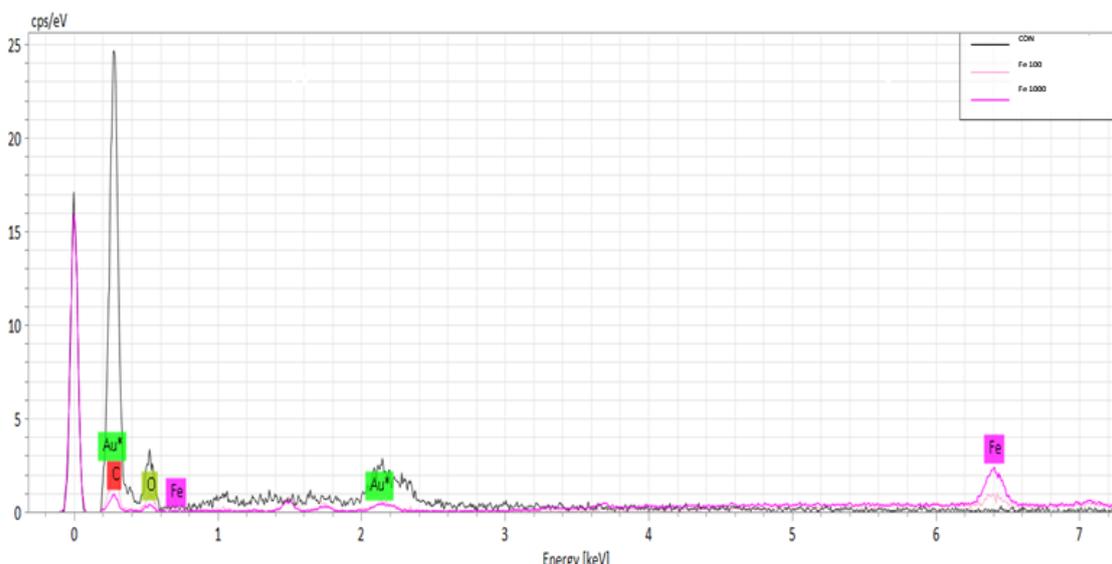


Figura 13 - Espectro dos elementos presentes na amostra

Ainda observando a microanálise semiquantitativa em EDS, a tabela 4 apresenta uma quantidade relativa da presença de ferro na superfície endotelial, não sendo quantificável no grupo controle, e aumentando de 0,86% no grupo Fe 100 para 4,85% no grupo Fe 1000. Além de aumento do cálcio (0,75% dos elementos na superfície) no grupo Fe1000.

Tabela 4 - Tabela de porcentagem de elementos

Elem.	N° AT.	Controle			Fe100			Fe1000		
		M. norm. [%]	Abs. Erro [%] 1 (sigma)	Rel. Erro [%] 1 (sigma)	M. norm. [%]	Abs. Erro [%] 1 (sigma)	Rel. Erro [%] 1 (sigma)	M. norm. [%]	Abs. Erro [%] 1 (sigma)	Rel. Erro [%] 1 (sigma)
Carbono	6	83.29	13.66	16.41	67.43	16.36	24.27	61.94	5.70	23.23
Oxigênio	8	16.71	4.95	29.63	29.48	9.66	32.77	23.09	2.73	29.81
Alumínio	13	ND	ND	ND	1.77	0.18	10.22	6.53	0.21	8.24
Ferro	26	ND	ND	ND	0.86	0.08	9.81	4.85	0.09	4.54
silício	14	ND	ND	ND	0.46	0.08	17.70	2.84	0.12	10.64
Calcio	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.75	0.05	17.12

4.2.4A exposição “in vitro” a altas concentrações de Fe²⁺ altera o papel do NO e de produtos da COX nos anéis aórticos

Na figura 14A, pode-se observar que a incubação com L-NAME, um inibidor da NOS, aumenta a reatividade à fenilefrina em todos os grupos estudados. No entanto, esse aumento ocorre em menor magnitude nos grupos que foram co-incubados com Fe²⁺, sugerindo uma redução do papel modulador do NO sobre a vasomotricidade. Na figura 14D é demonstrado o efeito promovido pela inibição da síntese de NO através da área sob as curvas com ou sem tal incubação com L-NAME. Nota-se que o aumento na resposta à fenilefrina (avaliada pela ASC) foi de 125% em média, no grupo CT, enquanto nos anéis incubados com Fe²⁺ 100 e 1000 μM esta resposta é diminuída: aumentos de 62% e 41% em relação às médias das ASC desses grupos sem a incubação com L-NAME

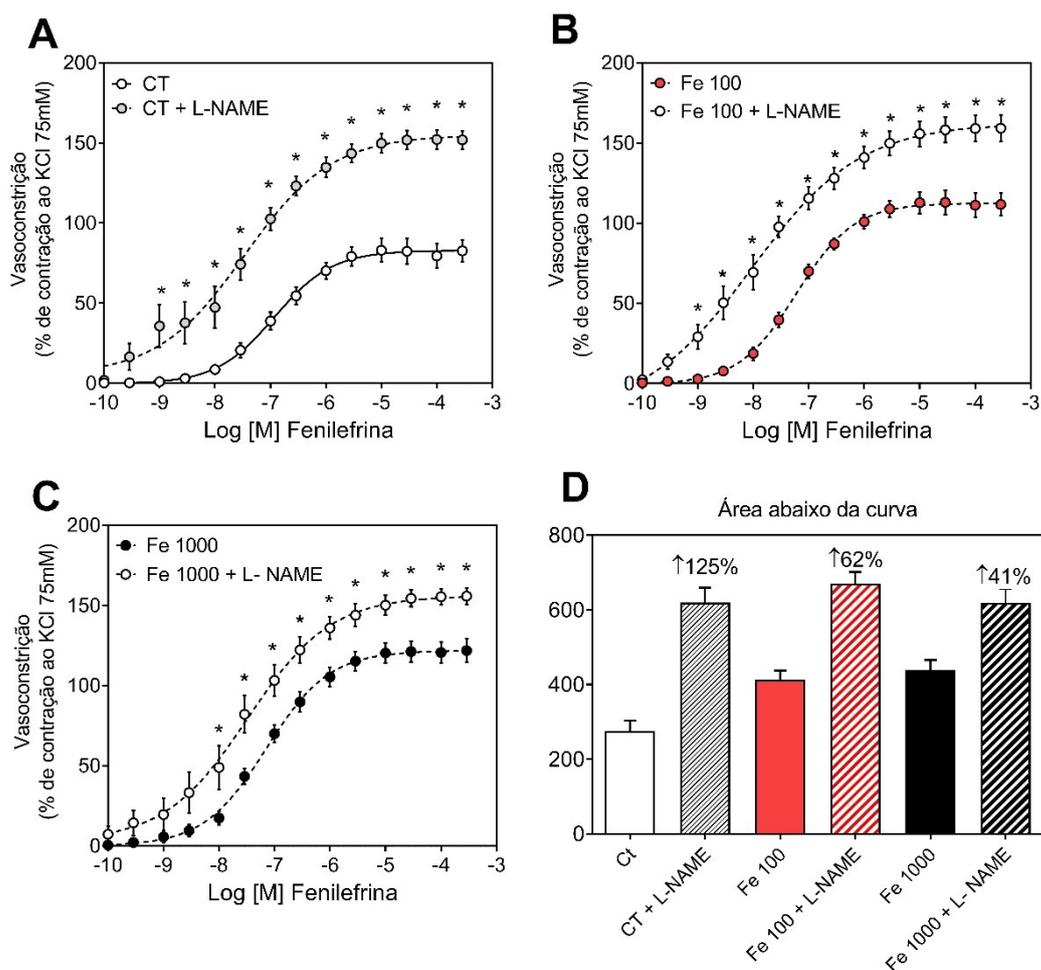


Figura 14 - Efeitos da inibição da NOS pela incubação com L-NAME 100 μM sobre a reatividade vascular à fenilefrina em anéis com Fe²⁺ a 100 e 1000 μM comparados aos anéis CT (sem ferro). *p<0,05 vs. o seu respectivo grupo sem incubação com L-NAME, pela ANOVA 2-vias seguida de teste de Tukey. Foram utilizados anéis incubados com L-NAME de 10-13 ratos por grupo. No gráfico D, o cálculo das áreas sob as curvas de contração em todos os grupos e condições experimentais.

Para avaliar a influência da via metabólica do ácido araquidônico pela enzima COX na modulação da vasomotricidade do vaso, foi utilizado um inibidor não específico desta enzima, a indometacina. Na figura 15A evidencia-se que a incubação com indometacina nos segmentos de aorta Ct reduziu a contração, o que não ocorreu quando a indometacina foi incubada nos anéis Fe 100 μ M (figura 15B). Na figura 15C parece se repetir o que pode ser observado na situação Ct. Observa-se que essa diminuição é de 36% no grupo Ct+Indometacina, sem efeito significativo no Fe 100diminuição de 38% pela incubação com indometacina no grupo Fe1000, quando analisadas as médias das áreas abaixo da curva (figura 15D).

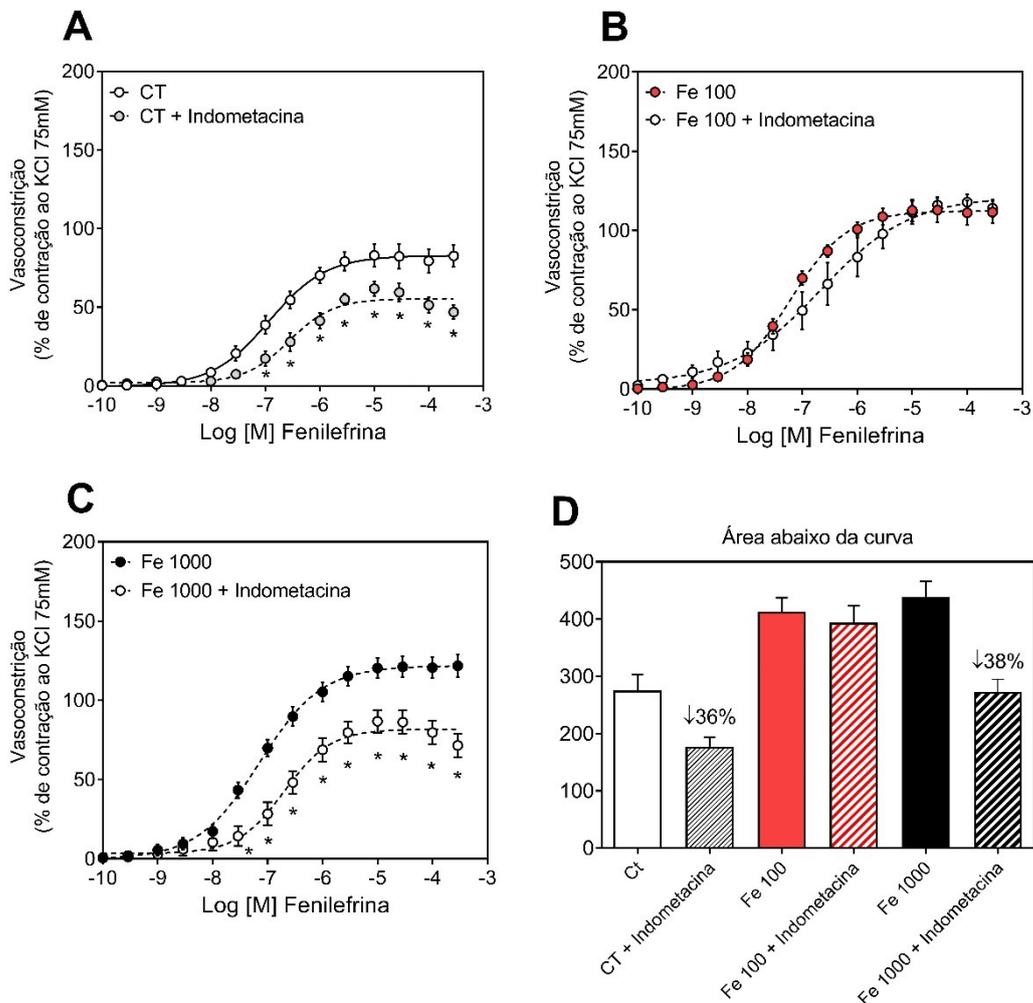


Figura 15 - Efeitos da inibição da COX pela incubação com indometacina 5 μ M sobre a reatividade vascular à fenilefrina em anéis com Fe²⁺ 100 e 1000 μ M comparados aos anéis CT (sem ferro). *p<0,05 vs. o seu respectivo grupo sem incubação com indometacina, pela ANOVA 2-vias seguida de teste de Tukey. Foram utilizados anéis incubados com indometacina de 8-10 ratos por grupo. No gráfico D, o cálculo das áreas sob as curvas de contração em todos os grupos e condições experimentais.

4.2.5 A exposição “in vitro” ao Fe²⁺ reduz a biodisponibilidade de NO na aorta

Como demonstrado na figura 16, nos anéis de aorta expostos ao Fe foi observada menor intensidade de fluorescência emitida pela técnica de DAF-2. Pode-se notar, que a co-incubação com L-NAME reduziu a fluorescência emitida pelos anéis do grupo Ct, mas não teve efeito sobre os anéis dos grupos Fe²⁺.

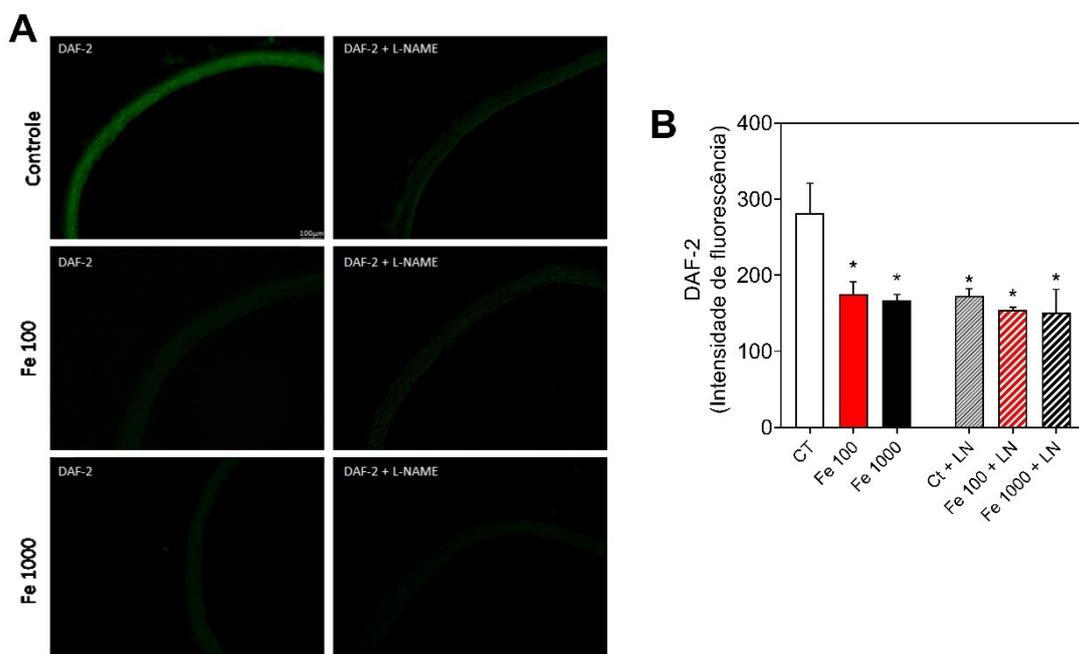


Figura 16 – Detecção “in situ” de NO em segmentos de aorta torácica de ratos. (A) Microfotografias de secções de aorta na presença da sonda fluorescente (NO sensível) 4,5-diaminofluoreceim (DAF-2) a esquerda, e na presença de DAF + L-NAME, a direita. (B) Análise semiquantitativa da fluorescência emitida pelo DAF-2 nas secções aórticas. Os dados são expressos como média ± EPM. *p<0,05 vs. o seu respectivo grupo sem incubação com L-NAME, pela ANOVA 2-vias seguida de teste de Tukey. LN = L-NAME

4.3 A ação das EROs sobre a hiper-reatividade induzida pela exposição “in vitro” ao Fe²⁺

4.3.1 Papel do H₂O₂ no efeito vascular da exposição a altas concentrações de Fe²⁺

Para avaliar a ação do H₂O₂ na hiper-reatividade induzida pelo Fe, foram usadas duas concentrações de catalase 200 U/mL e 800U/mL, capaz de decompor o H₂O₂, nos grupos Ct, Fe100 e Fe1000. Como observado na figura 17A, a catalase reduziu apenas discretamente a contração à fenilefrina no grupo Ct, particularmente na concentração de 800 U/mL, deslocando as curvas para a direita. No entanto, em ambas as concentrações, a catalase foi capaz de reduzir

significativamente a resposta contrátil no grupo Fe 100 (Figura 17B) e Fe 1000 (Figura 17C). A comparação entre as curvas dos anéis CT e Fe 100 e Fe 1000 expostos à catalase (dados não mostrados) evidenciou diferença estatística, especialmente na resposta máxima, indicando que a redução da hiperatividade à fenilefrina pela catalase não foi completa.

A figura 17D ilustra os efeitos promovidos pela decomposição do H₂O₂ nas médias das ASCs de contração à fenilefrina. Enquanto não foram identificadas diferenças significantes entre o grupo CT sem ou com as incubações com catalase, as curvas de contração dos anéis Fe 100 e Fe 1000 incubados com catalase tiveram médias das ASCs significativamente reduzidas ($P < 0,05$), entre 29 e 34% menores que seus respectivos anéis sem incubação com catalase

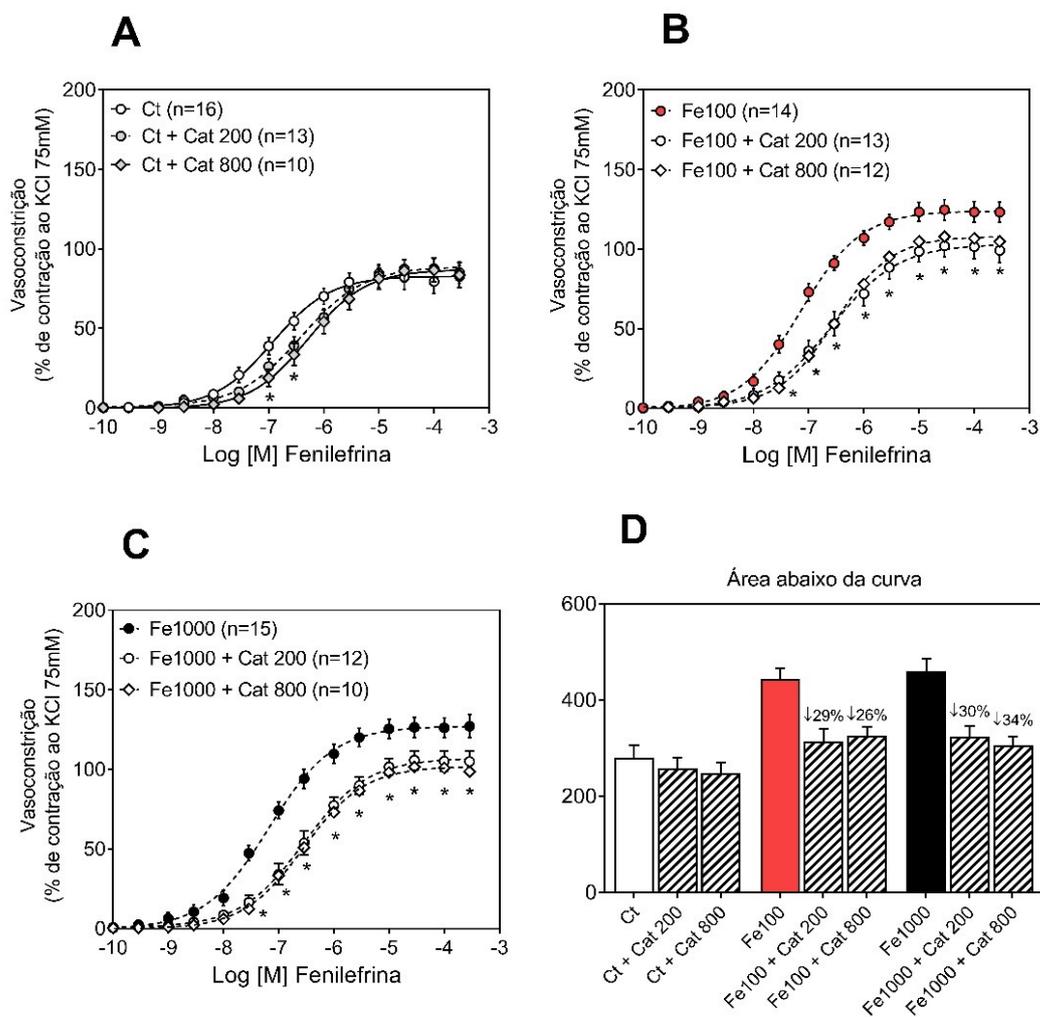


Figura 17 –Efeitos da incubação com catalase (Cat 200 e 800 U/mL) sobre a reatividade vascular à fenilefrina em anéis com Fe²⁺ 100 e 1000 µM comparados aos anéis CT (sem ferro). * $p < 0,05$ vs. o seu respectivo grupo sem incubação com catalase, pela ANOVA 2-vias seguida de teste de Tukey. Foram utilizados anéis incubados com catalase de 10-13 ratos por grupo. No gráfico D, o cálculo das áreas abaixo das curvas de contração em todos os grupos e condições experimentais.

4.3.2 Papel da OH[•] na hiper-reatividade induzida pela exposição a altas concentrações de Fe²⁺

Como demonstrado na figura 18A, a incubação com DMSO, um “varredor” de OH[•], na concentração de 0,1% não promoveu diferença significativa na resposta vasoconstrictora dos anéis Ct, embora quando incubado com DMSO 1% a resposta dos anéis Ct foi reduzida. Já nos anéis incubados com Fe 100 (Figura 18B), ambas as concentrações utilizadas de DMSO foram capazes de reduzir significativamente a hiper-reatividade vascular à fenilefrina (embora o DMSO 1% tenha sido mais potente nesse efeito redutor). Finalmente, nos anéis Fe 1000 (Figura 18C), DMSO 0,1 e 1% tiveram efeitos semelhante na redução da resposta contrátil. A comparação entre as curvas dos anéis CT vs. Fe 100 + DMSO 1% e vs. Fe 1000 + DMSO 0,1 ou 1% (dados não mostrados) não evidenciou diferença estatística, indicando que a redução da hiper-reatividade à fenilefrina nessas condições foi completa.

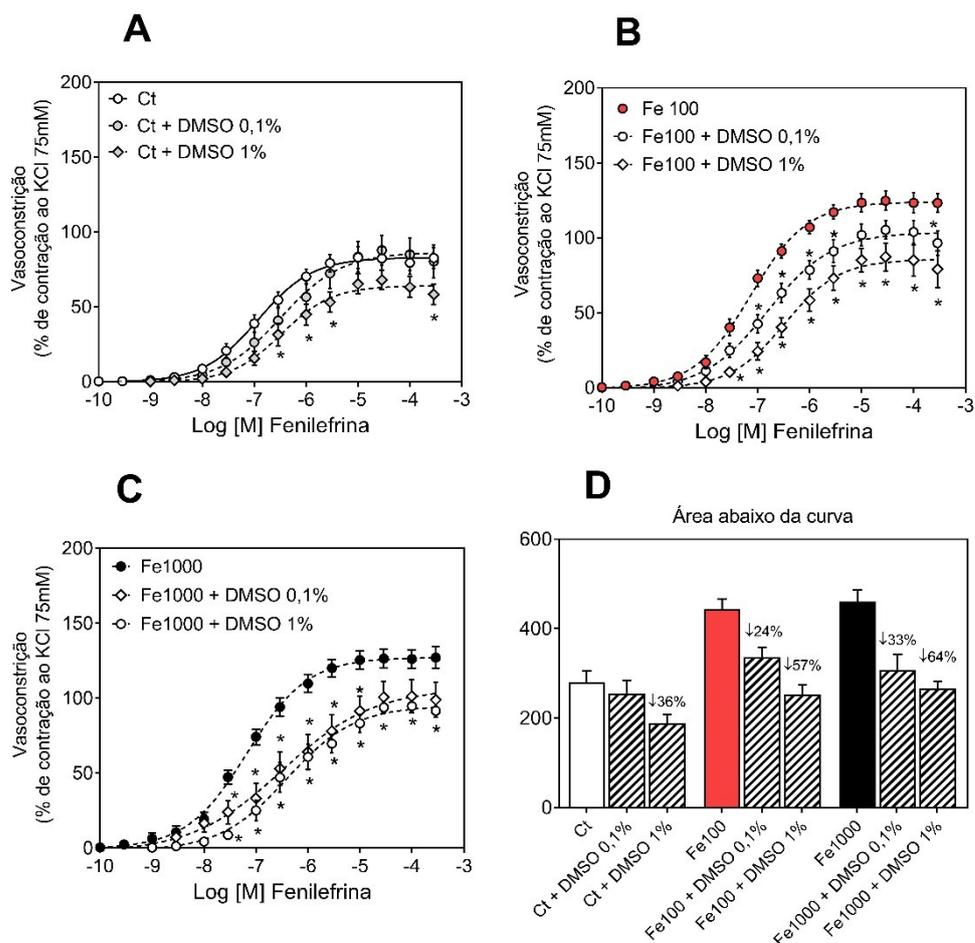


Figura 18 – Efeitos da incubação com DMSO (0,1% e 1%) sobre a reatividade vascular à fenilefrina em anéis com Fe²⁺ 100 e 1000 μM comparados aos anéis CT (sem ferro). *p<0,05 vs. o seu respectivo grupo sem incubação com DMSO, pela ANOVA 2-vias seguida de teste de Tukey. Foram utilizados anéis incubados com DMSO de 6-10 ratos por grupo. No gráfico D, o cálculo das áreas sob as curvas de contração em todos os grupos e condições experimentais.

A figura 18D ilustra os efeitos promovidos pela “varredura” da $\text{OH}\cdot$ nas médias das ASC de contração à fenilefrina. Embora o DMSO 0,1% não tenha mudado a contração dos anéis Ct, quando incubados com DMSO 1% a média das ASC foi reduzida em 36%. Por outro lado, tanto a 0,1% quanto a 1%, a incubação com DMSO reduziu significativamente as ASC ($P < 0,05$), apresentando médias 24% e 57% menores que a ASC sem DMSO, respectivamente. De maneira similar, as ASC dos anéis Fe 1000 incubados com DMSO 0,1% e 1% também foram menores estatisticamente ($P < 0,05$) que aquela dos seus respectivos anéis Fe 1000 sem incubação com o “varredor” de $\text{OH}\cdot$, sendo reduzidas em 33% e 64% respectivamente menores.

4.4 Efeitos da a exposição a altas concentrações de Fe^{2+} sobre a peroxidação lipídica e oxidação de proteínas em aorta de ratos

Pela análise do TBARS, que avalia a quantidade de substancias sensíveis ao ácido tiobarbitúrico (em sua maioria malondialdeído) gerados pela oxidação de lípideos de membrana, não foram obtidas diferenças significativas entre os grupos experimentais (Figura 19). Como observado na mesma figura, também não houve diferença na quantidade de produtos de oxidação avançada de proteínas entre o grupo controle e os demais expostos ao Fe^{2+} .

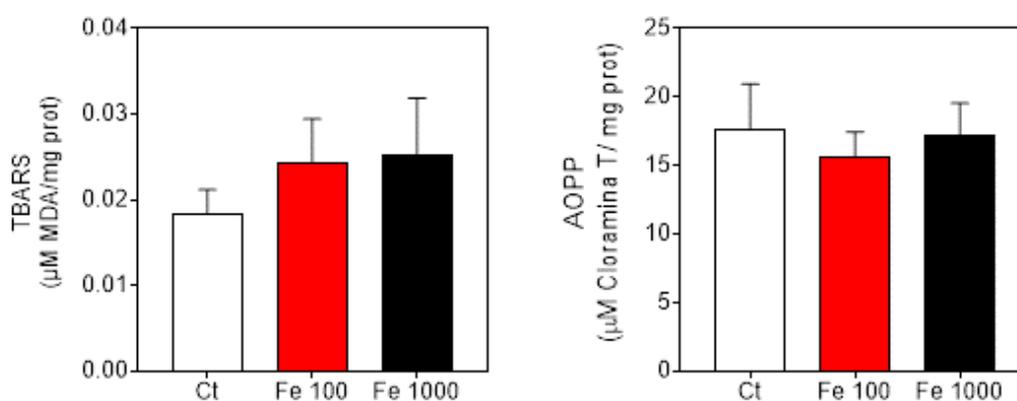


Figura 19 - Medida de substancias reagentes ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e de produtos de oxidação avançada de proteínas (AOPP) no tecido vascular de anéis sem ferro ou incubados com ferro 100 e 1000 μM pelo mesmo tempo dos protocolos de reatividade vascular descritos. Foram utilizados 6 animais por grupo (1 anel vascular por animal). Resultados expressos como média \pm EPM. Não foram encontradas diferenças estatísticas, pela ANOVA de uma via seguida.

5 DISCUSSÃO

Dada a importante ação do endotélio na modulação vascular, e as evidências prévias de que a sobrecarga crônica de ferro cursa com estresse oxidativo sistêmico, remodelamento vascular e disfunção endotelial (Day et al., 2003; Fidelis et al., 2020; Marques et al., 2019b; Rossi et al., 2020a), é compreensível que haja uma efeitos também diretos e agudos do ferro sobre a vasculatura. Nesse sentido, nosso estudo é o primeiro a demonstrar um efeito direto da presença de Fe lábil em excesso sobre a morfologia e função arterial.

Com base nos dados obtidos, foi possível identificar um aumento na resposta constritora de segmentos de aorta incubados "in vitro" a altas concentrações de Fe^{2+} em apenas 30 minutos de exposição. Essa resposta apresentou uma certa relação de dependência com a concentração utilizada. Esse dado sugere que, mesmo agudamente, pode provocar alterações vasomotoras semelhantes às observadas em nossos estudos anteriores. Nesse estudo prévio, identificou-se uma relação entre a administração crônica de Fe-dextrano em roedores e danos estruturais e funcionais no endotélio, indicando prejuízos na modulação endotelial e um papel das EROs na alteração da ação/biodisponibilidade do NO (Marques et al., 2019). Ao mesmo tempo, o Fe em maior concentração (1000 μM) pareceu estimular a produção de prostanóides vasoconstrictores dependentes da via da ciclooxigenase, visto que a indometacina reduziu a vasorreatividade à fenilefrina. Se compararmos ambos efeitos modulatório da vasomotricidade, pode-se observar que a sobrecarga de Fe in vitro, aumentou a resposta em favor da vasoconstrição dos prostanóides, diante da diminuição do efeito anticontrátil do NO, dependente da concentração. Em um estudo crônico, a resposta vasoconstrictora foi alterada em artéria pulmonar de resistência, sugerindo um aumento da resposta vasoconstritora frente ao agonista do TP U46619, sem alteração das resposta vasodilatadoras independente do endotélio (Bertoli et al., 2018). De acordo com os estudos de Zou et al. (2007), a formação de superóxido resulta na eliminação dos efeitos do NO e PGI₂, resultando em uma ação maior dos vasoconstritores PGH₂ e TXA₂.

Pôde ser observado que a presença de Fe^{2+} incubado "in vitro" gerou aumento na resposta contrátil à fenilefrina, numa relação concentração-dependente. A Hiperatividade observada já a partir de 25 μM , e exacerbada em

100, 250 e 1000 μM de Fe^{2+} , pode ser resultado de um prejuízo na modulação endotelial da resposta contrátil, exacerbação dos processos de vasoconstrição, ou ambos. Pelos protocolos utilizados, esta alteração, evocada “in vitro” pelo ferro já aos 30 minutos de incubação, parece ser dependente de perda na função endotelial visto que quando testado o relaxamento mediado por ACh, que agindo sobre o endotélio é um conhecido vasodilatador, as amostras expostas ao Fe^{2+} tiveram um relaxamento diminuído comparado ao grupo controle. Por outro lado, através do uso de NPS (um doador de NO para o músculo liso vascular), todas os segmentos aórticos relaxaram de igual magnitude, reforçando que a alteração vascular parece ser, de fato, resultado da modulação prejudicada do endotélio e não do músculo liso. Isso nos traçou uma rota, em particular, para investigação dos mecanismos que foram influenciados. Vale mencionar que concentrações acima de 100 μM , equivalente a aproximadamente 400 $\mu\text{g/dL}$, são aquelas identificadas nos modelos de sobrecarga crônica normalmente descritos na literatura, os quais identificaram danos vasculares e cardíacos. (Marques et al 2015; Avila et al. 2021).

Considerando a grande importância que o endotélio exerce no equilíbrio dessas forças para a modulação do tônus, foi avaliado o efeito da sua remoção mecânica sobre a reatividade vascular dos anéis que seriam posteriormente expostos ao Fe^{2+} , e foi possível notar que o efeito promovido pela retirada do endotélio foi menor nos anéis expostos ao Fe 100 e 1000. Tal como ilustrado nas médias das ASCs de contração à fenilefrina, enquanto a remoção do endotélio potencializou a resposta vasoconstritora em mais de 2,5 \times nos anéis do grupo CT, esse aumento foi de apenas 50% aproximadamente nos grupos Fe. Nesse sentido, o papel modulatório pareceu ser menor nos anéis incubados com altas concentrações de Fe^{2+} , equivalente aos efeitos vasculares identificados nas sobrecargas crônicas em ratos, caracterizada por resposta hipercontrátil devido ao comprometimento endotelial na aorta (Marques et al., 2015; Marques et al., 2019), artéria mesentérica de resistência (Ribeiro Júnior et al., 2017) e artéria pulmonar de resistência (Bertoli et al., 2018).

Na avaliação morfológica da superfície endotelial das artérias submetidas a sobrecarga de ferro “in vitro”, por trinta minutos de exposição para os grupos controle, Fe100 e Fe1000 μM com aumento de 3000 \times , somente os grupos que foram submetidos às incubações com o metal demonstraram alterações. O

grupo controle exibiu em sua topografia, um aspecto morfológico habitual, escamoso, com aparência regular da célula e núcleo epitelial. Entretanto, as amostras Fe100 μM tiveram apresentações atípicas da morfologia com o endotélio exibindo células sanguíneas, superfícies irregulares e apresentação de fibrina e ferro. No grupo Fe1000 as características encontradas nas amostras de Fe100 se confirmaram, porém apresentaram maior ênfase em suas características com presença de células sanguíneas e fibrinas além da deposição de ferro. Outra característica observada em ambas amostras é uma ligeira contração dependente da concentração, e um aspecto escamoso anormal apresentado, o que pode indicar o desnudamento superficial da camada endotelial. De fato, em estudos do nosso grupo, foi observado alterações na morfologia da superfície endotelial através de microscopia eletrônica de varredura em aortas de camundongos com sobrecarga crônica de ferro (Marques et al., 2019) O endotélio dos vasos foi danificado e sua função de regular o fluxo de sangue e manter a coesão dos vasos pode ter sido afetada (Marques; 2015). Esse dano pode estar relacionado a complicações como o aumento da formação de coágulos sanguíneos (Day et al., 2003).

A presença de fibrina pode estar associada ao excesso de ferro livre, formando material insolúvel da parede arterial dando origem a reações inflamatórias (Lipinski; Pretorius, 2013). A presença de fibrina, ferro e eritrócitos extravasados em placas ateroscleróticas em coronárias já haviam sido estudadas em 1983, sendo relacionadas a formação de trombo coronário intraluminal em um estudo que avaliou segmentos de artérias coronárias epicárdicas (Virmani; Roberts, 1983).

A microanálise qualitativa realizada por meio de espectroscopia revela variações notáveis na quantidade de ferro presente em cada um dos grupos estudados. Enquanto o grupo controle apresenta uma presença mínima ou nula de ferro, o grupo Fe100 apresenta um aumento considerável e o grupo Fe1000 apresenta uma elevação ainda maior.

Ademais, é possível detectar a presença de elementos tais como o ouro (Au), oxigênio (O) e carbono (C). Dois aspectos importantes observados podem ter relação: 1- Quando observados por MEV a topografia das células endoteliais apresentou ligeira contração dependente da concentração, 2- em EDS pode-se observar um acúmulo de ferro (CT, nulo; Fe100, 0.86% e Fe1000 4.85%) e

Cálcio (0.75%, somente em Fe1000) o que pode inferir que a ação contrátil aumentada observada nas amostras tem relação com o acúmulo de cálcio encontrada. À semelhança do que se nota no conteúdo de ferro em diferentes sítios do organismo, também foram observados depósitos de ferro na parede vascular dos ratos submetidos a sobrecarga crônica de ferro, conforme relatado anteriormente (Day et al., 2003) e inclusive em outros modelos experimentais utilizados (Fidelis et al., 2020; Marques et al., 2019a; Marques, 2015; Ribeiro Júnior et al., 2017). Assim, como o excesso de Fe lábil aumenta a geração de EROs, que por sua vez desencadeia mecanismos moleculares que podem levar a danos vasculares, tem sido patente que estudos experimentais e clínicos demonstrem uma associação essa sobrecarga de ferro, estresse oxidativo, remodelamento e disfunção vascular (Cusmà Piccione et al., 2013; Fidelis et al., 2020; Gaenzer et al., 2002; Kukongviriyapan et al., 2008; Marques et al., 2015; Ribeiro Júnior et al., 2017).

Diante dos fatores que colaboram para o efeito anti-contrátil que são liberados pelo endotélio, o NO é o mais importante, especialmente em vasos de condutância como a aorta (Moncada; Higgs, 2006; Vanhoutte et al., 2017b). De fato, observamos, no presente estudo, que com a incubação de L-NAME, um inibidor da NOS, houve um aumento da reatividade frente à fenilefrina no grupo Ct semelhante à retirada do endotélio. Igualmente, houve certa potencialização da reatividade vascular em todos os grupos estudados. No entanto, esse aumento ocorreu em menor magnitude nos grupos que foram co-incubados com Fe^{2+} (Fe100 e Fe1000 μM), indicando redução do papel modulador do NO sobre a vasomotricidade, quando na presença de altas concentrações do metal. Foi observada uma diminuição notável no relaxamento vascular dependente do endotélio em ratos com excesso de ferro, indicando uma redução na biodisponibilidade de NO e em conformidade com a correlação entre aumento do estresse oxidativo e comprometimento da função endotelial semelhante ao encontrado originalmente por Day et al (Day et al., 2003). Desta maneira a elevação de EROs perturba de maneira importante a homeostase vascular fomentando a agregação plaquetária diapedese de células inflamatórias e vaso constricção concordando com a disfunção endotelial (Russo; Leopold; Loscalzo, 2002). Igualmente, em pacientes com HH o estudo de Gaenzer e colaboradores (

2002) apresenta uma correlação positiva com a presença da sobrecarga de ferro e indicadores de EROs.

Durante a avaliação da influência da via da ciclooxigenase (COX) na modulação da vasomotricidade, a utilização de um inibidor não específico proporcionou a observação de um pequeno efeito vasocontrátil de prostanóides nos anéis CT. Nestes anéis, a incubação com indometacina diminuiu a contratilidade, demonstrando uma relativa ação contrátil através da via da COX, que parece contribuir para parte da resposta à fenilefrina. Essa diminuição, comparando-se as médias das ASCs se aproxima aos 36%. Isso difere um pouco do normalmente reportado na literatura, inclusive do nosso próprio laboratório, em que na situação controle, ou em anéis provenientes de animais saudáveis, não há efeito significativo da incubação com indometacina, o que poderia inferir certa igualdade entre os fatores dilatadores e constritores da COX nessas situações. Embora não tenhamos uma explicação definitiva sobre isso, poderíamos especular ser decorrência de mudanças ou estados fisiológicos ou fisiopatológicos dos próprios animais utilizados nessa época.

No grupo Fe100, a incubação com indometacina não modificou a resposta vasoconstrictora, mantendo-se a hiper-reatividade encontrada após exposição ao Fe nessa concentração, o que indica que a via da COX parece não haver influência, ao menos de forma significativa, ou pelo menos que nessa condição se tenha estimulado seus produtos vasoativos em igual proporção de dilatadores e constritores. Entretanto isso não se torna verdadeiro no grupo de anéis expostos à concentração mais elevada. Na situação controle e Fe1000 μM , quando utilizada indometacina, foi observada redução significativa da reatividade, alcançando níveis dos anéis Ct. Estudos indicam que COX1 é responsável principalmente pela produção basal de PGI_2 , já que a inibição da COX1 reduz significativamente o produto total de PGI_2 no rim e na aorta de camundongos (Qi et al., 2006). Além disso, TXA_2 e PGI_2 na aorta derivam principalmente de COX2 (Belton et al., 2000; Heymes et al., 2000). Dessa forma, embora não há como afirmar qual isoforma da enzima é responsável, podemos especular que com a concentração de 100 μM há uma redução do NO sem alteração na modulação dos prostanóides na reatividade, enquanto na concentração de 1000 μM há uma redução da modulação através de NO que se soma a um aumento dos prostanóides constritores.

A disfunção endotelial é uma descaracterização da atividade endotelial, sobre a regularidade do controle do fluxo, através da alteração do raio do vaso. A manutenção da saúde cardiovascular é crucial para a qualidade de vida. Como já mencionado, um dos fatores importantes para essa manutenção é a presença e ação adequada do NO. Esta molécula gasosa tem um papel vital na regulação da função dos vasos sanguíneos, ajudando no relaxamento. Para confirmar a hipótese dos dados funcionais, de que a disfunção endotelial causada pela exposição ao Fe “*in vitro*” teria relação com a biodisponibilidade reduzida de NO, foi usado uma sonda sensível a presença de NO. Confirmando, a redução da disponibilidade de NO foi evidenciada em anéis de ambos os grupos Fe 100 e Fe 1000, pelo declínio na fluorescência ao DAF-2. A análise da fluorescência permitiu determinar a quantidade de NO presente, e a redução na fluorescência indicou uma diminuição deste importante gás vasodilatador. O achado corrobora com estudos anteriores utilizando modelos de sobrecarga crônica de ferro que também associaram a menor biodisponibilidade de NO à disfunção endotelial e alteração da reatividade vascular (Bertoli et al., 2018; Ribeiro Júnior et al., 2017).

Sabendo das reações químicas que naturalmente o ferro participa na produção de EROs, e considerando que além dos danos diretos sobre as células que compõem os vasos sanguíneos, as EROs também promovem disfunção endotelial por reduzirem a biodisponibilidade do NO, buscamos investigar o papel de algumas EROs sobre esses efeitos agudos identificados. Conforme estudos, observou-se que há uma relação entre a sobrecarga de ferro e aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas artérias carótidas de camundongos, prejudicando relaxamento mediado por acetilcolina e aumentando marcadores de trombose (Day et al., 2003).

Durante essas avaliações, enquanto a incubação com catalase, um “varredor” de H₂O₂, reduziu apenas discretamente a reatividade vascular nos anéis CT, mesmo assim somente na maior concentração de catalase utilizada, essa intervenção atenuou significativamente a hiper-reatividade dos anéis dos grupos Fe. Houve uma diminuição na contratilidade dos vasos, porém sem relevância significativa quando comparado as duas concentrações do varredor. Marques et al., (2015) também descreveram efeito significativo da incubação com a catalase em aortas de ratos sobrecarregados cronicamente por 4 semanas, indicando aumento da produção local de H₂O₂, possivelmente sem

uma resposta antioxidante endógena eficiente, uma vez que a expressão da proteína da catalase vascular não foi alterada naquele estudo. Utilizando este mesmo raciocínio, nossos dados sugerem então que, na incubação “in vitro” com Fe^{2+} , a geração imediata de H_2O_2 desempenha também um papel na disfunção vascular sem qualquer resposta compensatória da catalase endógena. O H_2O_2 , é prejudicial porque é gerado a partir do metabolismo do O_2 e, na presença de ferro, participa da reação que produz o OH^\bullet . É um metabólito nocivo com longa duração, que ultrapassa a barreira lipídica e pode afetar a membrana dos eritrócitos e proteínas envolvidas com Fe^{2+} (Scott et al., 1991). Como citado anteriormente as EROs podem levar a diminuição da disponibilidade de NO, principal fator para a disfunção endotelial e, entre outros distúrbios, o processo inflamatório preditor da aterosclerose (Shaito et al., 2022).

Ademais, o H_2O_2 pode desempenhar um papel importante nessas alterações de reatividade vascular, não apenas diretamente (podendo ser vasodilatador ou vasoconstrictor), mas também por participar das reações de Fenton e Haber-Weiss na presença de ferro, formando assim metabólitos secundários também prejudiciais como a OH^\bullet (Wardman et al., 1996; Cai et al., 2005; Thakali et al., 2006). Na nossa avaliação da influência da OH^\bullet sobre a modulação da vasomotricidade do vaso, o “varredor” DMSO foi utilizado em duas concentrações 0,1% e 1% a fim de avaliar possíveis diferenças na quantidade produzida de OH^\bullet . A incubação de DMSO 0,1% no grupo Ct não influenciou de modo significativo a vasomotricidade à fenilefrina, embora quando incubado a 1%, houve diferença na resposta vasomotora que se demonstrou menor, o que poderia indicar certa quantidade de OH^\bullet presente mesmo em situação controle e capaz de influenciar na modulação do vaso (resposta contrátil), ou mesmo algum efeito direto desta substância sobre o processo de contração do músculo liso. Por outro lado, os anéis dos grupos Fe tiveram sua contração à fenilefrina significativamente reduzida, mesmo nas menores concentrações de DMSO, corroborando a hipótese da influência dessa ERO na intensidade da resposta vasomotora mantida pelo Fe. Vale mencionar que, nas maiores concentrações, o DMSO foi capaz de reduzir a reatividade vascular dos anéis expostos ao Fe a níveis medidos nos anéis controle, o que reforça o papel do OH^\bullet provavelmente como via final ou mais importante na mediação da disfunção endotelial e hiperreatividade induzida pelo Fe. Em concordância, nosso grupo de estudo

demonstrou previamente, um comprometimento na função miocárdica de amostras de ratos expostas a mesmas altas concentrações de Fe^{2+} , que também fora parcialmente revertida pela incubação com catalase e totalmente revertida pela incubação de DMSO 1% (Ávila et al., 2016). Nesse mesmo estudo, os dados indicaram que um aumento dessas EROs (OH^{\bullet} e H_2O_2) “in vitro” foi capaz de mediar disfunção miocárdica, diminuição da atividade da ATPase miosínica e da sensibilidade miofilamentar ao Ca^{2+} (Ávila et al., 2016).

Na sobrecarga de ferro, as alterações vasculares observadas têm sido fortemente relacionadas ao estresse oxidativo, sendo a peroxidação lipídica, um parâmetro comum de análise da lesão tecidual ou sistêmica promovida pelas EROs em excesso identificado em ratos (Lou et al., 2009; Zhou et al., 2000), camundongos (Davis; Bartfay, 2004; Oudit et al., 2004) e homens (Naithani et al., 2006) com sobrecarga. De fato, o estresse oxidativo é um fator presente na fisiopatologia da sobrecarga de ferro, e deve ser o principal mediador dos danos identificados em diferentes órgãos e sistemas (Cheng; Lian, 2013; Gudjoncik et al., 2014). Em concordância, identificamos papéis significantes do bloqueio da geração de EROs na reversão ou impedimento parcial das alterações na vasomotricidade dos segmentos aórticos expostos ao Fe^{2+} 100 e 1000 μM . Entretanto, apesar do forte indício da literatura a respeito do papel do aumento do estresse oxidativo gerado pelo ferro como mediador de disfunções, nossos ensaios de MDA e AOPP tiveram resultados inesperados. Não foram encontradas diferenças significativas lesões, no tecido vascular, decorrentes do estresse oxidativo gerado pela presença do Fe em altas concentrações. Pela análise AOPP, considerado marcador importante para estimar o grau de dano proteico mediado por oxidação, não houve qualquer elevação nos tecidos vasculares expostos ao Fe^{2+} em comparação aos anéis Ct. Nas médias das medidas de TBARS, um marcador de peroxidação lipídica, no tecido aórtico extraído dos anéis Fe, não houve significância estatística. Tomados juntos, essas duas últimas análises poderiam nos indicar que, o aumento na produção de EROs pode até ter mediado a disfunção endotelial e aumento da reatividade, mas ainda não tenha sido capaz de promover lesão significativa dos lipídeos (sem peroxidação lipídica aumentada) e das proteínas (sem aumento na oxidação avançada de proteínas).

6 Conclusão

Nossos dados indicam que a incubação com Fe^{2+} “in vitro” por 30 minutos foi suficiente para causar prejuízo na modulação endotelial de maneira dose dependente, causando também alterações morfológicas na superfície das células endoteliais. Os mecanismos relacionados à hiper-reatividade vascular causada pela exposição ao Fe^{2+} em altas concentrações parecem estar relacionados a diminuição da biodisponibilidade de NO e participação de EROs como H_2O_2 e $\text{OH}\cdot$, além de alterações em produtos vasoativos da COX.

Esse é o primeiro estudo a demonstrar efeitos diretos da presença do ferro lábil em altas concentrações, semelhantes àsquelas encontradas na sobrecarga sistêmica, sobre a morfologia e função vascular. Esse prejuízo na modulação endotelial já aos 30 minutos de exposição, pode ter consequências a longo prazo, tais como remodelamento vascular e rigidez aórtica, aumento da resistência vascular periférica, além de um estado proliferativo, pró-trombótico e pró-inflamatório que predispõem a eventos cardiovasculares adversos (aterosclerose, infarto, etc).

7. REFERÊNCIAS

- Andreu, G. L. Pard.; Inada, N. M.; Vercesi, A. E.; Curti, C. Uncoupling and oxidative stress in liver mitochondria isolated from rats with acute iron overload. *Archives of Toxicology*, [S. l.], v. 83, n. 1, p. 47–53, 2009. DOI: 10.1007/s00204-008-0322-x.
- Ávila, R. A., Silva, M. A. S. C., Peixoto, J. V., Kassouf-Silva, I., Fogaça, R. T. H., & dos Santos, L. (2016). Mechanisms involved in the in vitro contractile dysfunction induced by different concentrations of ferrous iron in the rat myocardium. *Toxicology in Vitro*, 36, 38–45.
- Belch, J. J.; Bridges, A. B.; Scott, N.; Chopra, M. Oxygen free radicals and congestive heart failure. *British heart journal*, England, v. 65, n. 5, p. 245–248, 1991. DOI: 10.1136/hrt.65.5.245.
- Belton, O.; Byrne, D.; Kearney, D.; Leahy, A.; Fitzgerald, D. J. Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. *Circulation*, United States, v. 102, n. 8, p. 840–845, 2000. DOI: 10.1161/01.cir.102.8.840.
- Benson, Matthew A.; Batchelor, Helen; Chuaiphichal, Surawee; Bailey, Jade; ZHU, Hanneng; Stuehr, Dennis J.; Bhattacharya, Shoumo; Channon, Keith M.; Crabtree, Mark J. A pivotal role for tryptophan 447 in enzymatic coupling of human endothelial nitric oxide synthase (eNOS): effects on tetrahydrobiopterin-dependent catalysis and eNOS dimerization. *The Journal of biological chemistry*, United States, v. 288, n. 41, p. 29836–29845, 2013. DOI: 10.1074/jbc.M113.493023.
- Bertoli, Sabrina Rodrigues; Marques, Vinicius Bermond; Rossi, Emilly Martinelli; Krause, Maiara; Carneiro, Maria Tereza Weitzel Dias; SIMÕES, Maylla Ronacher; Dos Santos, Leonardo. Chronic iron overload induces vascular dysfunction in resistance pulmonary arteries associated with right ventricular remodeling in rats. *Toxicology Letters*, [S. l.], v. 295, n. April, p. 296–306, 2018. DOI: 10.1016/j.toxlet.2018.07.010.
- Boron, Walter F.; Boulpaep, Emile L. *Fisiologia Médica: Uma Abordagem Celular e Molecular*. [s.l.: s.n.]. DOI: 10.1016/B978-85-352-6274-2/00063-6.
- Brozovich, F. V.; Nicholson, C. J.; Degen, C. V.; Gao, Yuan Z.; Aggarwal, M.; Morgan, Kathleen G. Mechanisms of vascular smooth muscle contraction and the basis for pharmacologic treatment of smooth muscle disorders. *Pharmacological Reviews*, [S. l.], v. 68, n. 2, p. 476–532, 2016. DOI: 10.1124/pr.115.010652.
- Buja, L. M.; Roberts, W. C. Iron in the heart. Etiology and clinical significance. *The American journal of medicine*, United States, v. 51, n. 2, p. 209–221, 1971. DOI: 10.1016/0002-9343(71)90240-3.

- Chifman, Julia; Laubenbacher, Reinhard; Torti, Suzy V. A systems biology approach to iron metabolism. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, [S. l.], v. 844, p. 201–225, 2014. DOI: 10.1007/978-1-4939-2095-2_10.
- Cohen, M. V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this the time for clinical trials? *Annals of internal medicine*, United States, v. 111, n. 11, p. 918–931, 1989. DOI: 10.7326/0003-4819-111-11-918.
- Cusmà Piccione, Maurizio et al. Early identification of cardiovascular involvement in patients with β -thalassemia major. *The American journal of cardiology*, United States, v. 112, n. 8, p. 1246–1251, 2013. DOI: 10.1016/j.amjcard.2013.05.080.
- Daiber, Andreas; Xia, Ning; Steven, Sebastian; Oelze, Matthias; Hanf, Alina; KRÖLLER-SCHÖN, Swenja; MÜNDEL, Thomas; LI, Huige. New Therapeutic Implications of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Function/Dysfunction in Cardiovascular Disease *International Journal of Molecular Sciences*, 2019. DOI: 10.3390/ijms20010187.
- Davies, M. J.; Gordon, J. L.; Gearing, A. J.; Pigott, R.; Woolf, N.; Katz, D.; Kyriakopoulos, A. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *The Journal of pathology*, England, v. 171, n. 3, p. 223–229, 1993. DOI: 10.1002/path.1711710311.
- Davis, Matthew T.; Bartfay, Wally J. Dose-dependent effects of chronic iron burden on heart aldehyde and acyloln production in mice. *Biological trace element research*, United States, v. 99, n. 1–3, p. 255–268, 2004. DOI: 10.1385/BTER:99:1-3:255.
- Day SM, Duquaine D, Mundada LV, Menon RG, Khan BV, Rajagopalan S, Fay WP. Chronic Iron Administration Increases Vascular Oxidative Stress and Accelerates Arterial Thrombosis. *Circulation Research*. 2003; 107:2601-2606
- Demant AW, Schmiedel A, Büttner R, Lewalter T, Reichel C. Heart failure and malignant ventricular tachyarrhythmias due to hereditary hemochromatosis with iron overload cardiomyopathy. *Clinical Research in Cardiology*. 2007; 96: 900–3.
- Demant, Andre Werner; Schmiedel, Alexandra; Büttner, Reinhard; Lewalter, Thorsten; Reichel, Christoph. Heart failure and malignant ventricular tachyarrhythmias due to hereditary hemochromatosis with iron overload cardiomyopathy. *Clinical Research in Cardiology*, [S. l.], v. 96, n. 12, p. 900–903, 2007. DOI: 10.1007/s00392-007-0568-y.
- Díez-López, Carles; Comín-Colet, Josep; González-Costello, José. Iron overload cardiomyopathy: from diagnosis to management. *Current opinion in cardiology*, United States, v. 33, n. 3, p. 334–340, 2018. DOI: 10.1097/HCO.0000000000000511.
- Di Bisceglie AM, Axiotis CA, Hoofnagle JH, & Bacon BR (1992) Measurements of iron status in patients with chronic hepatitis. *Gastroenterology* 102, 2108-2113

- Edwards, C. Q.; Kelly, T. M.; Ellwein, G.; Kushner, J. P. Thyroid disease in hemochromatosis. Increased incidence in homozygous men. *Archives of internal medicine, United States*, v. 143, n. 10, p. 1890–1893, 1983.
- Engle, M. A.; Erlandson, M.; Smith, C. H. Late Cardiac Complications of Chronic, Severe, Refractory Anemia With Hemochromatosis. *Circulation*, [S. I.], v. 30, p. 698–705, 1964. DOI: 10.1161/01.CIR.30.5.698.
- Ferreira, A.L.A.; matsubara, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *IEEE International Symposium on Polymeric Electronics Packaging, PEP*, [S. I.], p. 95–100, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-42301997000100014>.
- Fidelis, Helbert Gabriel; Mageski, Jandinay Gonzaga Alexandre; Goes, Susana Curry Evangelista; BOTELHO, Tatiani; MARQUES, Vinicius Bermond; Ávila, Renata Andrade; Dos Santos, Leonardo. Blockade of angiotensin AT(1) receptors prevents arterial remodelling and stiffening in iron-overloaded rats. *British journal of pharmacology, England*, v. 177, n. 5, p. 1119–1130, 2020. DOI: 10.1111/bph.14904.
- Fine, J. S. Iron poisoning. *Current problems in pediatrics, United States*, v. 30, n. 3, p. 71–90, 2000. DOI: 10.1067/mps.2000.104055
- Flannagan, Ronald S.; Heit, Bryan; Heinrichs, David E. Antimicrobial mechanisms of macrophages and the immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*. [s.l.: s.n.]. v. 4 DOI: 10.3390/pathogens4040826.
- Fleming, Ingrid. Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Pflugers Archiv : European journal of physiology, Germany*, v. 459, n. 6, p. 793–806, 2010. DOI: 10.1007/s00424-009-0767-7
- Fleming, Mark D.; Romano, Michelle A.; Maureen, A. S. U.; Garrick, Laura M.; Garrick, Michael D.; Andrews, Nancy C. Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: Evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [S. I.], v. 95, n. 3, p. 1148–1153, 1998. DOI: 10.1073/pnas.95.3.1148.
- Förstermann, Ulrich; Sessa, William C. Nitric oxide synthases: Regulation and function. *European Heart Journal*, [S. I.], v. 33, n. 7, p. 829–837, 2012. DOI: 10.1093/eurheartj/ehr304.
- Furchgott, R. F.; Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature, England*, v. 288, n. 5789, p. 373–376, 1980. DOI: 10.1038/288373a0
- Gaenger, Hannes; Marschang, Peter; Sturm, Wolfgang; Neumayr, Günther; Vogel, Wolfgang; Patsch, Josef; Weiss, Günter. Association between increased iron stores and impaired endothelial function in patients with hereditary hemochromatosis. *Journal of the American College of Cardiology*,

- United States, v. 40, n. 12, p. 2189–2194, 2002. DOI: 10.1016/s0735-1097(02)02611-6.
- Galbraith, R. A. Heme binding to Hep G2 human hepatoma cells. *Journal of hepatology*, Netherlands, v. 10, n. 3, p. 305–310, 1990. DOI: 10.1016/0168-8278(90)90137-g.
- Gilbert, H. F. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, United States, v. 63, p. 69–172, 1990. DOI: 10.1002/9780470123096.ch2.
- Gräsbeck, R.; Kouvonon, I.; Lundberg, M.; Tenhunen, R. An intestinal receptor for heme. *Scandinavian journal of haematology*, Denmark, v. 23, n. 1, p. 5–9, 1979. DOI: 10.1111/j.1600-0609.1979.tb02845.x.
- Gordan, Richard; Wongjaikam, Suwakon; Gwathmey, Judith K.; Chattipakorn, Nipon; Chattipakorn, Siriporn C.; XIE, Lai-Hua. Involvement of cytosolic and mitochondrial iron in iron overload cardiomyopathy: an update. *Heart failure reviews*, United States, v. 23, n. 5, p. 801–816, 2018. DOI: 10.1007/s10741-018-9700-5.
- Griendling, Kathy K.; Camargo, Livia L.; Rios, Francisco J.; Alves-Lopes, Rhéure; Montezano, Augusto C.; Touyz, Rhian M. Oxidative Stress and Hypertension. *Circulation Research*, [S. l.], p. 993–1020, 2021. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.121.318063.
- Gummin, David D.; mowry, James B.; Beuhler, Michael C.; Spyker, Daniel A.; Brooks, Daniel E.; Dibert, Katherine W.; Rivers, Laura J.; Pham, Nathaniel P. T.; Ryan, Mark L. 2019 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 37th Annual Report. *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)*, [S. l.], v. 58, n. 12, p. 1360–1541, 2020. DOI: 10.1080/15563650.2020.1834219.
- Gutteridge JMC. Lipid peroxidation: some problems and concepts. In Halliwell B (ed): *Oxygen radicals and tissue injury*. Proceedings of a Brook Lodge Symposium; 1987 Apr 27-29; Bethesda (MD): Upjohn/Federation of American Societies for Experimental Biology, 1988; 9-19.
- Gulati, Vinay; Harikrishnan, Prakash; Palaniswamy, Chandrasekar; Aronow, Wilbert S.; JAIN, Diwakar; FRISHMAN, William H. Cardiac involvement in hemochromatosis. *Cardiology in Review*, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 56–68, 2014. DOI: 10.1097/CRD.0b013e3182a67805.
- Gudjoncik, Aurélie; Guenancia, Charles; Zeller, Marianne; Cottin, Yves; Vergely, Catherine; Rochette, Luc. Iron, oxidative stress, and redox signaling in the cardiovascular system. *Molecular nutrition & food research*, Germany, v. 58, n. 8, p. 1721–1738, 2014. DOI: 10.1002/mnfr.201400036.

- Gujja, Pradeep; Rosing, Douglas R.; Tripodi, Dorothy J.; Shizukuda, Yukitaka. Iron Overload Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, [S. l.], v. 56, n. 13, p. 1001–1012, 2010. DOI: 10.1016/j.jacc.2010.03.083.
- Guzik, Bartłomiej et al. Mechanisms of oxidative stress in human aortic aneurysms--association with clinical risk factors for atherosclerosis and disease severity. *International journal of cardiology*, Netherlands, v. 168, n. 3, p. 2389–2396, 2013. DOI: 10.1016/j.ijcard.2013.01.278.
- Haddad, John J. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cellular signalling*, England, v. 14, n. 11, p. 879–897, 2002. DOI: 10.1016/s0898-6568(02)00053-0.
- Harris ZL, Klomp LW, & Gitlin JD (1998). Aceruloplasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis. *Am J Clin Nutr*67, 972S-977S
- Hall, J. E.; Guyton, A. C. *Tratado de Fisiologia Médica*. 13a edição Elsevier Editora Ltda, 2017.
- Halliwell, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of neurochemistry*, England, v. 59, n. 5, p. 1609–1623, 1992. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1992.tb10990.x.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Archives of biochemistry and biophysics*, United States, v. 246, n. 2, p. 501–514, 1986. DOI: 10.1016/0003-9861(86)90305-x.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in enzymology*, United States, v. 186, p. 1–85, 1990. DOI: 10.1016/0076-6879(90)86093-b.
- Halliwell, B. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis*, Switzerland, v. 23 Suppl 1, p. 118–126, 1993. DOI: 10.1159/000216921
- Hebbel, R. P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, United States, v. 107, n. 5, p. 401–404, 1986.
- Heymes, C.; Habib, A.; Yang, D.; Mathieu, E.; Marotte, F.; Samuel, J.; Boulanger, C. M. Cyclo-oxygenase-1 and -2 contribution to endothelial dysfunction in ageing. *British journal of pharmacology*, England, v. 131, n. 4, p. 804–810, 2000. DOI: 10.1038/sj.bjp.0703632.
- Hill, M. F.; Singal, P. K. Right and left myocardial antioxidant responses during heart failure subsequent to myocardial infarction. *Circulation*, United States, v. 96, n. 7, p. 2414–2420, 1997. DOI: 10.1161/01.cir.96.7.2414.

- Hoffbrand, A. V; Moss, P. A. H. Fundamentos em Hematologia de Hoffbrand. [s.l.] : Artmed Editora, 2011. Disponível em: https://books.google.com.br/books?id=EyU_DwAAQBAJ
- Horton, R.; Rice-Evans, C.; Fuller, B. J. The effects of iron-mediated oxidative stress in isolated renal cortical brush border membrane vesicles at normothermic and hypothermic temperatures. *Free radical research communications, Switzerland*, v. 5, n. 4–5, p. 267–275, 1989. DOI: 10.3109/10715768909074710.
- Huang, Minzhou; Duhadaway, James B.; Prendergast, George C.; Laury-Kleintop, Lisa D. RhoB regulates PDGFR-beta trafficking and signaling in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, United States*, v. 27, n. 12, p. 2597–2605, 2007. DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.154211.
- Judkins, Courtney P. et al. Direct evidence of a role for Nox2 in superoxide production, reduced nitric oxide bioavailability, and early atherosclerotic plaque formation in ApoE^{-/-} mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology, United States*, v. 298, n. 1, p. H24-32, 2010. DOI: 10.1152/ajpheart.00799.2009.
- Kamata, H.; hirata, H. Redox regulation of cellular signalling. *Cellular signalling, England*, v. 11, n. 1, p. 1–14, 1999. DOI: 10.1016/s0898-6568(98)00037-0.
- Kramer JH, Spurney CF, Iantorno M, Tziros C, Chmielinska JJ, Mak IT, Weglicki WB. d-Propranolol protects against oxidative stress and progressive cardiac dysfunction in iron overloaded rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2012; 90: 1257–1268.
- Kukongviriyapan, Veerapol; Somparn, Nuntiya; Senggunpral, Laddawan; Prawan, Auemduan; Kukongviriyapan, Upa; JETSRISUPARB, Arunee. Endothelial dysfunction and oxidant status in pediatric patients with hemoglobin E-beta thalassemia. *Pediatric cardiology, United States*, v. 29, n. 1, p. 130–135, 2008. DOI: 10.1007/s00246-007-9107-x
- Kumfu, Sirinart; Chattipakorn, Siriporn C.; Chattipakorn, Nipon. T-type and L-type Calcium Channel Blockers for the Treatment of Cardiac Iron Overload: An Update. *Journal of cardiovascular pharmacology, United States*, v. 70, n. 5, p. 277–283, 2017. DOI: 10.1097/FJC.0000000000000525.
- Levine, Arlene Bradley; Punihaole, David; Levine, T. Barry. Characterization of the role of nitric oxide and its clinical applications. *Cardiology, Switzerland*, v. 122, n. 1, p. 55–68, 2012. DOI: 10.1159/000338150.
- 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. *The New England journal of medicine, United States*, v. 301, n. 21, p. 1143–1148, 1979. DOI: 10.1056/NEJM197911223012103.

- Lipinski, Boguslaw; Pretorius, Ethersia. Iron-induced fibrin in cardiovascular disease. *Current neurovascular research, United Arab Emirates*, v. 10, n. 3, p. 269–274, 2013. DOI: 10.2174/15672026113109990016.
- Loirand, Gervaise; Pacaud, Pierre. Involvement of Rho GTPases and their regulators in the pathogenesis of hypertension. *Small GTPases, United States*, v. 5, n. 4, p. 1–10, 2014. DOI: 10.4161/sgtp.28846.
- Lou LX, Geng B, Chen Y, Yu F, Zhao J, Tang CS. Endoplasmic reticulum stress involved in heart and liver injury in iron-loaded rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2009; 36: 612–618.
- Lou, Da-Jun; LI, Hong-Liang; YANG, Wen-Ying; XIAO, Jian-Zhong; DU, Rui-Qin; WANG, Bing; BAI, Xiu-Ping; PAN, Lin. [Relationship between oxidative stress and beta cell lipoapoptosis in rats]. *Zhejiang da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Zhejiang University. Medical sciences, China*, v. 38, n. 6, p. 620–625, 2009. DOI: 10.3785/j.issn.1008-9292.2009.06.011.
- Lutz, H. U.; Bussolino, F.; Flepp, R.; Fasler, S.; Stammli, P.; Kazatchkine, M. D.; Arese, P. Naturally occurring anti-band-3 antibodies and complement together mediate phagocytosis of oxidatively stressed human erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, [S. I.]*, v. 84, n. 21, p. 7368–7372, 2006. DOI: 10.1073/pnas.84.21.7368. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.84.21.7368>. Acesso em: 14 maio. 2019.
- Majuri, R.; Gräsbeck, R. A Rosette receptor assay with haem-microbeads. Demonstration of a haem receptor on K562 cells. *European journal of haematology, England*, v. 38, n. 1, p. 21–25, 1987. DOI: 10.1111/j.1600-0609.1987.tb01418.x
- Mallat, Z.; Philip, I.; Lebre, M.; Chatel, D.; Maclouf, J.; Tedgui, A. Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F2alpha in pericardial fluid of patients with heart failure: a potential role for in vivo oxidant stress in ventricular dilatation and progression to heart failure. *Circulation, United States*, v. 97, n. 16, p. 1536–1539, 1998. DOI: 10.1161/01.cir.97.16.1536.
- Marques, Vinicius Bermond; Leal, Marcos André Soares; Mageski, Jandinay Gonzaga Alexandre; Fidelis, Helbert Gabriel; Nogueira, Breno Valentim; Vasquez, Elisardo Corral; Meyrelles, Silvana dos Santos; Simões, Maylla Ronacher; dos Santos, Leonardo. Chronic iron overload intensifies atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice: Role of oxidative stress and endothelial dysfunction. *Life Sciences, [S. I.]*, v. 233, n. April, 2019. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.116702.
- Marques, Vinicius Bermond; Nascimento, Tatiani Botelho; Ribeiro, Rogério Faustino; Broseghini-Filho, Gilson Brás; Rossi, Emilly Martinelly; Graceli, Jones Bernades; dos Santos, Leonardo. Chronic iron overload in rats increases vascular reactivity by increasing oxidative stress and reducing nitric oxide bioavailability. *Life Sciences, [S. I.]*, v. 143, p. 89–97, 2015. DOI: 10.1016/j.lfs.2015.10.034.

- Martinet, Wim; Coornaert, Isabelle; Puylaert, Pauline; De Meyer, Guido R. Y. Macrophage Death as a Pharmacological Target in Atherosclerosis. *Frontiers in pharmacology, Switzerland*, v. 10, p. 306, 2019. DOI: 10.3389/fphar.2019.00306.
- Mello Filho, A. C.; Hoffmann, M. E.; Meneghini, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *The Biochemical journal, England*, v. 218, n. 1, p. 273–275, 1984. DOI: 10.1042/bj2180273.
- Michel, Thomas; Vanhoutte, Paul M. Cellular signaling and NO production. *Pflugers Archiv : European journal of physiology, Germany*, v. 459, n. 6, p. 807–816, 2010. DOI: 10.1007/s00424-009-0765-9.
- Minotti, G.; Aust, S. D. The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. *The Journal of biological chemistry, United States*, v. 262, n. 3, p. 1098–1104, 1987.
- Moncada, S.; Higgs, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *British journal of pharmacology, England*, v. 147 Suppl 1, n. Suppl 1, p. S193-201, 2006. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706458.
- Muñoz, Manuel; Villar, Isabel; García-Erce, José Antonio. An update on iron physiology. *World Journal of Gastroenterology, [S. I.]*, v. 15, n. 37, p. 4617–4626, 2009. DOI: 10.3748/wjg.15.4617.
- Murphy, Colm J.; Oudit, Gavin Y. Iron-overload cardiomyopathy: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Journal of cardiac failure, United States*, v. 16, n. 11, p. 888–900, 2010. DOI: 10.1016/j.cardfail.2010.05.009.
- Naithani, Rahul; Chandra, Jagdish; Bhattacharjee, Jayashree; Verma, Priyanka; Narayan, Shashi. Peroxidative stress and antioxidant enzymes in children with beta-thalassemia major. *Pediatric blood & cancer, United States*, v. 46, n. 7, p. 780–785, 2006. DOI: 10.1002/pbc.20669
- Naito, Yoshiro; Masuyama, Tohru; Ishihara, Masaharu. Iron and cardiovascular diseases. *Journal of Cardiology, [S. I.]*, v. 77, n. 2, p. 160–165, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2020.07.009>.
- Nelson, D. L. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2014, p. 158-159.
- Oates, Phillip S.; West, Adrian R. Heme in intestinal epithelial cell turnover, differentiation, detoxification, inflammation, carcinogenesis, absorption and motility. *World Journal of Gastroenterology, [S. I.]*, v. 12, n. 27, p. 4281–4295, 2006. DOI: 10.3748/wjg.v12.i27.4281.
- Oudit GY, Trivieri MG, Khaper N, Husain T, Wilson GJ, Liu P, Sole MJ, Backx PH. Taurine Supplementation Reduces Oxidative Stress and Improves Cardiovascular Function in an Iron-Overload Murine Model. *Circulation Research*. 2004; 109:1877-1885.

- Oudit, Gavin Y. et al. L-type Ca²⁺ channels provide a major pathway for iron entry into cardiomyocytes in iron-overload cardiomyopathy. *Nature medicine, United States*, v. 9, n. 9, p. 1187–1194, 2003. DOI: 10.1038/nm920.
- Pantopoulos, Kostas; Porwal, Suheel Kumar; Tartakoff, Alan; DEVIREDDY, L. mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry, [S. I.]*, v. 51, n. 29, p. 5705–5724, 2012.
- Parmley, R. T.; Barton, J. C.; Conrad, M. E.; Austin, R. L.; Holland, R. M. Ultrastructural cytochemistry and radioautography of hemoglobin–iron absorption. *Experimental and molecular pathology, Netherlands*, v. 34, n. 2, p. 131–144, 1981. DOI: 10.1016/0014-4800(81)90070-8.
- Paterek, Aleksandra; Mackiewicz, Urszula; Mączewski, Michał. Iron and the heart: A paradigm shift from systemic to cardiomyocyte abnormalities. *Journal of cellular physiology, United States*, v. 234, n. 12, p. 21613–21629, 2019. DOI: 10.1002/jcp.28820.
- Pierre, J. L.; Fontecave, M. Iron and activated oxygen species in biology: The basic chemistry. *BioMetals, [S. I.]*, v. 12, n. 3, p. 195–199, 1999. DOI: 10.1023/A:1009252919854.
- Ponka, Prem. *Iron Metabolism : Physiology and Pathophysiology. [S. I.]*, v. 83, n. April 1999, p. 73–83, 2000
- Qi, Zhonghua; Cai, Hui; Morrow, Jason D.; Breyer, Matthew D. Differentiation of cyclooxygenase 1- and 2-derived prostanoids in mouse kidney and aorta. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979), United States*, v. 48, n. 2, p. 323–328, 2006. DOI: 10.1161/01.HYP.0000231934.67549.b7. Rang, Rang; Ritter, James M.; Flower, Rod J.; Henderson, Graeme. *Rang & dale farmacologia. [s.l.] : Elsevier Brasil*, 2015.
- Ribeiro Júnior, Rogério Faustino; Marques, Vinicius Bermond; Nunes, Dieli Oliveira; Stefanon, Ivanita; Dos Santos, Leonardo. Chronic iron overload induces functional and structural vascular changes in small resistance arteries via NADPH oxidase-dependent O₂[rad]– production. *Toxicology Letters, [S. I.]*, v. 279, n. March, p. 43–52, 2017. DOI: 10.1016/j.toxlet.2017.07.497. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.07.497>.
- Roberts, S. K.; Henderson, R. W.; Young, G. P. Modulation of uptake of heme by rat small intestinal mucosa in iron deficiency. *The American journal of physiology, United States*, v. 265, n. 4 Pt 1, p. G712-8, 1993. DOI: 10.1152/ajpgi.1993.265.4.G712.
- Rokach, Joshua; Kim, Seongjin; Bellone, Sophie; Lawson, John A.; Praticò, Domenico; Powell, William S.; Fitzgerald, Garret A. Total synthesis of isoprostanes: discovery and quantitation in biological systems. *Chemistry and physics of lipids, Ireland*, v. 128, n. 1–2, p. 35–56, 2004. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2003.09.011
- Rossi, Emilly Martinelli; Ávila, Renata Andrade; Carneiro, Maria Tereza W. D.; Almenar, Camila C. P.; Dos Santos, Leonardo. Chronic Iron Overload Restrains the Benefits of Aerobic Exercise to the Vasculature. *Biological Trace Element Research, United States*, v. 198, n. 2, p. 521–534, 2020. DOI: 10.1007/s12011-020-02078-y.

- Russo, Guilia; Leopold, Jane A.; Loscalzo, Joseph. Vasoactive substances: nitric oxide and endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Vascular pharmacology, United States*, v. 38, n. 5, p. 259–269, 2002. DOI: 10.1016/s1537-1891(02)00250-1.
- Saleh Al-Shehabi, Tuqa; Iratni, Rabah; Eid, Ali H. Anti-atherosclerotic plants which modulate the phenotype of vascular smooth muscle cells. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology, Germany*, v. 23, n. 11, p. 1068–1081, 2016. DOI: 10.1016/j.phymed.2015.10.016.
- Santillo, Mariarosaria; Colantuoni, Antonio; Mondola, Paolo; Guida, Bruna; Damiano, Simona. NOX signaling in molecular cardiovascular mechanisms involved in the blood pressure homeostasis. *Frontiers in physiology, Switzerland*, v. 6, p. 194, 2015. DOI: 10.3389/fphys.2015.00194. Santos PC, Dinardo CL, Cancado RD, Schettert IT, Krieger JE, & Pereira AC (2012a). Non-HFE hemochromatosis. *Rev Bras Hematol Hemoter* 34, 311-316.
- Santos PC, Krieger JE, & Pereira AC (2012b). Molecular diagnostic and pathogenesis of hereditary hemochromatosis. *Int J Mol Sci* 13, 1497-1511. Sebastiani G, Vario A, Ferrari A, Pistis R, Noventa F, & Alberti A (2006). Hepatic iron, liver steatosis and viral genotypes in patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 13, 199-205.
- Scott, M. D.; Lubin, B. H.; Zuo, L.; Kuypers, F. A. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. *The Journal of laboratory and clinical medicine, United States*, v. 118, n. 1, p. 7–16, 1991.
- Senoner, Thomas; Dichtl, Wolfgang. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target? *Nutrients, Switzerland*, v. 11, n. 9, 2019. DOI: 10.3390/nu11092090.
- Shaito, Abdullah; Aramouni, Karl; Assaf, Roland; Parenti, Astrid; Orekhov, Alexander; Yazbi, Ahmed El; Pintus, Gianfranco; EID, Ali H. Oxidative Stress-Induced Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases. *Frontiers in bioscience (Landmark edition), Singapore*, v. 27, n. 3, p. 105, 2022. DOI: 10.31083/j.fbl2703105.
- Siddique A, Kowdley KV. Review article: the iron overload syndromes. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 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, Italy*, v. 13, n. 10, p. 849–853, 1990. DOI: 10.1007/BF03349640.
- Siri-angkul, Natthaphat; XIE, Lai-Hua; Chattipakorn, Siriporn C.; Chattipakorn, Nipon. Cellular Electrophysiology of Iron-Overloaded Cardiomyocytes.

- Frontiers in physiology, Switzerland, v. 9, p. 1615, 2018. DOI: 10.3389/fphys.2018.01615.
- Shan, X. Q.; AW, T. Y.; Jones, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacology & therapeutics*, England, v. 47, n. 1, p. 61–71, 1990. DOI: 10.1016/0163-7258(90)90045-4.
- Shayeghi, Majid et al. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell*, United States, v. 122, n. 5, p. 789–801, 2005. DOI: 10.1016/j.cell.2005.06.025
- Tabas, Ira; Williams, Kevin Jon; Borén, Jan. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation*, United States, v. 116, n. 16, p. 1832–1844, 2007. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.676890.
- Taniyama, Yoshihiro; Griendling, Kathy K. Reactive Oxygen Species in the Vasculature: Molecular and Cellular Mechanisms. *Hypertension*, [S. l.], v. 42, n. 6, p. 1075–1081, 2003. DOI: 10.1161/01.HYP.0000100443.09293.4F.
- Tejero, Jesús; Shiva, Sruti; Gladwin, Mark T. Sources of Vascular Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species and Their Regulation. *Physiological reviews*, United States, v. 99, n. 1, p. 311–379, 2019. DOI: 10.1152/physrev.00036.2017.
- Vaghefi, N.; Guillochon, D.; Bureau, F.; Neuville, D.; Lebrun, F.; Arhan, P.; Bouglé, D. The effect of cysteine and 2,4-dinitrophenol on heme and nonheme absorption in a rat intestinal model. *The Journal of nutritional biochemistry*, United States, v. 11, n. 11–12, p. 562–567, 2000. DOI: 10.1016/s0955-2863(00)00120-0.
- Valenti L, Varena M, Fracanzani AL, Rossi V, Fargion S, & Sinigaglia L (2009). Association between iron overload and osteoporosis in patients with hereditary hemochromatosis. *Osteoporos Int*20, 549-555.
- Vanhoutte, P. M.; Shimokawa, H.; Feletou, M.; Tang, E. H. C. Endothelial dysfunction and vascular disease – a 30th anniversary update. *Acta Physiologica*, [S. l.], v. 219, n. 1, p. 22–96, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/apha.12646>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/apha.12646>.
- Vanhoutte, Paul M.; ZHAO, Yingzi; XU, Aimin; LEUNG, Susan W. S. Thirty Years of Saying NO: Sources, Fate, Actions, and Misfortunes of the Endothelium-Derived Vasodilator Mediator. *Circulation research*, United States, v. 119, n. 2, p. 375–396, 2016. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.306531.
- Virmani, Renu; Roberts, William C. Extravasated erythrocytes, iron, and fibrin in atherosclerotic plaques of coronary arteries in fatal coronary heart disease and their relation to luminal thrombus: Frequency and significance in 57 necropsy patients and in 2958 five mm segments of 224 major epicardial coronary

- arteries. *American Heart Journal*, [S. l.], v. 105, n. 5, p. 788–797, 1983. DOI: 10.1016/0002-8703(83)90242-9.
- Vokurkova, Martina; Xu, Shaoping; Touyz, Rhian M. Reactive oxygen species, cell growth, cell cycle progression and vascular remodeling in hypertension. *Future cardiology*, England, v. 3, n. 1, p. 53–63, 2007. DOI: 10.2217/14796678.3.1.53.
- Weintraub, L. R.; Conrad, M. E.; Crosby, W. H. Absorption of hemoglobin iron by the rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.), United States, v. 120, n. 3, p. 840–843, 1965. DOI: 10.3181/00379727-120-30670
- Wheby, M. S.; Spyker, D. A. Hemoglobin iron absorption kinetics in the iron-deficient dog. *The American journal of clinical nutrition*, United States, v. 34, n. 9, p. 1686–1693, 1981. DOI: 10.1093/ajcn/34.9.1686.
- Wojciak-Stothard, Beata et al. Role of RhoB in the regulation of pulmonary endothelial and smooth muscle cell responses to hypoxia. *Circulation research*, United States, v. 110, n. 11, p. 1423–1434, 2012. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.264473.
- Wyllie, J. C.; Kaufman, N. An electron microscopic study of heme uptake by rat duodenum. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, United States, v. 47, n. 5, p. 471–476, 1982.
- Yuen HW, Becker W. Iron Toxicity. [Updated 2021 Jul 25]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459224>
- Yuen, Ho-Wang; Becker, Wenxia. *Pathophysiology Toxicokinetics*. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459224>. Acesso em: 21 set. 2022
- Zhou, X. J.; Laszik, Z.; Wang, X. Q.; Silva, F. G.; Vaziri, N. D. Association of renal injury with increased oxygen free radical activity and altered nitric oxide metabolism in chronic experimental hemosiderosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, United States, v. 80, n. 12, p. 1905–1914, 2000. DOI: 10.1038/labinvest.3780200
- Zou, Ming-Hui. Peroxynitrite and protein tyrosine nitration of prostacyclin synthase. *Prostaglandins & other lipid mediators*, United States, v. 82, n. 1–4, p. 119–127, 2007. DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2006.05.005.